



HAL
open science

CYCLINE A, UN NOUVEAU LIEN ENTRE CYCLE ET POLARITÉ CELLULAIRES

Pénélope Darnat

► **To cite this version:**

Pénélope Darnat. CYCLINE A, UN NOUVEAU LIEN ENTRE CYCLE ET POLARITÉ CELLULAIRES. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT: . tel-04089372

HAL Id: tel-04089372

<https://hal.science/tel-04089372v1>

Submitted on 4 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie
Spécialité Biologie Cellulaire & développement
Ecole doctorale Complexité du vivant

**CYCLINE A,
UN NOUVEAU LIEN
ENTRE CYCLE ET POLARITÉ
CELLULAIRES**

Par Pénélope DARNAT

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue le 10 décembre 2020

Devant un jury composé de:

Dr Nathalie Dostatni en qualité de Présidente du jury

Dr Roland Le Borgne en qualité de Rapporteur

Dr Fabienne Pituello en qualité de Rapportrice

Dr Juliette Mathieu en qualité d'Examinatrice

Dr Lionel Pintard en qualité d'Examineur

Pr Agnès Audibert en qualité de Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer mon travail. Merci à vous tous: Dr Nathalie Dostatni, Dr Roland Le Borgne, Dr Fabienne Pituello, Dr Juliette Mathieu et Dr Lionel Pintard.

Ensuite je voudrais remercier La Ligue contre le Cancer pour avoir financé ce projet très prometteur, et cela pour les quatre années de mon doctorat. Ce fut vraiment une chance pour moi de pouvoir travailler sur le rôle inattendu de Cycline A dans la PCP.

Le plus grand merci revient à Agnès. Je ne sais pas trop par où commencer alors restons simple: merci pour tout. Pour tout et encore pour tout. Pour ta patience, ta pédagogie et de m'avoir poussé toujours un peu plus loin. Tes connaissances scientifiques m'impressionnent à chaque fois. J'admire ta ténacité, ta passion pour la science et ta gentillesse. Je suis bien consciente que j'ai eu énormément de chance de pouvoir réaliser cette thèse avec toi donc je t'en serai toujours reconnaissante.

Michel, merci de m'avoir acceptée dans ton laboratoire malgré mes blagues constantes et pas forcément drôles. Nos avis divergent sur certains sujets et on se rappellera de ses discussions. Mais mes préférées restent celles où tu as toujours réponse à mes questions scientifiques les plus incongrues. Un jour j'apprendrais l'espagnol pour pouvoir chanter avec toi.

Ô ma grande Gégé, Angélique de ton saint nom, ma chère Flipping Sister, je suis si contente que l'on soit trouvées. On aura bien flippé, on aura bien ri, on aura bien mangé et on aura bien co-ipé. Tous ces cafés partagés avaient un petit ingrédient en plus. De l'amour ou du piment d'Espelette, va savoir. Malheureusement pour toi, même si c'est ma fin de ma thèse, on va rester amies et aller manger Filakia. Tu n'as pas vraiment le choix. Et en attendant, si je te manque trop et que tu regardes la collection de post-it plus ou moins utiles que j'ai caché ou lancé sur ton bureau, ou que tu te rendes compte enfin que je t'ai collé mon étiquette de pomme sur l'épaule, ou que tu décides à me rendre mes clés, regarde sous ta tasse.

Sophie, merci pour tout. Pour tous les petits messages, pour d'un regard me dire si je ne suis pas claire en réunion. Merci pour ton soutien. C'était un réel plaisir de passer ces quatre ans avec toi. Tu as toujours eu les bons mots pour me remettre en selle et m'encourager quand j'avais la tête dans le clavier. Merci beaucoup.

Merci aussi à Jérôme pour toutes ces discussions philosophiques et pour la maïeutique intellectuelle qui en a découlait ainsi que les tours que nous avons mis au point et, celui que vous avez raté avec Angélique. Je t'enverrai des cartes postales de mon prochain voyage en Nainponie.

Je voudrais aussi remercier Juliette Mathieu et Christine Vesque pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, d'avoir suivi l'évolution du projet et pour ces longues discussions sur Cycline A et la PCP.

Merci aussi à nos étudiants de licences et master: Samya, Jad et Rym.

Forcément je voudrais remercier aussi toute la communauté drosophiliste. Et particulièrement les équipes du 5ème avec qui galette, rébus, pots, tangram et énigmes diverses ont égayés ces quatre ans. Merci à Clément, Laure, Frédérique, Jean-Michel, Stéphane, Delphine, Valérie et Valérie, Emmanuelle, Hélène, Antoine, ainsi que Bruno pour tous les high fives, (certains ont fait trembler les fenêtres, d'autres juste très mal aux mains) et Marco (t'as vu je suis gentille). Et surtout aux mouchinettes, avec qui on n'aura toujours pas bu cette bière. Mes hommages à Dilyana, à la princesse Disney Héloïse, à Mira et à Karine, à qui mon plus beau poème est dû.

Merci aussi au vrai binôme de TP Roman et à Ihab pour tous les débats.

Avec eux, on l'aura eu cette bière, merci à mes camarades de doctorat: à ma jolie Jenny (stay foxy), à ma chère Julie (réserve moi une place en Belgique qu'on se mange des frites), à Özge (stay foxy you too), à Sergi (fais attention aux messages vocaux), à mon double d'une autre vie Pénélope T., à Antoine D. (la PCP vaincra!), à Antoine L. (petit café?), à Pauline (ou petit Mõlkky?), à Morgane, au club des Docs et à tout ce que j'oublie avec qui j'ai discuté sur la passerelle ou en terrasse. D'ailleurs, j'ai failli oublier, merci Tommy.

Un merci tout particulier à ceux qui ont fait la réussite de co-immunoprécipitation qui aura été un sacerdoce. Encore une fois merci Delphine pour les conseils et pour ne plus partir en courant quand tu me vois arriver. Merci aussi à Bruno pour le matériel. Et merci à Aude pour la prescription du docteur qui a tout changé.

Je voudrais aussi remercier ma famille pour m'avoir soutenu et affiché mon poster sur le frigo. Même à toi Alix, qui n'y pige rien du tout.

Aussi je voudrais remercier mes amies Alice, Lucile, Aylina, Constance, Hind, Lola, Léa, Mona et Mono pour avoir enfin compris que je travaillais sur les poils de DOS de la mouche. Ce n'est pas faute de vous le dire à chaque fois. Je vous aime quand même. Et je voudrais aussi remercier mes camarades de confinement Alan et Eugenia avec qui on a partagé une aventure inouïe.

Et surtout, merci les mouches.



Table des matières

Table des figures	7
Liste des abréviations	8
INTRODUCTION	8
0. Préambule	10
1. Le cycle cellulaire	11
1.1. Les couples CDK/Cycline: activation et désactivation	11
1.1.1. Les CDK	13
1.1.2. Les Cyclines	15
1.2. Les phases du cycle cellulaire	16
1.2.1. Préparation à la division: l'interphase	17
1.1.1. Mitose	19
1.1.1.1. Prophase	19
1.1.1.2. Prométaphase & Métaphase	19
1.1.1.3. Anaphase	20
1.1.1.4. Télophase & Cytodiérèse	20
1.2. Cycline A, la meilleure des cyclines	20
1.2.1. Rôle canonique de Cycline A dans la prolifération cellulaire	20
1.2.1.1. Structure de Cycline A et comparaison entre espèces	20
1.2.1.2. Localisations intracellulaires	22
1.2.1.3. Régulation spécifique par l'APC/C	23
1.2.1.4. Rôle canonique dans la progression du cycle cellulaire	23
1.2.2. Rôles non canoniques	24
2. La Polarité Cellulaire Planaire	27
2.1. Notions sur la polarité cellulaire	27
2.1.1. Les protéines PAR	29
2.1.2. Modules de la polarité A/B	31
2.2. La Polarité Cellulaire Planaire	32
2.2.1. Voie Wnt et PCP	34
2.2.2. La PCP canonique: Frizzled core groupe	36
2.2.2.1. Frizzled	36

2.2.2.2.	Dishevelled	38
2.2.2.3.	Diego	40
2.2.2.4.	Van Gogh/Strabismus (Starry Night) & Prickle/Spiny Legs	40
2.2.2.5.	Flamingo/Ceslr1	41
2.2.2.6.	Furrowed	41
2.2.2.7.	Meru	41
2.2.3.	La voie PCP non canonique: Fat/Dachsous	42
2.2.3.1.	Fat & Dachsous	42
2.2.3.2.	Fourjointed (Fj) & Dachs (D)	44
2.2.4.	Mise en place de la PCP et amplification	44
2.2.5.	Les effecteurs de la voie PCP	45
2.2.6.	La PCP dans la migration des cellules	46
3.	La Division Asymétrique	47
3.1.	Génération de la diversité	47
3.2.	Modèles de divisions asymétriques	47
3.2.1.	Nématode	47
3.2.2.	Vertébrés	50
3.2.3.	<i>Drosophila melanogaster</i>	52
3.3.	Le modèle du lignage des soies de la drosophile	56
3.3.1.	Lignage cellulaire	56
3.3.2.	Mise en place des identités cellulaires	57
3.3.3.	Orientation des divisions du lignage	59
4.	Orientation du fuseau mitotique	63
4.1.	L'orientation des divisions au sein des épithélia	63
4.1.1.	Structure et fonction	63
4.1.2.	Orientations de divisions au sein des épithélia	65
4.2.	Mécanismes moléculaires régulant l'orientation du fuseau mitotique	68
4.2.1.	Contrôle de la division par les centrosomes et microtubules	68
4.2.2.	Acteurs du fuseau	70
4.2.2.1.	NuMA/Mud/Lin-5	70
4.2.2.2.	Dynéine/Dynactine	73
4.2.2.3.	Les protéines G & Pins & Disc Large	73
4.2.2.4.	Canoë/Afadin	75

4.3. Telophase rescue	75
5. Objectifs de thèse	78
RESULTATS	78
Article	79
Résultats supplémentaires:	116
-Cycline A dans la division de pIIa	116
-Redondance partielle avec Frizzled	124
-Recherche de gènes candidats	127
-Cycline A2 au cortex des cellules vertébrés	132
DISCUSSION & PERSPECTIVES	136
REFERENCES	147
RESUME & ABSTRACT	159

Table des figures

1. Le Cycle cellulaire	12
2. Mécanisme de régulation du complexe CDK1/Cycline B	14
3. Phase de la mitose	18
4. Structure et comparaison des séquences de Cycline A entre espèces	21
5. Mise en place et maintenance de la polarité par les protéines PAR	28
6. Les modules de polarité apico/basale	30
7. Phénotypes associés à la perte de fonction <i>Frizzled</i> , acteur majeur de la PCP	33
8. La voie WNT	35
9. Localisation des facteurs de la voie PCP canonique au sein d'une cellule épithéliale	37
10. Interaction entre <i>Frizzled</i> et <i>Dishevelled</i>	39
11. La voie de la Polarité Cellulaire Planaire non canonique	43
12. Principe de la division asymétrique	48
13. Lignage cellulaire de l'embryon <i>C. elegans</i>	49
14. Stratification de l'épithélium épidermique	51
15. Divisions asymétrique chez la <i>Drosophile</i> : Neuroblastes et cellules souches germinales	53
16. Lignage cellulaire aboutissant à la formation des soies mécanosensorielles de la <i>drosophile</i>	55
17. Voie de signalisation Notch	58
18. Analyse de l'orientation de pI	61
19. Différents types d'épithélia	64
20. Neurogénèse des vertébrés	66
21. Le fuseau mitotique en métaphase	69
22. La protéine NuMA et ses homologues	71
23. Evolution du modèle d'accrochage du fuseau au cortex par Pins	76
24. Cycline A se localise au cortex apical postérieur de pI	79
25. Cycline A corticale dans la division de pIIa	117
26. Temps de divisions de pIIa	119
27. Lien entre les angles de divisions de pI et pIIa	121
28. Analyse du pied de Cadherine dans la division de pIIa	122
29. Redondance partielle entre les phénotypes <i>frizzled</i> et <i>cycline A</i>	125
30. Recherche de candidats	128
31. Cycline A2 au cortex des cellules mammifères	133
32. Modèle proposé	143

Liste des abréviations

ACD: Division cellulaire asymétrique

APC/C: Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

APF: after puparium formation

aPKC: atypical protein kinase C

Baz: Bazooka

BRAT: Brain tumor protein

BrDU: Bromodésoxyuridine

CAK: CDK-activating kinases

CBD: cyclin box domain

Cdc: cell division cycle

Cdk: Cyclin Dependant Kinase

CDR: Cystein rich domain

Cno: Canoe

Crb: Crumbs

CycA/CYA-1: Cycline A

D: Dachs

D-BOX: destruction box

Dgo: Diego

Dlg: Disc Large

Dpp: Decapentaplegic

Ds: Dachsous

Dsh/Dvl: Dishevelled

Fmi: Flamingo

Fj: Four Jointed

Ft: Fat

Frtz: Fritz

Fy: Fuzzy

GFP: Green Fluorescent Protein

Gmc: Ganglion Mother Cell

GPCR: G protein-coupled receptors

Grhl: Grainy head

GSC: Cellule Souche Germinale

In: Inturned

Lgl: Lethal Giant Larvae

MPF: Mitosis Promoting Factor

MTOC: Microtubule Organizing Center

Mwh: multiple hair wing

NCID et **NECD**: Notch intracellular domain et Notch extracellular domain

NEBD: Nuclear envelope breakdown

NLM: NuMA related proteins domains

NuMA/Mud: Nuclear Mitotic Apparatus / mushroom body defects

PAR: partitioning defects

pI, pIIa, pIIb, pIIIb: Précurseur I, IIa, IIb, IIIb

PCP: Planar Cell Polarity/ Polarité Cellulaire Planaire

Pins: Partner of Inscuteable

Pk & Pk-Sple: prickle prickle/spiny legs

PLK: Polo like kinase

PON: Partner of Numb

PPE: Planar Polarity Effectors

Rb: Rétinoblastome

SAC: spindle assembly checkpoint

Sas-4: Spindle assembly abnormal protein

SCF: Skp1, Cullin, F-box

Scrib: Scribble

SHH: Sonic Hedgehog

SPB: Spindle Pole Body

Su(h): Suppressor of hairless

TARA: TARANIS

Vangl: Van Gogh

WNT: Wint

INTRODUCTION

0. Préambule

“Living systems are never in equilibrium. They are inherently unstable. They may seem stable, but they’re not. Everything is moving and changing. In a sense, everything is on the edge of collapse.” (Crichton 1990)

Avant de rentrer dans le vif du sujet, je me dois de vous donner des indications concernant mon rapport à la biologie et à son étude. Comme le dit Crichton ci dessus, ce que nous étudions est en constante motion. Rien n’est vraiment distinct et tout s’interconnecte et se défait même en se mettant dans un contexte cellulaire singulier. Ce qui fait que la Biologie est la science de l’Exception: ce que l’on observe dans une cellule n’est pas forcément applicable à sa voisine, une protéine peut faire une chose à un moment “t” et son contraire l’instant d’après et, cela dépendamment du contexte. Cela découle du fait que les lois gouvernant le vivant nous sont intraduisibles et tout ce que nous pouvons faire en tant que scientifiques et humains, est d’essayer de décortiquer le fonctionnement du vivant à travers le trou de serrure que nous donnent nos outils de travail. Dans cet ouvrage, j’ai essayé de faire la part des choses, à mon échelle sur l’étude des liens entre grands phénomènes du développement que sont le cycle, la polarité et l’identité cellulaire.

Cette étude repose sur un rôle encore inconnu à ce jour d’un acteur majeur du cycle cellulaire, la Cycline A dans la polarité cellulaire. Nos données montrent son interaction avec les acteurs de la Polarité Cellulaire Planaire, Frizzled et Dishevelled. Tout cela dans le but de contrôler l’orientation de la division asymétrique au sein des organes mécanosensoriels chez *Drosophila melanogaster*.

Dans un premier temps, le cycle cellulaire et sa régulation, la mise en place des polarités cellulaires, la description de leur rencontre lors d’une division asymétrique ainsi que les mécanismes moléculaires de l’orientation des divisions seront décrits dans ce manuscrit. Dans un second temps, les détails de mes recherches seront développés suivis dans un troisième et dernier temps, d’une discussion sur ses travaux et des perspectives qui en découlent.

1. Le cycle cellulaire

“Life is made out of cells

Cells make copies of themselves (copies of themselves)

And they make copies of themselves (and they make copies of themselves)

And they make copies of themselves” - They Might Be Giants (2009)

Le groupe New Yorkais “They Might Be Giants” introduit la notion basique selon laquelle le développement des organismes pluricellulaires débute par la génération d’un grand nombre de cellules à partir d’une première cellule totipotente et, qu’ensuite chacune de ces cellules acquièrent sa propre identité.

Cette première étape correspond à la prolifération cellulaire et repose sur un cahier des charges spécifique. De façon générale, pour y répondre, la cellule va passer par les quatre phases du cycle cellulaire. Chacune des phases est caractérisée par des événements précis: la croissance de la cellule (G1), la réplication de son matériel génétique et, une partie de son contenu cytoplasmique (S) ainsi que la vérification de la bonne réplication de l’ADN (G2) pour enfin finir par la division physique de la cellule mère en deux cellules filles (M) (**Figure 1**). Une ou bien les deux cellules filles, peuvent ensuite à leur tour entrer dans le cycle cellulaire et générer d’autres cellules. La transition entre chacune des phases du cycle nécessite le passage de checkpoints moléculaires (système de surveillance de la bonne exécution de chaque phase pour autoriser la transition vers la phase suivante, Morgan 2008). Ainsi, le point de restriction en G1 suivi de la transition G1/S, est généralement considéré comme l’entrée dans le cycle cellulaire, le point de contrôle G2/M définit l’entrée en mitose, et la transition métaphase-anaphase autorise la sortie de mitose. Le passage de ces checkpoints dépend de mécanismes moléculaires précis décrits par la suite.

1.1. Les couples CDK/Cycline: activation et désactivation

Chaque phase du cycle est caractérisée par un complexe constitué de deux protéines: les *Cyclins Dependant Kinases* ou CDK et leur sous unités régulatrices, les cyclines. L’activité kinase des CDK n’est possible que lorsque le complexe est formé. À chaque phase un ou plusieurs nouveaux complexes sont formés en fonction de la présence spécifique des cyclines, qui participent à l’activation des CDK, puis à la fin de la phase les cyclines sont brusquement dégradées pour inactiver le complexe. Ceci se fait dans un ordre précis. L’assemblage et l’activation des complexes CDK/Cyclines sont donc l’un des événements majeurs moléculaires qui régule la progression du cycle cellulaire.

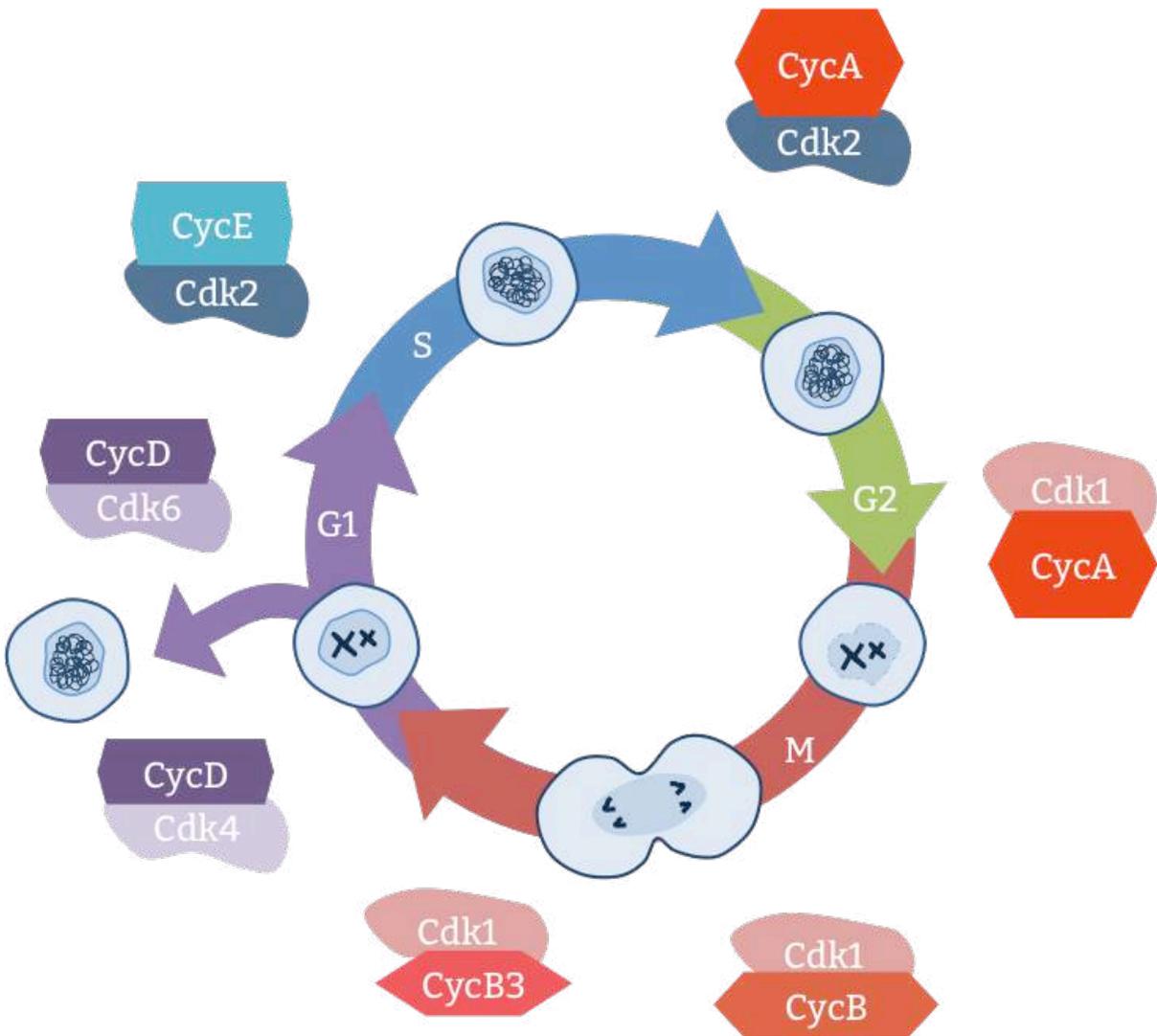


Figure 1: Le cycle cellulaire : Représentation des quatre phases du cycle cellulaire et des complexes CDK/Cycline spécifique permettant la progression dans chaque phase et la transition entre chaque phase. En phase G1, le complexe CDK4/6/Cycline D permet l'entrée irréversible dans le cycle. Entre G1/S, c'est le complexe CDK2/Cycline E. La progression en phase S est sous le contrôle du complexe CDK2/Cycline A. La transition G2/M se fait grâce à CDK1/Cycline A. La phase M (mitose) requiert plusieurs complexes : CDK1/Cycline B puis, CDK1/Cycline B3 pour la sortie de Mitose.

1.1.1. Les CDK

Les CDK sont des sérine-thréonine kinases très conservées entre les espèces, de tailles similaires autour de 30 à 40 kDa. Au cours du cycle cellulaire, les CDK sont en quantité constante dans la cellule. L'analyse cristallographique de CDK2 en 1995 a permis de mettre en évidence leur structure commune avec un petit lobe en N-terminal et un grand lobe en C-terminal (Jeffrey et al, 1995). Le grand lobe contient le domaine PSTAIRE commun à toutes les CDK. Les deux lobes sont reliés par deux sous régions: la P-Loop qui contient un site de liaison à l'ATP et la T-loop qui est la boucle d'activation. Lors de l'activation des CDK, un changement de conformation se produit via l'association des cyclines qui conduit à la rotation du domaine PSTAIRE et au déplacement de la T-loop permettant l'accès au site actif de la kinase et aux acides aminés impliqués dans sa régulation. Les CDK activées vont alors reconnaître spécifiquement des séquences consensus et phosphoryler spécifiquement une sérine ou une thréonine, présentes dans les protéines cibles (Rhind et Russell, 2012).

Le processus d'activation des CDK se fait donc dans un premier temps par la formation d'un complexe avec une cycline, ce qui induit leur activation partielle. L'activité du complexe dépend dans un deuxième temps d'étapes de phosphorylation et de déphosphorylation. La première étape est une phosphorylation dite « activatrice » par des enzymes appelées CAK (CDK-activating kinases). Chez les vertébrés et chez la mouche, les CAK sont trimériques formées de CDK7, Cycline H et Mat1 alors que chez la levure, c'est une simple protéine au nom singulier de Cak1. Cette phosphorylation activatrice se fait sur la Thréonine 161 pour CDK1 et Thréonine 160 pour CDK2. L'activation des CDK requiert aussi des déphosphorylations activatrices régulées par la famille des phosphatases Cdc25 (String et Twine chez la drosophile et, Cdc25 A à C chez vertébrés) sur la Tyrosine 15 (site commun à toutes les CDK) et sur la Thréonine 14 (commun aux animaux). Au préalable, ces résidus sont phosphorylés par les kinases Wee1 et Myt1 afin de maintenir le complexe inactif. Il est à noter que l'inactivation des complexes CDK/Cycline est aussi régulée par des protéines appelées CKi (Rum1, Sic1, dacapo, p16, p21, p27).

L'activation de CDK1 (Cdc2 chez la levure), une CDK mitotique avec une de ses cyclines partenaires Cycline B est bien décrite et illustre cet enchaînement de phosphorylation/déphosphorylation qui permet de la transition rapide du complexe de son état inactif vers un état actif (**Figure 2**). Cette activation rapide fonctionne comme un switch permettant une entrée rapide et irréversible en phase-M. Elle ne passe pas par la quantité élevée de CDK1 dans la cellule, ou par la forte affinité avec Cycline B. Dans un premier temps, le complexe CDK1/Cycline B se forme puis dans un second temps est activé par Cdc25 qui élimine les phosphorylations inhibitrices de Wee1/Myt1 (Morgan 2007). Ensuite le complexe CDK1/Cycline B a, entre-autre, pour cibles Wee1/Myt1 et Cdc25 induisant ainsi une boucle d'auto-amplification du complexe en inhibant le premier et activant massivement le deuxième. Les complexes CDK/Cycline régulent eux-mêmes les facteurs qui les activent et qui les désactivent.

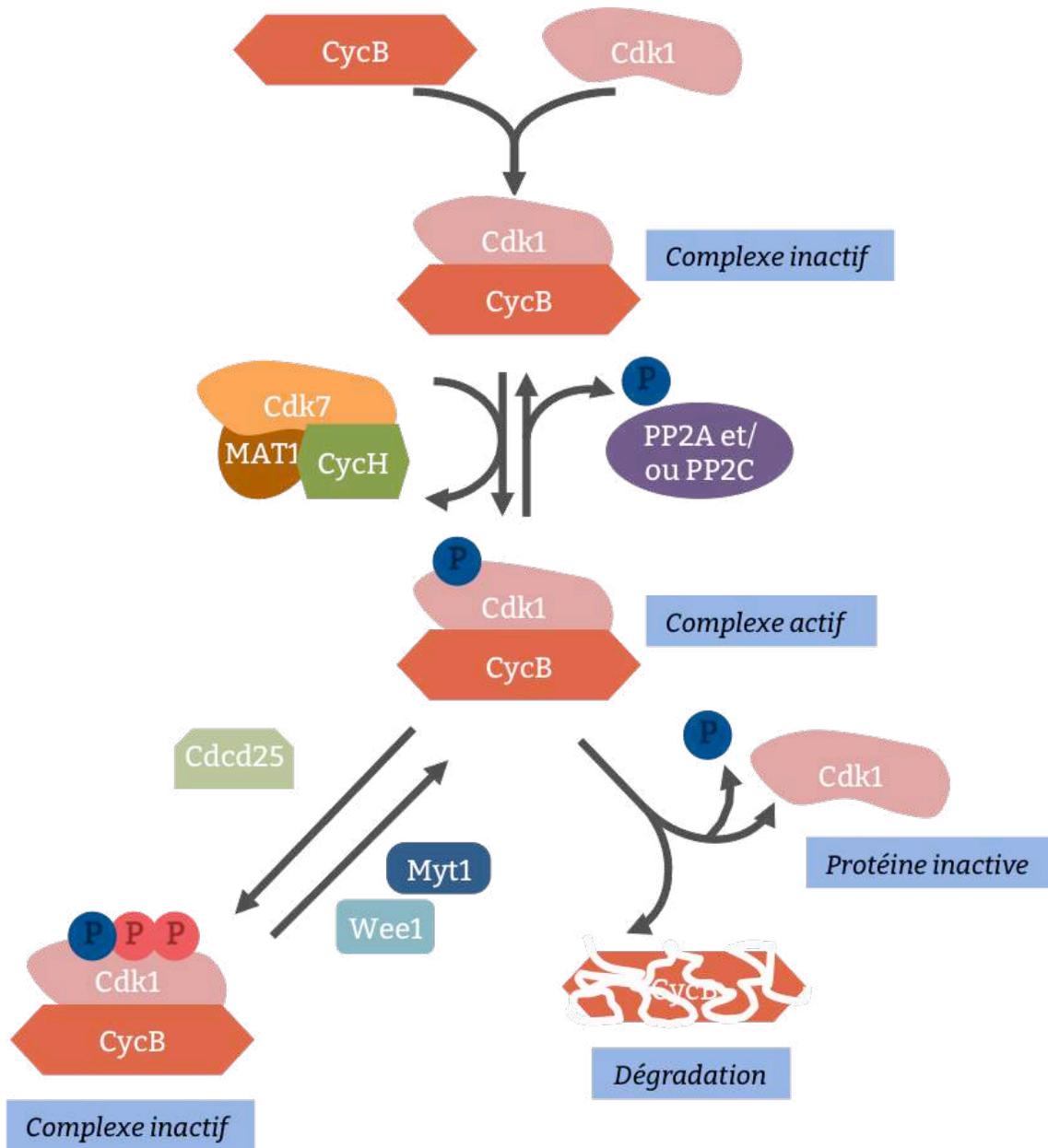


Figure 2: Mécanisme de régulation du complexe CDK1/Cycline B En premier, Cycline B et CDK1 s'associent ce qui active partiellement le complexe. Ensuite le complexe CAK formé de CDK7/Cycline H/MAT1 phosphoryle le complexe pour l'activer sur la Tyr161 (bleue) et PP2A. Le complexe est maintenant inactif par deux phosphorylations inhibitrices (rouges) sur les résidus thréonine 14 et Tyrosine par les kinases MYT1 et Wee1 respectivement. L'activation du complexe est assurée par la déphosphorylation de ces deux phosphorylations par la phosphatase CDC25. Le complexe est désactivé, via la dégradation de la Cycline B par le complexe APC/C. *Adapté de Pipparelli 2010.*

Chez les vertébrés, toutes les CDK, n'ont pas forcément un rôle dans le cycle cellulaire: seules quatre sont impliquées dans l'avancement du cycle cellulaire (CDK 1,2,4 et 6), CDK7 est importante pour l'entrée dans le cycle mais uniquement pour activer les autres couples CDK/Cyclines et CDK 8, 9 ont été montrées pour avoir des rôles dans la transcription et enfin CDK5 est impliquée dans la différenciation des cellules nerveuses (Morgan 2007). Il est intéressant de noter que chez la levure, une seule CDK coordonne la progression de la cellule dans le cycle cellulaire (Cdc2 chez *Schizosaccharomyces pombe* et Cdc28 chez *Saccharomyces cerevisiae*). Il est aussi important de préciser que dans la régulation du cycle cellulaire, d'autres kinases non couplées à des cyclines mais régulées par les activités CDK/Cyclines existent: ces enzymes sont par exemple les kinases Polo (Plk) et Aurora.

1.1.2. Les cyclines

Les cyclines, décrites par Tim Hunt en 1983, ont des niveaux d'expression qui oscillent au cours des phases du cycle cellulaire. Elles sont aussi assez conservées entre espèces mais ne possèdent pas de structure uniforme. Par contre, elles possèdent un domaine commun, nommé Cyclin Box Domain (CBD) qui a été identifié suite à l'alignement des séquences des Cycline A et B. Il se caractérise par une séquence d'une centaine d'acides aminés qui permet l'interaction des cyclines avec une CDK à la fois. Dans la grande famille des cyclines, certaines possèdent plusieurs CBD comme la Cycline A2 des vertébrés (CCNA2). Ils ont été identifiés par cristallographie, dans la région C-terminale de la protéine et ils fonctionnent en tandem (Tatum et Endicott 2020). De la même façon que pour les CDK, beaucoup de cyclines ou "cyclin like" ont été identifiées et regroupées en plusieurs groupes. Le groupe I contenant les cyclines A, B, C, D et E rassemble les cyclines directement impliquées dans l'avancement du cycle cellulaire (Tatum et Endicott 2020). Le groupe II correspond aux partenaires de CDK5 et le groupe III, aux cyclines impliquées dans la régulation de la transcription et de la traduction.

Les complexes CDK/Cyclines sont prédits pour être interchangeable et sont très stables après formation. La régulation des cyclines durant le cycle cellulaire constitue donc un aspect fondamental de la régulation du cycle cellulaire. Pour se faire, d'une part leur quantité est régulée de façon oscillatoire via la modification de leur expression génique et d'autre part du fait de leur dégradation abrupte et spécifique par protéolyse (Pine 1995). Ces protéines sont ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. L'ubiquitination des protéines est un processus séquentiel faisant intervenir trois enzymes nommées E1, E2 et E3 ubiquitine ligases (Peters, 2002). Au départ, l'ubiquitine est liée de manière covalente dans le site actif de l'ubiquitine ligase E1. Cette réaction nécessite de l'ATP. L'interaction, de l'ubiquitine ligase E1 avec l'ubiquitine ligase permet de transférer l'ubiquitine sur l'ubiquitine ligase E2. Enfin, l'ubiquitine ligase E3 va catalyser le transfert successif de plusieurs ubiquitines depuis l'ubiquitine ligase E2 vers un résidu lysine de la protéine cible. Ces motifs d'ubiquitylation vont ensuite être reconnus pour cibler la dégradation de la protéine par le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1998, Pickart et al., 2001). Au cours du cycle cellulaire, deux complexes multi-protéiques portent

l'activité ubiquitine ligase E3 principale responsable de la spécificité de la cible. Le complexe SCF (Skp1, Cullin, F-box) occupe un rôle crucial lors de la transition G1/S où il dégrade les Cyclines D et E alors que le complexe APC/C (Anaphase promoting complex/cyclosome) est indispensable à la transition métaphase-anaphase ainsi qu'à la sortie de mitose où il est impliqué dans la dégradation des cyclines mitotiques. Bien que le SCF et l'APC/C appartiennent à la même famille de protéines, leurs mécanismes de reconnaissance du substrat et la régulation de leur activité enzymatique restent distinctes.

Les cyclines sont spécifiques des phases du cycle. Celles qui sont actives durant la phase G1 (Cln3 chez *S. cerevisiae*, Cycline D chez les vertébrés et la drosophile) permettent la coordination entre la croissance et l'entrée des cellules quiescentes dans le cycle cellulaire. Ces cyclines G1 ne présentent pas d'oscillation au cours du cycle mais ont la caractéristique d'avoir une concentration qui augmente progressivement dans les cellules en réponse au signal de croissance.

Les cyclines G1/S (Cln1 et Cln2 chez *S. cerevisiae*, Cycline E chez les vertébrés ainsi que chez la drosophile) s'accumulent lors de la phase G1 tardive et disparaissent en phase S précoce, et déclenchent la réplication. Les cyclines G1/S permettent également de déclencher d'autres événements tels que la duplication des centrosomes chez les vertébrés ou de leurs équivalents chez la levure, les SPB (Spindle Pole Body, Simons et al, 2008).

La disparition des cyclines G1/S est accompagnée par l'accumulation des cyclines S (Clb5 et Clb6 chez *S. cerevisiae*, Cycline A chez les vertébrés et la drosophile) qui permettent la progression de la réplication. La concentration de ces cyclines reste élevée tout au long de la phase S et peut persister jusqu'en G2 et en phase M précoce où elles contrôlent des processus mitotiques précoces dans certains types cellulaires.

Les cyclines mitotiques, ou Cyclines M (Clb1, 2, 3 et 4 chez *S. cerevisiae*, Cycline A et Cycline B chez les vertébrés et la drosophile, ainsi que la Cycline B3) s'accumulent quant à elles en G2 tardive et présentent un pic de concentration en fin de G2. L'activité CDK/Cycline M est responsable de modifications drastiques de la dynamique cellulaire permettant la condensation des chromosomes, l'assemblage du fuseau mitotique, ou encore l'alignement des chromosomes en métaphase. Enfin, la destruction des cyclines M permet la sortie de mitose ainsi que la cytotéiérèse (Echard et al, 2008).

En s'associant avec une ou une autre CDK au cours du cycle cellulaire, les complexes CDK/Cycline vont être spécifiques aux différentes phases du cycle cellulaire décrites dans la partie suivante.

1.2. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire (**Figure 1**) est une succession d'étapes permettant, à une cellule mère, de se diviser pour donner naissance à deux cellules filles. Une fois formée, chaque cellule peut à son tour effectuer un nouveau cycle ce qui constitue la base de la prolifération cellulaire. La durée du cycle cellulaire dépend des organismes et même des types cellulaires. Par exemple, durant le développement, les cellules peuvent se diviser

rapidement en sautant les étapes de phases G1 et G2 comme dans le syncytium de la drosophile et d'autres cellules comme les blastomères d'embryon de xénope avant fécondation ou encore les précurseurs neuraux qui peuvent patienter en G2 plusieurs heures durant.

Le cycle cellulaire est classiquement divisé en deux étapes distinctes, l'interphase comprenant les phases G1, S, G2 et la Mitose, phase M. Pour autant, il est important de noter que lorsque les cellules quittent l'état de quiescence aussi appelé G0 et entrent dans le cycle cellulaire poussée par des facteurs mitogènes et de croissance, l'événement est irréversible. Elles se diviseront, sauf si les checkpoints ne sont pas validés et que les mécanismes de réparation ne peuvent rétablir la situation. Dans ce cas, la progression du cycle cellulaire s'arrêtera et les cellules entreront en apoptose. En effet, le franchissement des points de contrôle fait intervenir deux mécanismes: l'un pour réparer les anomalies de l'ADN et l'autre pour inhiber les couples CDK/Cyclines.

1.2.1. Préparation à la division: l'interphase

La Gap phase 1 (G1) correspond à la première phase du cycle. Cette phase est caractérisée par une transcription active et une synthèse protéique soutenue qui aboutit à une expansion de la cellule jusqu'à une taille critique. Au niveau des régulateurs du cycle cellulaire, les couples CDK4 et 6/Cycline D sous l'action de CDK7/Cycline H/Mat1 (le CAK) (Morgan 2007) conduisent la cellule tout au long de la G1 et leur activation permet de franchir le point de restriction. Le complexe actif induit la phosphorylation des protéines de la famille du rétinoblastome Rb, ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription E2F1. Celui-ci, à son tour induit la transcription de la Cycline E et de facteurs de réplication. La transition entre la G1 et la phase S dépend du complexe CDK2/Cycline E (Lim et Kaldis 2013) qui continue à phosphoryler Rb/E2F pour soutenir la mise en place de la réplication (phosphorylation par exemple de Cdc45 pour amorcer la synthèse de l'ADN polymérase).

La phase S correspond à la réplication du matériel génétique et des centrioles. Le centrosome, centre de nucléation des microtubules qui pour l'instant n'en avait que deux, en compte maintenant quatre qui se positionneront deux par deux autour du noyau en vue de former le fuseau mitotique. L'ADN passe d'une à deux chromatides, les ARNm codant pour les histones sont produits en grande quantité. C'est le complexe CDK2/Cycline A qui est le complexe moteur de la progression lors de la phase S (levée de l'inhibition de Cdc25A sur CDK2 si aucun de dommage à l'ADN n'est détecté). Il intervient aussi pour la vérification de l'intégrité de réplication de l'ADN accompagné par les kinases Plk1 et Aurora A avant l'entrée en mitose (Morgan 2007).

La Gap phase 2 (G2) correspond à une deuxième phase de croissance pour la cellule et à la préparation de la mitose. Ainsi, l'entrée en mitose est initiée par le complexe CDK1/Cycline A. Ce complexe se forme en fin de G2 et participe à l'activation du complexe CDK1/Cycline B qui historiquement constitue ce que l'on appelle le M-phase Promoting Factor, le MPF et est essentiel pour l'entrée en phase M.

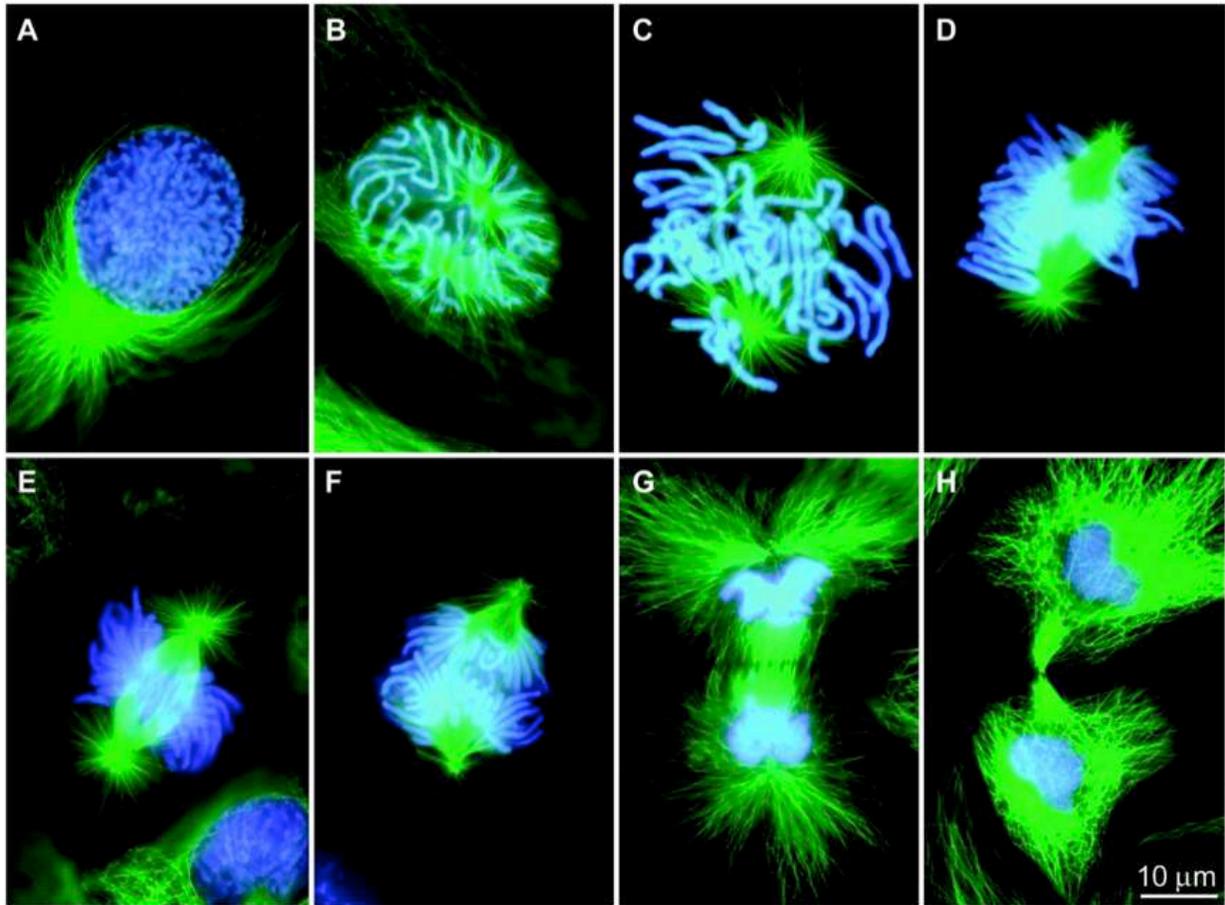


Figure 3: Phase de la mitose : Cellules de salamandre en division marquées pour les microtubules (vert), et l'ADN par le Hoechst (bleu). **A)** Interphase **B)** prophase **C)** Prométaphase **D)** Métaphase **E)** Anaphase A **F)** Anaphase B **G)** Télaphase **H)** Cytodiérèse. Adapté de Rieder et Khodjakov 2003.

Cycline A avec CDK1 activent le MPF en promouvant l'action des kinases PLK1 et Aurora A (avec son partenaire Bora) pour activer la phosphatase Cdc25 et la kinase Greatwall et, en inhibant la kinase Wee1 (Potapova et al 2011, Vigneron et al, 2018). La phosphorylation inhibitrice de CDK1/Cycline B par Myt1 est aussi levée par l'inactivation de la kinase par le complexe mitotique et l'activation sur le résidu Thréonine 161 dépend toujours de la kinase CAK. Ce complexe CDK1/Cycline B a été décrit chez le xénope comme celui qui induit l'entrée en mitose et induit sa boucle d'auto-amplification pour aller ensuite phosphoryler tous les substrats mitotiques en parallèle de l'activation de Greatwall qui active ses substrats ARP19 et ENSA par phosphorylation pour inhiber PP2A-B55, l'antagoniste majeure de CDK1 (Ferrell J. E., Jr et al 2005.).

1.1.1. Mitose

La mitose correspond à la dernière étape du cycle cellulaire et rassemble les événements de séparation des matériels génétique et cellulaire entre les deux cellules filles. Elle se décompose en plusieurs étapes caractérisées par l'analyse cytologique du comportement de l'ADN dans la cellule (**Figure 3**).

1.1.1.1. Prophase

L'ADN dupliqué mais encore jusqu'ici décondensé va alors commencer à se condenser permettant la visualisation des chromosomes, et les deux chromatides, encore indiscernables, sont liées aux kinétochores par des cohésines. Les complexes CDK1/Cycline B actifs sont importés dans le noyau où ils participent à la condensation de l'ADN en phosphorylant en parallèle d'Aurora B (Tyler 2016), les histones H1 et H3 pour Aurora B ainsi que la Condensine. Les centrosomes, dupliqués en G1/S, vont commencer leur migration aux deux pôles de la cellule. Les complexes CDK1/Cycline A sont eux aussi importés dans le noyau avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD).

1.1.1.2. Prométaphase & Métaphase

La prométaphase, est un prélude où les lamines vont être phosphorylées conduisant à la déstabilisation de la lamina et donc à la désagrégation de l'enveloppe nucléaire en petites saccules. Le fuseau mitotique se met en place avec les microtubules kinétochoriens qui se déploient pour s'associer aux chromosomes via le kinétochore, les microtubules polaires qui relient les deux centrosomes et les microtubules astraux qui s'arriment au cortex de la cellule. Les chromatides deviennent discernables individuellement. La Cycline A est dégradée et, c'est le complexe CDK1/Cycline B qui favorise sa dégradation par l'activation du complexe APC/C. Ce complexe est requis pour la dégradation des facteurs de cycle, et au cours de celui-ci s'associe avec différentes sous-unités pour reconnaître séquentiellement ces cibles.

La métaphase en tant que telle se définit par l'alignement des chromosomes rigoureusement attachés par leurs kinétochores via les microtubules au centre de la cellule formant la plaque métaphasique. Le point de contrôle de la mitose, le SAC (spindle assembly checkpoint), est validé par l'attachement bipolaire des chromosomes pour

permettre la répartition des chromatides sœurs aux deux pôles de la cellule. L'APC/C ubiquitinyne la sécurine, ce qui conduit à leur dégradation et permet de libérer la séparase qui clive les cohésines, au préalable phosphorylées par PLK1 (Hauf et al, 2005). L'ensemble aboutit à la séparation des chromatides. En parallèle, la dégradation de la Cycline B est elle aussi induite par l'APC/C. Cela permet l'inhibition de l'activité de CDK1, autorisant ainsi la transition métaphase/anaphase et sortie de mitose.

1.1.1.3. *Anaphase*

Dans un premier temps, les deux lots de chromatides se séparent puis la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens favorise le transport du matériel génétique aux abords des centrosomes. Ensuite dans un second temps, les microtubules astraux retiennent les deux lots d'ADN aux deux pôles de la cellule alors que les microtubules polaires maintiennent la distance entre les deux centrosomes.

1.1.1.4. *Télophase & Cytodiérèse*

Les deux lots de matériel génétique sont bien séparés, les microtubules polaires arrêtent leur poussée. En absence d'activité du MPF, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. La cellule va commencer sa scission pour former ses deux cellules filles. Au centre de la cellule, un anneau contractile d'actine et de myosine se forme et permet de scinder la cellule en deux. L'inactivation du complexe CDK1/Cycline B est indispensable pour la cytokinèse car celui-ci inhibe la myosine. C'est le nouveau complexe formé de CDK1 et de la particulière Cycline B3 qui mène les deux cellules en dehors de la mitose. Ainsi à la fin de la mitose, deux cellules filles sont générées et peuvent à leur tour entrer aussi dans le cycle ou poursuivre leur différenciation. La Cycline B3 est la dernière à être dégradée par l'APC/C (Yuan et O'Farrell, 2015).

1.2. **Cycline A, la meilleure des cyclines**

Ce travail de thèse se centre sur un rôle inédit de Cycline A mais il convient dans un premier temps de la décrire dans son rôle canonique. Puis ensuite de décrire ses rôles en dehors du cycle qui lui ont été attribués ces dernières années, avant de révéler son rôle en lien avec la polarité cellulaire planaire dans la partie Résultats.

1.2.1. **Rôle canonique de Cycline A dans la prolifération cellulaire**

1.2.1.1. *Structure de Cycline A et comparaison entre espèces*

De façon générale, la Cycline A possède les domaines classiques retrouvés dans toutes les cyclines: deux domaines cyclin-box dans sa région C-terminale requis pour permettre son interaction avec les CDK et deux domaines de reconnaissance par l'APC/C permettant sa dégradation, une D-Box dite boîte de destruction et une KEN box, spécifique des cyclines mitotiques, localisées dans la région N-terminale de la protéine. En plus, elle possède un domaine nommé «box ABBA» qui serait impliqué aussi dans l'ubiquitylation, comme le sont la CRY-Box et l'O-box (Yamano 2019).

A

CycA2



Comparaison A1/A2	55 (75)		
	27 (47)	80 (95)	57 (80)
		67 (87)	
Comparaison A1/Drosophile	38 (66)		
	27 (56)	68 (91)	30 (62)
		48 (77)	
Comparaison A2/Drosophile	49 (78)		
	25 (53)	67 (91)	32 (67)
		50 (80)	

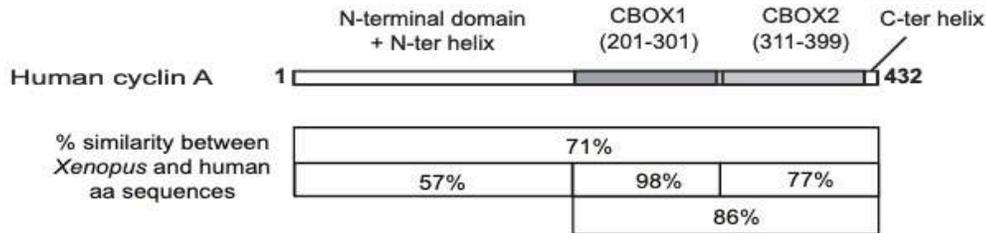
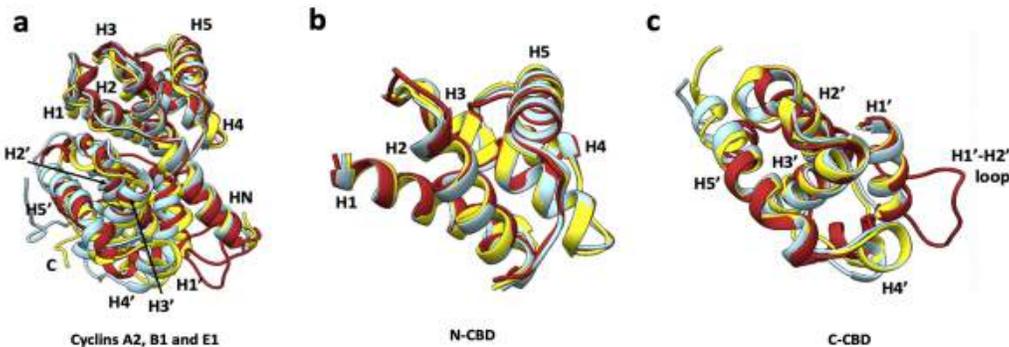
B**C**

Figure 4: Structure et comparaison des séquences de la Cycline A entre espèces **A)** Représentation schématique des domaines de la Cycline A2 de mammifères: les deux Cyclin Box sont à la suite dans la partie C-terminale et permettent l'interaction avec les CDK. Comparaisons entre les domaines des cyclines : le premier chiffre correspond à l'homologie et celui entre parenthèse à la similitude entre les séquences protéiques. Comparaison entre la séquence complète, le domaine N-term, C-Term et entre les CBD. Ceci pour les Cyclines A1/A2 mammifères, puis Cycline A1 mammifère et Cycline A drosophile et Cycline A2 et Cycline A drosophile. La Cycline A de drosophile est plus similaire à la Cycline A2 de mammifère que de la Cycline A1. **B)** Comparaison entre la Cycline A2 et la Cycline A du xénope. Les deux sont très similaires montrant la conservation entre les Cycline A. **C)** Superposition des structures tridimensionnelles de la Cycline A2, B1 et E1. Les Cyclines A2 (jaune) et B1 (bleue) ont une structure tertiaire très proche au niveau général, N-CBD et C-CBD alors que la Cycline E1 est différente (rouge). Adapté de Endicott 2020 et Pascreau et al, 2010.

Ces différentes boîtes lui confèrent une reconnaissance différentielle des autres cyclines mitotiques par le complexe APC/C, ce qui permet sa dégradation en fin de prophase de façon plus précoce que les autres cyclines mitotiques (Zhang 2019). Par ailleurs, elle présente aussi un domaine de localisation aux centrosomes indépendamment des CDK dans sa partie N-Terminale (Pascreau et al, 2010).

La première séquence identifiée de Cycline A fut chez la palourde (Swenson et al, 1986). Elle fut ensuite décrite chez la drosophile avant de l'être dans les autres espèces. Deux gènes codant la Cycline A ont été décrits chez le nématode et les vertébrés, contrairement à la drosophile où un seul gène est identifié. Pour autant, chez le nématode seule la CYA-1 est impliquée dans le cycle cellulaire, la protéine CYA-2 étant l'homologue de la Cycline P des mammifères. Chez les mammifères, les deux Cyclines A sont impliquées dans le cycle cellulaire mais CCNA2 l'est en mitose dans les cellules somatiques, alors que CCNA1 l'est en méiose et lors du développement précoce (Wolgemuth et al, 2004).

Chez les mammifères, les deux Cyclines A issues des gènes CCNA1 et CCNA2 présentent une grande homologie avec une similitude de 75% entre leurs séquences générales (**Figure 4A et B**): cette homologie est gardée entre les domaines CBD mais est moindre dans la partie N-terminale. Peu d'études portent sur CCNA1 pour justifier cette différence. Quand comparée à la Cycline A drosophile, il y a plus d'homologie entre la Cycline A2 qu'avec Cycline A1 mammalienne (78% contre 66%). Une homologie qui est presque identique entre la forme humaine et la forme du xénope. Ce qui suggère qu'il y a une très grande conservation de la séquence de Cyclines A au cours de l'évolution.

La **Figure 4C**, montre que les structures tridimensionnelles des Cyclines A et B mammifères sont très similaires. Quand comparée à Cycline B, la séquence de la Cycline A présente 30% d'homologie (Westendorf et al, 1989, Lehner et O'Farrell 1989 et 2008). Cette différence s'explique par le fait que Cycline B ne possède pas les mêmes domaines de dégradation que Cycline A et est donc reconnue différemment par l'APC/C (voir 1.3.1.3.). De plus, ces deux cyclines ne s'associent pas uniquement avec une même CDK: uniquement avec CDK1 pour Cycline B mais avec CDK1 et 2 pour Cycline A. Cycline E aussi s'associe avec CDK2 mais est assez différente de Cycline A due à une différence dans leurs séquences où les structures secondaires ne sont pas les mêmes dues à des différences d'acides aminés entre A/B et E (Brown et al, 2015).

1.2.1.2. *Localisations intracellulaires*

Cycline A interagit avec deux CDK au cours du cycle cellulaire: CDK2 lors de la transition S/G2 et avec CDK1 pour l'entrée en mitose. Elle est produite dès la fin de la phase G1 et s'accumule lors des phases S et G2. Cycline A est connue pour avoir une localisation intracellulaire changeante en fonction des phases du cycle cellulaire, elle est principalement cytoplasmique lors de l'interphase puis se restreint au noyau. À la rupture de l'enveloppe nucléaire lors de la prophase, elle redevient cytoplasmique avant sa dégradation totale. Pour autant de façon surprenante, sa localisation nucléaire n'est pas indispensable pour induire la mitose (Dienenman & Sprenger 2004). Cycline A se retrouve

aussi localisée sur des structures intracellulaires en étant associée ou non avec une CDK: elle se localise aux kinétochores pour réguler l'attachement des microtubules aux centrosomes via Plk1 (Dumitru et al, 2017) et, Cycline A se localise aussi avec CDK2 aux centrosomes avant l'entrée en mitose pour leur amplification (initiée par Cycline E, Hanashiro et al 2008).

1.2.1.3. Régulation spécifique par l'APC/C

Le complexe qui permet la dégradation de la Cycline A est l'APC/C qui comme précisé avant, est régulé différenciellement selon l'avancement du cycle. Dans un premier temps, il est associé à Cdc20 pour permettre la destruction de la Cycline A et de Nek2, puis sous la levée de l'inhibition de Mad2, l'APC/C^{Cdc20} entraîne la destruction des sécurines et de Cycline B pour induire la transition métaphase-anaphase après avoir passé les checkpoints nécessaires: en premier le Spindle Assembly Check (SAC) puis le mitotic checkpoint complex (MCC). Ensuite, l'APC/C se complexe avec Cdh1 pour continuer l'ubiquitinylation des autres substrats mitotiques (Zhou et al 2016).

Cycline A donc est présente dans la cellule durant toute l'interphase mais son accumulation ne commence vraiment que durant la phase G1 pour être critique à la fin de la phase S. Sa dégradation se déroule à la transition prophase/métaphase par le complexe APC/C^{Cdc20}. Comme expliquée avant, le fait que Cycline A possède d'autres boîtes de dégradation spécifiques reconnaissables par l'APC/C pour son ubiquitination lui confère une temporalité de dégradation différente des autres cyclines mitotiques (Endicott 2020). Zhang et al 2019 montre dans Cycline A qu'il y a une deuxième D-Box alors que Cycline B n'en possède qu'une, ce qui lui permet d'être spécifiquement reconnue par l'APC/C^{Cdh1}.

1.2.1.4. Rôle canonique dans la progression du cycle cellulaire

Lors de la progression de la phase S, associée à CDK2, Cycline A est impliquée dans le contrôle de la réplication de l'ADN. En effet, il a été montré que son expression ectopique dans des cellules de mammifère accélère l'entrée des cellules en phase S et qu'elle promeut la réplication dans des extraits de xénope (Rosenberg A. et al. 1995; Resnitzky D., Hengst L. and Reed S. I. 1995; Strausfeld U. P., 1996). Chez la drosophile, le complexe CDK2/Cycline A n'a jamais pu être mis en évidence de même qu'aucun phénotype de réplication n'est observé dans les embryons mutants Cycline A (Knoblich et al., 1994; Jacobs et al 1998). Toutefois, la surexpression de Cycline A dans des embryons mutants pour Cycline E est capable de déclencher la transition G1/S (Sprenger et al., 1997). De la même façon, l'expression ectopique de Cycline A dans le disque imaginal d'œil provoque l'incorporation ectopique de BrdU dans les photorécepteurs en cours de différenciation (Dong et al., 1997). De plus, son rôle dans la réplication a aussi été confirmé lors des phases d'endoréplication où elle contrôle la localisation des complexes de pré-réplication (Sallé, 2012). De nombreux substrats connus de la Cycline A sont des composants du mécanisme de réplication de l'ADN, dont le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC), CDC6 et le complexe protéique MCM qui doivent être assemblés sur la chromatine avant l'initiation de la réplication de l'ADN (Yamb et al, 2002). La

phosphorylation de CDC6 induit sa relocalisation du noyau au cytoplasme où il est détruit empêchant ainsi la formation d'autres complexes de réplifications (Coverley D., 2000, Petersen B. O., 1999).

Le rôle essentiel du complexe CDK1/Cycline A lors de l'entrée en mitose a été suggéré depuis longtemps chez la drosophile. En effet, la perte de fonction totale de Cycline A induit un arrêt de développement plus précoce des embryons (dû aux stock maternels) comparée aux autres cyclines, suggérant qu'elle est plus importante dans cet organisme pour l'entrée en mitose (O'Farrell 1989). Il est à noter que ni la Cycline B, ni la Cycline B3, les deux autres cyclines mitotiques, ne sont nécessaire pour l'entrée en mitose même si des divisions anormales sont observées en conditions doubles hétérozygotes (Jacobs et al, 1998). Récemment, cette fonction a été précisée par l'équipe de Thierry Lorca en 2018 en utilisant des extraits de xénope. Ainsi, ils ont montré que le complexe CDK1/Cycline A phosphorylait la protéine Bora, ce qui permettait l'activation d'Aurora A et de Plk1 pour activer Cdc25 qui lui-même active le complexe CDK1/Cycline B. Un défaut de Cycline A retient les embryons de xénope en G2 validant cette fonction (Fung et al 2007, Hégarat et al 2020, Vigneron et al 2018). Cette fonction vient d'être confirmée dans des cellules épithéliales humaines RPE-1, puisque la perte de Cycline A en phase G2 empêche l'entrée en mitose alors que les cellules dépourvues de Cycline B peuvent entrer en mitose et phosphoryler la plupart de ses substrats (Hégarat et al, 2020). Ceci confère au complexe CDK1/Cycline A le titre de facteur déclenchant l'entrée en mitose et nuance alors le propos qui considère plutôt que c'est la Cycline B qui est plus importante pour l'entrée en mitose.

1.2.2. Rôles non canoniques

Les rôles des cyclines indépendamment des CDK sont un champ de recherche émergent. Ainsi il a été montré que la Cycline D1 active (dans les myéloïdes) les récepteurs à l'androgène mais réprime ceux à l'estrogène. De plus, dans ces cellules, la Cycline D1 inhibe leur différenciation (Neuman et al 1997, Reutens et al, 2001). En ce qui concerne la Cycline A, quelques autres fonctions, en dehors de celle du cycle cellulaire, ont déjà été révélées et sont associées à des localisations intracellulaires particulières. Ces observations ont été faites dans différents organismes et de façon surprenante peuvent montrer une fonction de Cycline A indépendamment des CDK.

Chez la drosophile, l'équipe de Yukiko Yamashita (2012) met en exergue une localisation particulière de Cycline A, sans mention de CDK1, au spectrosome des cellules souches germinales (GSC) des drosophiles mâles en phase G2 en plus de sa localisation cytoplasmique et nucléaire (Lilly et Al, 2000). Cette localisation au spectrosome est dépendante de la protéine de polarité cellulaire PAR-1. L'expression d'une Cycline A portant un domaine de localisation nucléaire donc contrainte à une localisation nucléaire ainsi que celle d'une Cycline A dépourvue de son domaine d'interaction avec le spectrosome induisent des défauts d'orientation de fuseau mitotique. Ces données montrent que la localisation au spectrosome de Cycline A est requise pour contrôler l'orientation du fuseau mitotique des GSC. En 2016, il a été montré que l'homologue vertébré, CCNA2 interagissait aussi avec le cytosquelette dans des cellules en culture. Son

interaction avec l'actine se produit via l'interaction avec la petite GTPase RhoA et est visualisée par la présence de foci (agrégats compacts) en fin de métaphase après la dégradation de la Cycline A2 cytoplasmique (Loukil 2016). Cette interaction entre Cycline A2 et RhoA a aussi été montrée en GST pulldown. Ainsi, au-delà de sa dégradation, une sous-population de Cycline A2 colocalise avec le cytosquelette d'actine sous forme de foci et permet le recrutement de RhoA qui fait partie de la superfamille RAS de protéines régulant l'assemblage du cytosquelette. De plus, Arsic et al 2012 ont montré que dans des cellules NIH3T3 de souris, est que la perte de *cycline A* induit des changements morphologiques et une réorganisation du cytosquelette. Cet effet est montré pour être indépendant des CDK. La délétion de la partie N-Terminale de Cycline A (avant ses CBD) qui interagit avec RhoA, entraîne l'augmentation de la proportion active de RhoA et une motilité accrue des cellules ainsi qu'une augmentation de leur capacité d'invasion. Cela sous-entend un rôle pour Cycline A dans la migration des cellules.

Loin de leur fonction au sein du cycle cellulaire, il a été mis en évidence un rôle de Cycline A et de CDK1 dans la régulation du sommeil chez la drosophile. En effet, une réduction de la quantité de Cycline A dans les neurones retarde la transition veille-sommeil et provoque de multiples éveils (Rogulja et al 2012). Depuis, il a aussi été montré que Cycline A interagit avec la protéine TARANIS, l'homologue de la protéine Trip-Br (SERTAD) qui est un co-régulateur transcriptionnel connu pour son rôle dans le contrôle du sommeil. Ainsi, TARANIS contrôle la longueur du temps de sommeil en régulant les niveaux de Cycline A et en inhibant l'activité de Cdk1 dans les neurones de la pars lateralis un nouveau centre d'éveil (Afonso et al, 2015). Cycline E a aussi été décrite pour réguler le sommeil chez la souris ainsi que la mémoire, tout comme CCNA2, qui a été montrée pour s'associer avec des granules de rRNA dans les dendrites de l'hippocampe des souris vieillissantes (Alves et al, 2019). Son rôle non canonique ici, s'illustre par l'accumulation significative de granules ribosomiques et une perte de densité synaptique suite à la perte de fonction de Cycline A dans les neurones matures. Le phénotype se traduit par des déficits d'apprentissage et de mémoire. Pour finir sur les rôles non canoniques de Cycline A, il a aussi été montré que CCNA2 s'associe à la région 3'UTR des ARNm du gène *Mre11* qui code une protéine impliquée dans la recombinaison homologue pour promouvoir sa traduction (Kanakkanthara et al, 2016).

L'identification de ces rôles non canoniques de la Cycline A montre que nous ne connaissons pas toujours bien des protéines dont les fonctions semblaient bien acquises et décrites. Par exemple, CDC25B a été montré pour réguler la neurogenèse chez le poulet puis chez la souris par l'équipe de Fabienne Pituello (Peco et al, 2012 et Bonnet et al, 2018) où CDC25B, en dehors de CDK1, régule le mode de division des progéniteurs neuraux. Il est important de noter que les rôles non canoniques des facteurs de cycle sont de plus en plus étudiés. Ainsi, la Cycline D est particulièrement intéressante aussi dans ses rôles dans la transcription, la différenciation cellulaire et même le métabolisme (Hydbring et al, 2016). En plus de phosphoryler des facteurs de transcription quand associée à sa kinase, il a été montré que Cycline D est capable de s'associer à des modificateurs de la chromatine. Ainsi,

Cycline D1 interagit directement avec des histones-acetyl-transférases comme p300 et la protéine CBP (CREB binding protein) réprimant l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles dans les neuroblastes (Fu et al, 2005). Ces rôles ont été décrits comme indépendant des CDK, l'interaction se faisant via des domaines distincts du domaine liant les CDK. De plus, il a été observé qu'une expression différentielle des Cyclines D spatiale et quantitative contrôle l'identité des futurs types cellulaires dans l'embryon de souris durant la gastrulation: chacun des tissus embryonnaires exprime des types de Cyclines D différentes (Wianny et al, 1998) : les Cyclines D1 et D2 sont exprimées dans le mésoderme, Cycline D3 est plutôt exprimée dans le trophoectoderme et l'endoderme exprime un faible niveau de Cycline D2. La régulation entre l'état prolifératif et la différenciation des cellules souches est aussi contrôlée par la longueur de la phase G1 durant laquelle les Cyclines D sont actives: on peut noter par exemple que la détermination en progéniteurs de l'endoderme se fait au début du cycle cellulaire quand la quantité de Cycline D est faible alors que l'initiation du neuroectoderme se fait en fin de G1 où Cycline D associée aux CDK active les Smad2/3 ce qui contraint les cellules à adopter le destin neuroectodermique (Paulkin et al, 2013). De façon intéressante, lors de la mise en place de la neurogenèse, plusieurs complexes CDK/Cyclines ont été impliqués. Ils peuvent promouvoir ou inhiber la différenciation neuronale en fonction des contextes physiologique. Par exemple, la phosphorylation CDK dépendante de Neurogenin 2 induit son inhibition empêchant la différenciation neuronale embryonnaire chez la souris (Ajioka et al, 2014, Ali et al, 2011). De plus l'activité de Cycline D1/CDK4 dans les cellules souches neuronales inhibe la neurogenèse et augmente la population de progéniteurs basaux en raccourcissant la durée de G1 (Paulkin et al, 2013). Par contre, dans les cerveau adultes de souris, le niveau de Cycline D1 reste élevé, alors que celui de la cyclise D2 diminue, ce qui incite les auteurs à postuler un rôle de Cycline D1 dans la différenciation neurale (Ross et al, 1996). Il est à noter que la Cycline D n'est pas la seule à exercer ce type de fonction, puisqu'il a été montré chez la drosophile que Cycline E est aussi impliquée dans l'équilibre entre les progéniteurs et les neurones en contrôlant la régulation des divisions cellulaires asymétriques des progéniteurs neuronaux (Malumbres, 2011). Cette action pourrait être médiée par l'interaction entre Cycline E et le facteur de transcription Prospero (Berger et al, 2010). Dans le laboratoire, il a aussi montré que la dérégulation de Cdc2/CDK1 dans le lignage des soies impacte l'identité finale des cellules composant l'organe, du fait de la transformation de la division asymétrique en division d'autorenouvellement en cas de forte activité CDK1 et en division symétrique en cas de faible activité CDK1. (Fichelson et al, 2004, Tio et al 2001).

Le cycle cellulaire est un processus fondamental à toutes cellules mais tous ses acteurs, bien que conservés entre tous les organismes, révèlent progressivement qu'ils ont plus d'une corde à leur arc avec des rôles non canoniques, parfois organisme dépendant ou même spécifique d'un type cellulaire à un moment donné. Cela nous permet d'ouvrir de nouvelles passerelles entre de grands thèmes comme la prolifération et la polarité cellulaire et surtout cela nous permet d'avoir une vision plus globale d'une simple protéine.

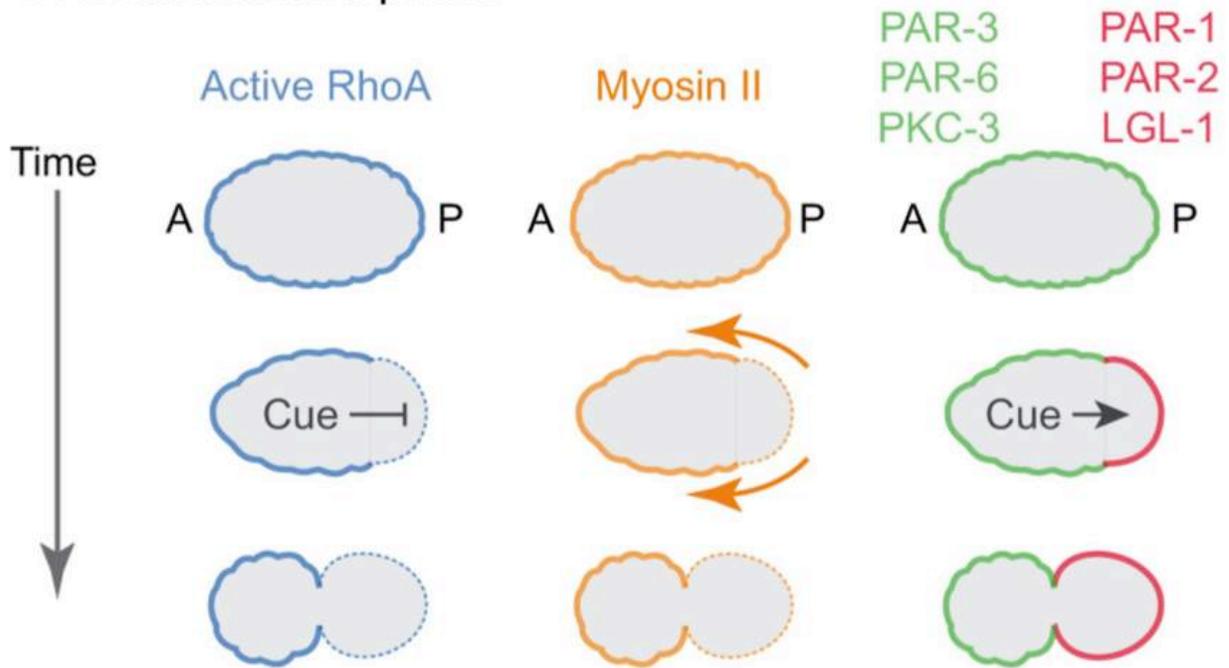
2. La Polarité Cellulaire Planaire

La deuxième étape lors du développement d'un organisme pluricellulaire est d'organiser les nombreuses cellules générées, entre elles. La notion de polarité s'étend de l'orientation interne de la cellule, à celle de la cellule par rapport au tissu dans lequel elle se trouve, jusqu'à l'orientation du tissu lui-même et, par rapport aux autres tissus adjacents. En particulier au cours de ce chapitre je vais m'intéresser principalement à la Polarité Cellulaire Planaire (PCP). Pour autant pour l'appréhender il faut au préalable définir les notions générales concernant la polarité cellulaire, ainsi que sa mise en place.

2.1. Notions sur la polarité cellulaire

Michel Bornens (Médecine/Science 2019) postule que "la polarité propre des cellules caractérisée par une activité unidirectionnelle soutenue par une organisation cellulaire asymétrique et maintenue par une signalisation appropriée, est une propriété essentielle (...)". Cette affirmation est soutenue par la grande variété de systèmes (procaryotes et eucaryotes) au sein desquels le respect de la polarité est indispensable à leur fonctionnement. Ainsi, la polarité primaire se traduit par l'acquisition d'un flagelle primaire ou d'une paire cil/centrosome chez les eucaryotes comme chez les procaryotes. La pluricellularité des eucaryotes, souvent impose l'alignement des cellules et ceci même dans des organismes "simples" de types éponges. Les cellules s'organisent entre elles de façon à exposer leurs cils dans une même direction pour faire des mouvements d'eau (cellules du choanoderme). Chaque cellule doit alors avoir les bonnes informations de position pour définir l'extérieur de l'intérieur ainsi que pour définir les régions adjacentes aux autres cellules. Ces signaux se définissent par des voies moléculaires. Il est à noter que selon l'organisme, le tissu et le stade de développement, les axes de polarité évoluent et diffèrent même pour des cellules apparentées. Les grands axes de polarité se définissent selon l'antéro-postérieur (A/P), proximal-distal (P/D), apico-basal (A/B), gauche-droite (G/D) et front-rear (F/R) pour les cellules qui migrent (Ridley 2003). Pour définir la polarité, il faut aussi prendre en compte la définition au sein de la cellule de domaines corticaux qui polarisent la membrane plasmique et le réseau interne de la cellule, les organites et cytosquelette étant eux même orientés (Vaidziulyte et al, 2019). La mise en place de la polarité au sein des cellules se traduit généralement par la localisation asymétrique a un de ces pôles du « complexe PAR » composé des protéines Bazooka (Baz ou Par 3 chez les mammifères), Par 6 et aPKC (atypical Protein Kinase C). Les interactions entre ces protéines forment un réseau à la base des différents types de polarités cellulaires. Ainsi j'ai choisi de décrire les protéines PAR qui sont conservés du nématode aux mammifères et régule la quasi-totalité des types de polarité cellulaire décrites ci-dessus. Dans un premier temps, je parlerais de leur implication dans la mise en place de la polarité dans le zygote de *C.elegans*, et je soulignerai leurs spécificités lors des divisions asymétriques.

A Establishment phase



B Maintenance phase

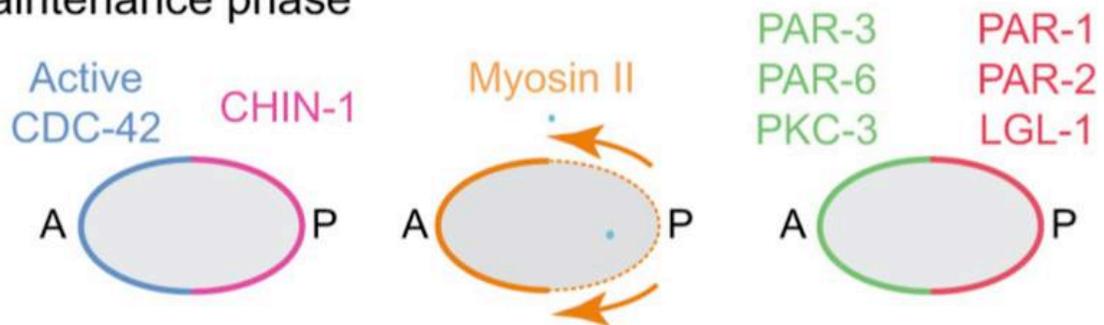


Figure 5: Mise en place et maintenance de la polarité par les protéines PAR lors de la première division de l'embryon de *C. elegans* **A)** Etablissement de la polarité. Avant l'entrée du spermatozoïde, les protéines RhoA, Myosin II et PAR 3/6 et PKC-3 sont localisés uniformément au cortex de l'ovocyte. A l'entrée du signal (cue), la protéine RhoA activée, la Myosin II, les PAR 3/6 et PKC-3 se localisent au pôle antérieur et les protéines PAR 1/2 et LGL-1 se localisent en postérieur. **B)** Maintenance de la polarité. CHIN-1 et CDC-42 activé sont réparties respectivement au pôle antérieur et postérieur du zygote ou elles s'excluent mutuellement. Le flux de Myosine II crée une différence de force au cortex. Les PAR antérieur et postérieur s'excluent mutuellement. Antérieur à droite et postérieur à gauche. Adapté de Lang et Munro 2017.

Ensuite étant donné qu'elles interagissent avec les modules protéiques impliqués contrôlant la polarité A/B, j'exposerai brièvement les grands principes de cette polarisation dans les cellules épithéliales ainsi qu'au cours de divisions asymétriques.

2.1.1. Les protéines PAR

Décrites en 1988 par Kemphues et son équipe, elles tirent leur nom du phénotype de "partitioning defects" causé par la mutation d'un ou plusieurs gènes dans l'embryon de *C. elegans*. Ce zygote se divise de manière asymétrique pour donner un blastomère somatique antérieur et un blastomère germinale postérieur. À l'entrée du spermatozoïde, la mise en place de l'axe de polarité est déclenchée et repose sur un équilibre d'inclusion et d'exclusion entre les différentes protéines PAR.

Avant l'entrée du spermatozoïde à un pôle de l'ovocyte, le cortex de l'ovocyte est uniformément tapissé des protéines PAR-3, PAR-6 et PKC-3 (**Figure 5**). Cette localisation concorde avec celle des acteurs de la contractilité du cytosquelette d'actine RhoA et la myosine. Les protéines PAR-1 et PAR-2 sont quant à elles cytoplasmiques. L'entrée du MTOC (Microtubule Organizing Center) du spermatozoïde induit la ségrégation des protéines PAR-3 et PAR-6 au cortex antérieur (entraînant PKC-3 et Cdc42, un autre acteur de la voie de l'actine) et la levée de la rétention cytoplasmique des protéines PAR-1 et PAR-2 (ainsi que celles de LGL1 et CHIN1, GTPase actrice elle aussi de la voie de l'actine), qui se localisent au cortex postérieur. Seules les protéines PAR-4 et PAR-5 sont symétriquement localisées et régulent l'asymétrie locale des autres protéines. Les protéines PAR antérieures excluent les protéines PAR postérieures par phosphorylation. Cette exclusion crée une asymétrie de l'activité de RhoA créant des flux de contractilité régulée par l'asymétrie de Cdc42 contrecarrée par celle de CHIN1.

Les protéines PAR ne sont pas exclusives de la division asymétrique de l'embryon de *C. elegans* mais sont conservées entre les espèces (à l'exception du PAR-2 qui a un rôle annexe dans les autres espèces (Munro 2006). Cependant, la mise en place et/ou le maintien de la polarité par les protéines PAR décrites ci-dessus n'est pas absolue et certaines cellules ne présentent qu'une distribution unipolaire de ces protéines: dans le neuroblaste de drosophile, la restriction de PAR-3 (Bazooka) au pôle apical ne dépend pas de PAR-6 mais de son association à la protéine Inscuteable (Schober et al, 1999). Il n'y a pas d'exclusion par une contrepartie basale. Dans les cellules précurseurs des soies mécanosensorielles de la drosophile, PAR-3/Bazooka se localise avec les membres majeurs de la voie de Polarité Cellulaire Planaire et régule le domaine apical-postérieur de la cellule en étant réparti asymétriquement au cortex apical-postérieur avec l'acteur majeur de cette voie, Frizzled.

D'autres voies participent aussi à la mise en place d'une polarité cellulaire. Dans cet ouvrage, j'ai choisi de décrire deux autres voies qui permettent l'établissement de l'axe A/B: les modules Scribble/Lethal Giant Larvae/Disc Large et Crumbs.

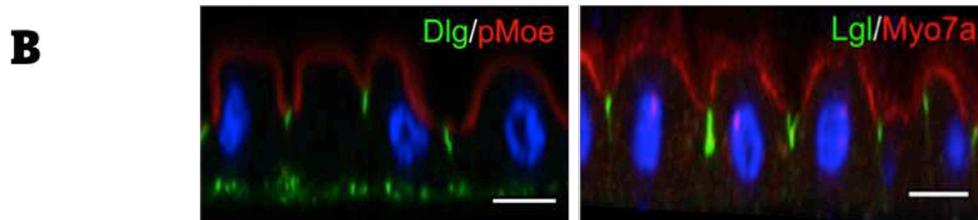
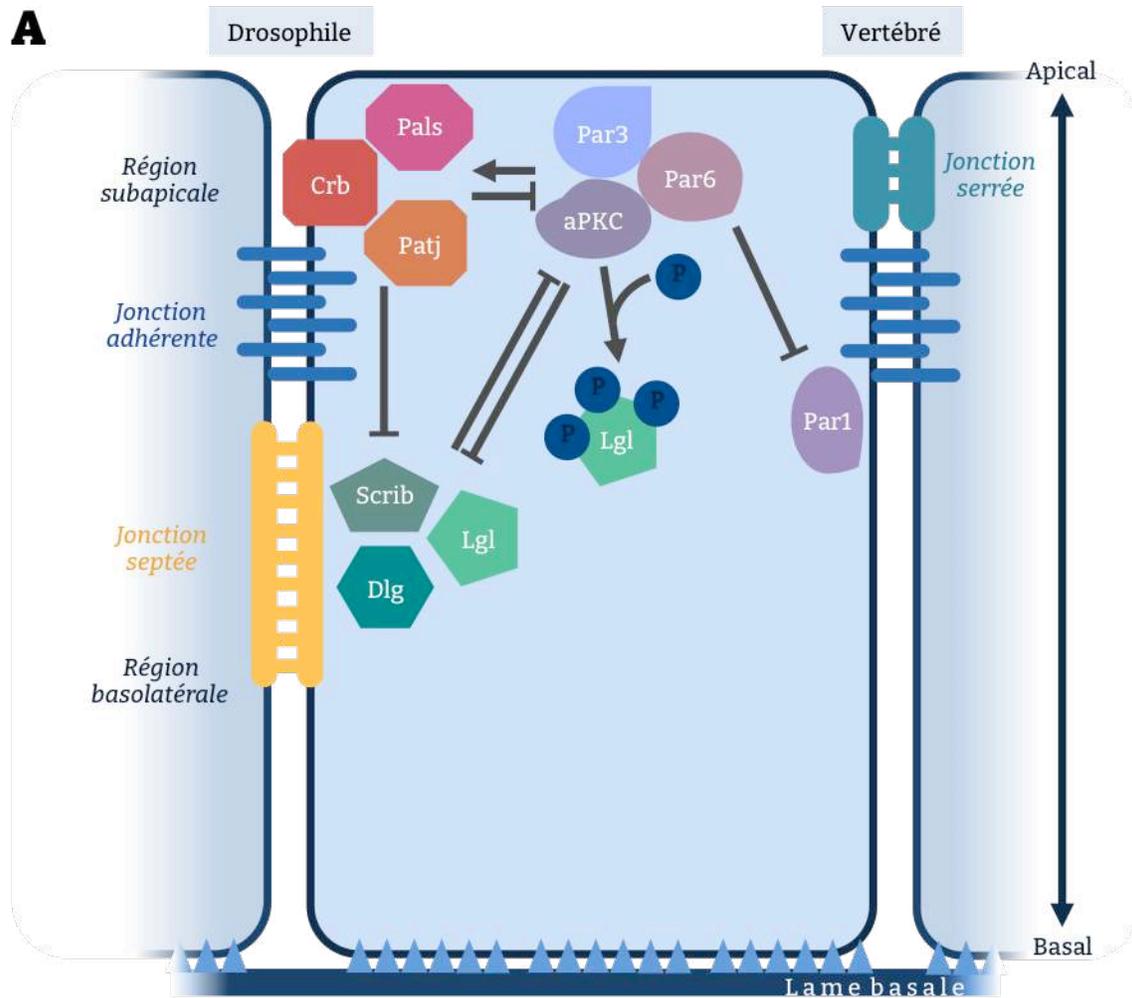


Figure 6: Les modules de polarité apico-basale **A**) Représentation schématique d'une cellule épithéliale avec la localisation des protéines impliquées dans la polarité apico-basale. La cellule est subdivisée en trois parties, le domaine apical et subapical au dessus des jonctions adhérentes, le domaine basolatéral en dessous de ces mêmes jonctions et le domaine basal encore en dessous. Les modules PAR, Crumbs et Scribble se régulent entre eux au sein des épithélia (invertébrés à et vertébrés) pour maintenir la polarité A/B. Le module Crumbs (Crb, Pals et Patj) localisé au cortex apical est activé par les PAR apicales (PAR-3, aPKC et PAR6) pour réprimer Scribble (aux jonctions septées de la Drosophile, module fait de Scrib, Dlg et Lgl). aPKC phosphoryle Lgl. **B**) Coupes d'épithélium intestinal de drosophile marquées pour Dlg et Lgl (vert) et la Myosine7a, ADN/DAPI (bleu). Les protéines Lgl et Dlg définissent le pôle apical en haut. Adapté de Humbert 2008 et de Chen et al 2018.

Mais la polarité A/B n'est pas la seule polarité des cellules. C'est pour cela je prendrai le temps par la suite de décrire la voie de la polarité au centre de mon travail: celle de la Polarité Cellulaire Planaire.

2.1.2. Modules de la polarité A/B

Un module est un ensemble de protéines impliquées dans l'établissement d'un processus, ici la mise en place et le maintien de la polarité A/B. Les modules Scribble et Crumbs interagissent avec la voie des protéines PAR pour donner aux cellules épithéliales cette polarité (**Figure 6**). Dans les épithélia, le cortex des cellules est organisé en trois sous domaines: apical, basolatéral et celui entre les deux qui correspond aux jonctions adhérentes. PAR-3 sert de repère précoce aux jonctions cellulaires pour recruter transitoirement le complexe apical de PAR-6/aPKC et de Crumbs. Il en exclut PAR-1 qui sera un marqueur de la partie basolatérale des cellules.

Crumbs est une molécule d'adhésion qui se localise au niveau de la région subapicale chez les invertébrés et au niveau des jonctions serrées des vertébrés où il est stabilisé à la membrane par phosphorylation par aPKC. Crumbs interagit avec les protéines cytoplasmiques Stardust et Discs Lost (respectivement Pasl1 et PatJ chez les vertébrés).

Ces protéines ont été identifiées par Tepass et Knust et al en 1990 car leur perte de fonction entraîne la perte de la polarité A/B des épithélia et une désorganisation des couches épithéliales de la drosophile. Elles régulent négativement les protéines PAR et le module Scribble pour réguler la polarité A/B épithéliale.

Le module Scribble, composé des protéines Scribble, Lethal Giant larvae (Lgl) et Disc Large (Dlg) a été identifié comme suppresseur de tumeurs: la perte de fonction *lethal giant larvae*, induisant une sur-prolifération et une désorganisation tissulaire dans les épithélia et le cerveau de la mouche, celle de *disc large* conduisant à une hypotrophie des disques imaginaux et celle de *scribble* altérant l'architecture des tissus de l'embryon (Elsam et al, 2012). Mais ces phénotypes ne sont observés qu'en perte de fonction globale, puisqu'aucun événement de sur-prolifération cellulaire n'a été observé en contexte de clones mitotiques *scribble*, *disc large* et *lethal giant larvae*. Dans ce contexte, les cellules clonales mutantes sont entourées de cellules "sauvages" et présentent un taux de survie très faible, étant rapidement extrudées des épithélia par l'intermédiaire des cellules sauvages induisant leur apoptose. Ces trois protéines ont aussi des rôles étendus au signalment cellulaire, la régulation du cytosquelette d'actine et le trafic vésiculaire. Dans les cellules épithéliales, la protéine Scribble est localisée au cortex de la région basolatérale, sous les jonctions septées avec la protéine Disc-Large chez drosophile, mais au niveau des jonctions adhérentes chez les mammifères. Ensemble, elles recrutent la protéine Lethal Giant larvae qui est cytoplasmique. Le module Scribble régule négativement les protéines PAR et le module Crumbs. L'ensemble de ces interactions permet de définir les différents domaines A/B. La polarité apico/basale doit aussi être définie au cours des divisions asymétriques. Ainsi dans les neuroblastes qui se divisent

pour donner un nouveau neuroblaste et une cellule GMC (ganglion mother cell), ces trois protéines sont localisées au cortex basal du neuroblaste en métaphase.

Dans ces cellules, C. Doe et al, 2003 décrit une disposition basale des trois protéines jusqu'à la métaphase puis une redistribution uniforme au cortex. Lgl est phosphorylé par aPKC suite à l'action de l'Aurora sur PAR-6, ce qui permet de le libérer du complexe. Bazooka/PAR-3 est alors recruté et le complexe Aurora A/aPKC/Baz phosphoryle Numb à son tour. Et cela permet de restreindre les déterminants cellulaires dans la future GMC, assurant ainsi l'asymétrie de la division (Elsom et al 2012, Wirtz-Peitz et al, 2008, Smith et al 2007). Du fait de leur localisation asymétrique dans la cellule, leur perte de fonction des facteurs de polarité peut induire une perte de l'asymétrie de la cellule par la restriction du domaine corticale où se localisent des déterminants cellulaires tel Miranda (Albertson et al 2003) et une asymétrie de la taille du fuseau mitotique dans les neuroblastes. Durant la division des neuroblastes, Disc Large interagit avec les protéines Pins et Gao en basal pour orienter le fuseau mitotique.

La polarité A/B est l'une des polarités des épithélia, ces tissus peuvent aussi être polarisés selon un axe orthogonal à l'axe A/B. Cette orientation est la Polarité Cellulaire Planaire (PCP).

2.2. La Polarité Cellulaire Planaire

La PCP a été décrite en premier en 1975 chez *Oncopeltus fasciatus* par Lawrence et Shelton puis elle a été analysée beaucoup plus en détail chez *Drosophila melanogaster*, notamment par le duo Gubb et Garcia-Bellido qui ont montré en 1982 l'incidence de la mutation de marqueurs de polarité dont la protéine Frizzled sur l'orientation des poils épidermiques (trichomes) qui couvrent la cuticule de l'aile de mouche. De façon générale, la PCP décrit l'orientation vectorielle d'une cellule épithéliale, ou d'une structure multicellulaire simple, dans le plan d'un épithélium. Ainsi son axe est orienté orthogonalement à l'axe apico-basal des cellules. Par exemple, chez la drosophile, elle contrôle l'orientation interne des cellules et des tissus selon l'axe A/P pour l'épithélium du thorax dorsal (notum) et selon l'axe P/D dans l'aile. Elle est présente dans de nombreuses espèces et permet comme énoncé précédemment l'orientation des soies et trichomes chez la drosophile, mais aussi des poils de la souris, des écailles ou plumes chez les vertébrés, et les cellules auditives de l'oreille interne des mammifères (**Figure 7**). Aussi, elle est importante pour la fermeture du tube neural chez le zebrafish (en plus de la voie SHH) pour faire ce que l'on appelle de la convergence extension, rôle que l'on retrouve aussi lors de la gastrulation de l'embryon de xénope (Gray, Roszko, & Solnica-Krezel, 2011; Wang & Nathans, 2007, Guan et al 2000, Adler et Wallingford 2000). La voie de la PCP participe à la mise en place de l'asymétrie interne des cellules pour localiser le cil à un pôle de la cellule et, participe aussi à l'orientation de divisions asymétriques. Son rôle s'étend aussi jusqu'à la migration des cellules (Munoz-Soriano et al, 2012). Les dérégulations de la voie PCP sont associées à de nombreuses pathologies (Ross et al, 2005 pour défaut dans la cochlée) et ont récemment été mis en exergue dans les cancers des épithélia.

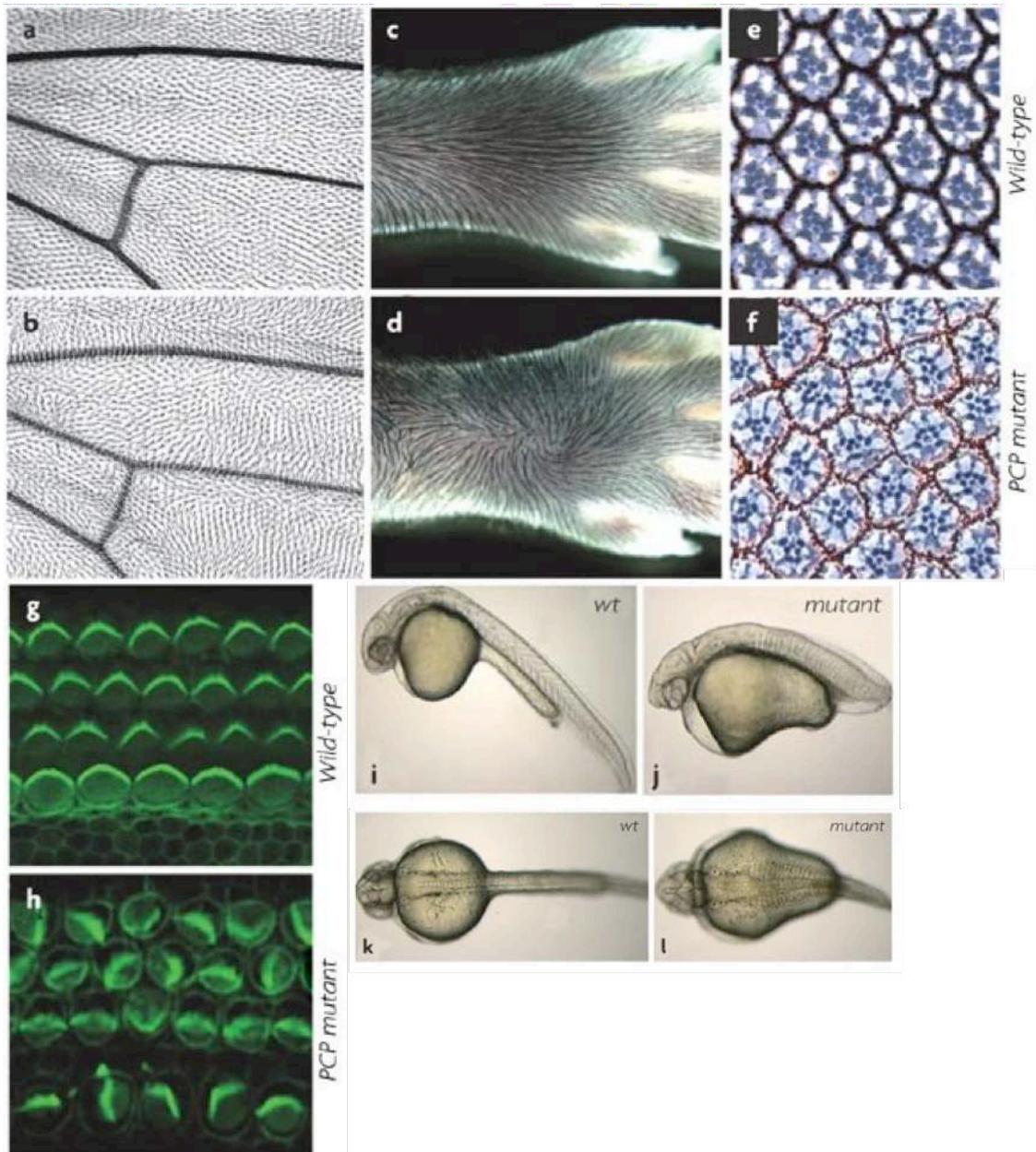


Figure 7: *Phénotypes associés à la perte de fonction *frizzled*, un acteur majeur de la Polarité Cellulaire Planaire* La voie de la PCP oriente les cellules épithéliales et les structures cellulaires contenues en son sein dans le monde vivant. **A et B)** orientation des trichomes de l'aile de la drosophile en sauvage et en contexte mutant *fz*. **C et D)** orientation des poils de la souris en contexte sauvage et mutant *fz*. **E et F)** orientation des ommatidies de la drosophile en contexte sauvage et mutant *fz*. **G et H)** orientation des appareils de Conti dans la cochlée en contexte sauvage et mutant *fz*. **I et J)** développement d'un zebrafish en sauvage et mutant. **K et L)** Stade de développement d'un zebrafish en contexte sauvage et mutant *fz*. Perte de l'orientation des structures en contexte mutant en **B, D, F et H** et défauts de développement en mutants correspondant à un défaut de convergence extension: **J et L**. *Adapté de Seifert et Mlodzik 2017.*

2.2.1. Voie Wnt et PCP

La voie de signalisation Wnt canonique a été décrite comme étant impliquée dans de nombreux processus au cours du développement des métazoaires : dans les premières ébauches de la vie de l'organisme, elle intervient dans l'acquisition des destins cellulaires jusqu'au renouvellement des cellules souches. Elle peut être sollicitée de nouveau plus tard lors d'événements de régénération (Angers et Moon 2009). La voie canonique de Wnt est centrée sur l'activité de la β -caténine (Armadillo chez la drosophile): quand la voie est inactive, la β -caténine est réprimée par les protéines Axin, APC et GSK3, à l'activation de la voie au niveau du complexe membranaire Frizzled/Dishevelled/LPR5 ou 6 par son ligand Wnt (Wingless chez la drosophile), la β -caténine est libérée de l'Axin (qui est recrutée à la membrane par Dishevelled) et peut entrer dans le noyau en tant que coactivateur transcriptionnel (**Figure 8**).

En plus de ce mode de fonctionnement, une voie Wnt non canonique a aussi été décrite pour régir la PCP. Cette voie fait intervenir uniquement les protéines associées au récepteur Frizzled et ne passe pas par la β -caténine. La PCP est donc caractérisée canoniquement par le groupe des protéines menées par Frizzled mais il existe une deuxième voie menée par les complexes Fat/Daschous qui interviennent aussi dans le processus de polarité planaire (Adler, Charlton & Liu 1998). Cette voie est aussi impliquée dans la croissance cellulaire via l'activation de la voie Hippo/Warts (Pan et al, 2013). Bien que certaines études montrent des redondances entre Fat/Daschous et la voie Frizzled (Donoughe et DiNardo, 2011), les deux voies ont aussi été montrées comme étant autonomes (Brittle et al, 2012, Adler 2002).

Cependant, certains processus développementaux exigent une coordination entre ces deux voies comme par exemple dans l'épithélium neural du zebrafish qui est composé de deux types de cellules: les cellules épithéliales et les cellules des organes mécanosensoriels. Ces organes sont formés de cellules aux polarités opposées selon l'axe A/P. Kozak et al en 2020 montre que le progéniteur UHCP n'exprime pas Emx2. Suite à sa division symétrique, les deux cellules filles encore immatures des soies seront activées différemment en réponse à la voie Notch pour induire l'expression de Emx2 uniquement dans une des deux cellules filles, ce qui aboutira à la formation de deux cellules ayant des polarités opposées. Ensuite, la PCP via Vangl2 oriente les cellules de l'organe individuellement et la voie Wnt via Frizzled7a/7b coordonne l'orientation des cellules de support qui entoure les organes (Navajas Acedo et al, 2019). La coordination s'illustre par le fait que lorsqu'une des voies est impactée (PCP ou Wnt), il y a une répercussion générale sur l'organe.

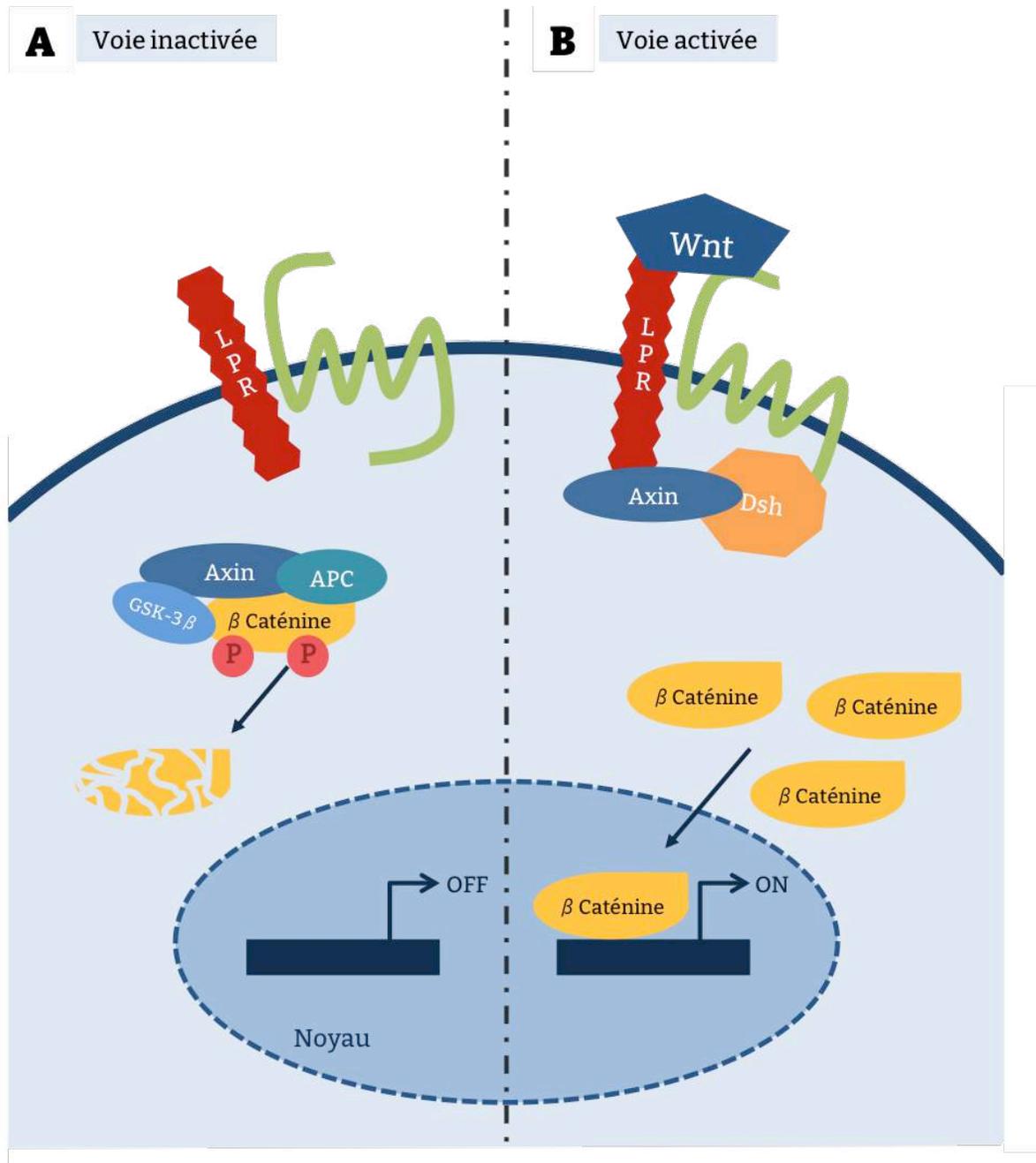


Figure 8: *La voie WNT canonique* **A)** voie Wnt inactivée, la β -caténine phosphorylée est complexée dans le cytoplasme avec Axin, APC, et GSK3B et sera ensuite dégradée. **B)** activation de la voie. Wnt se fixe à LPR et Frizzled (transmembranaire en vert), ce qui induit le recrutement de Dsh qui à son tour recrute Axin. La β -caténine n'est plus dégradée, s'accumule et entre dans le noyau pour induire la transcription des gènes cibles. Adapté de Ding et Wang 2017.

2.2.2. La PCP canonique: Frizzled core groupe

La voie Frizzled (**Figure 9**) repose sur la répression mutuelle de deux complexes protéiques localisés corticalement aux deux pôles de la cellule. Chacun de ces complexes est composé de protéines transmembranaires et de protéines cytoplasmiques. D'un côté, le complexe est constitué des protéines Frizzled, Dishevelled et Diego, et de l'autre côté par les protéines Van Gogh et Prickle. Deux autres protéines transmembranaires, Flamingo et Furrowed, sont présentes mais aux deux pôles pour maintenir les complexes et permettre la transduction du signal entre les cellules voisines (Strutt et Strutt 2008, Lawrence et al 2004). Les protéines cytoplasmique Dishevelled, Diego et Prickle stabilisent les interactions entre les complexes (Strutt 2011). Ainsi, la localisation de chacune des protéines est importante pour le maintien de l'intégrité de chaque complexe (Axelrod 2001, Strutt 2001, Strutt 2002).

Cette voie est conservée entre les métazoaires: Hale et Strutt retracent en 2015 l'émergence de la voie PCP dans de nombreux phyla mettant en exergue la présence d'homologue de Strabismus/Van Gogh chez tous les métazoaires (sauf Porifera et Cténophora) ainsi que celle de Frizzled.

2.2.2.1. *Frizzled*

Frizzled est un récepteur transmembranaire de 70 kDa, de la voie Wnt appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Il a été identifié chez la drosophile pour son rôle dans la PCP. Sa perte de fonction induisant une désorientation des soies des organes mécanosensoriels ainsi que celle des cellules épithéliales et des ommatidies de la drosophile (Gubb et Garcia Bellido 1982; Wong et al 1993, Jin et al 1994). Dix gènes codant pour *frizzled* ont été identifiés dans les génomes de la souris et de l'homme, tandis que chez la drosophile, quatre ont été rapportés et trois chez *C. elegans*. Chez la drosophile, seul Frizzled 1 intervient dans la PCP, en revanche chez les vertébrés, trois, Frizzled 3, 6 (souris) et 7 (xénope) servent dans la PCP, les autres étant impliqués plutôt dans la Wnt canonique.

La structure du récepteur Frizzled est celle d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires et est définie par trois régions: la première étant la partie N-terminale de la protéine qui correspond à la région extracellulaire (**Figure 10**). Cette région via son domaine CDR participe avec et sans co-récepteurs comme LRP5/6 à la liaison du ligand Wnt ou de facteurs inhibiteurs dans la voie canonique, et dans la voie de la PCP, elle interagit avec un autre acteur de la PCP, Van Gogh, pour établir le contact entre les cellules adjacentes. La seconde est un domaine transmembranaire composé de sept hélices alpha hydrophobes qui traversent les bicouches lipidiques. Et la troisième est la partie C-terminale de la protéine du côté cytoplasmique.

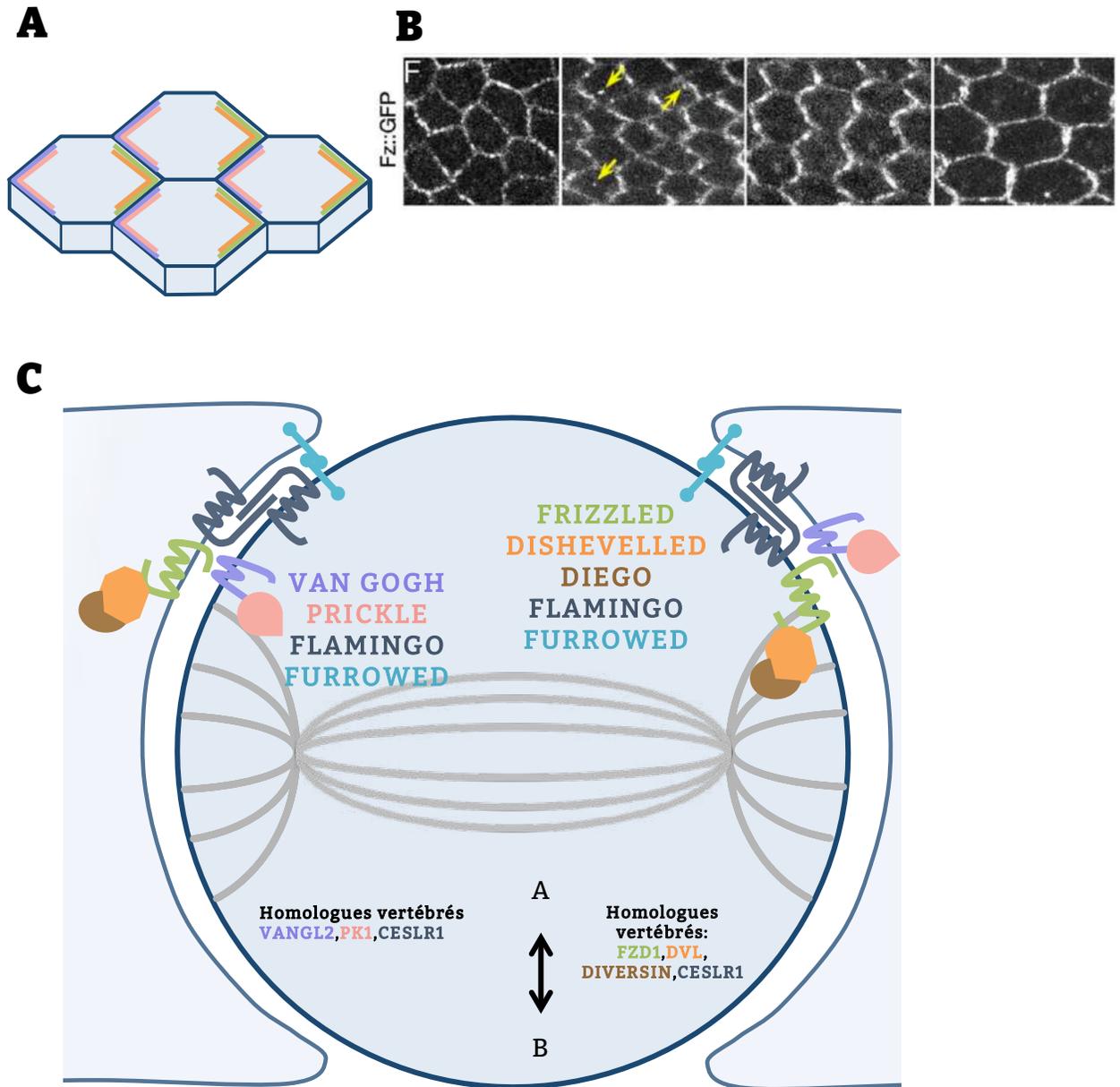


Figure 9: Localisation des facteurs de la voie PCP canonique au sein d'une cellule épithéliale **A)** Schéma de cellules épithéliales avec répartition polarisée des facteurs de la PCP. Les deux complexes répriment la localisation de l'autre. Vang Gogh en violet, Prickle en rose. Frizzled en vert et Dishevelled en orange. **B)** Epithélium du disque d'aile de mouche $arm > Frizzled::GFP$ en formation à 18h APF, 24, 30 et 36h. On peut noter que le signal s'intensifie au cours du développement. Postérieur à droite. **C)** Schéma d'une cellule épithéliale en division sous contrôle de la PCP. Le complexe formé au pôle apical est constitué de Frizzled, Dishevelled, Diego et celui formé au pôle apical opposé de Van Gogh et Prickle. Flamingo et Furrowed (drosophile) sont présent aux deux pôles de la cellule. Les protéines transmembranaires (Fz/Vg) des cellules adjacentes interagissent pour conduire le signal à travers le tissu. Adapté de Carjaval et Mlodzik 2014 et Shimada et al, 2016.

Cette région cytoplasmique communique avec les éléments de signalisation en aval se trouvant dans le cytoplasme. Elle contient le motif KTXXXW (résidus 557-561 chez la drosophile, Strutt et al 2012, domaine originellement décrit par Umbhauer et al 2000 chez le xénope), qui permet le recrutement de son partenaire majeur, Dishevelled par son domaine PDZ à la membrane à la fois dans la voie Wnt et dans la voie PCP. De plus ce domaine pourrait permettre une régulation de Frizzled par phosphorylation puisque deux sérines putatives cibles de PKC y ont été mises en évidence (Djiane et al, 2015). Il est aussi important de noter que du côté cytoplasmique, trois boucles intracellulaires correspondant aux régions entre les domaines transmembranaires sont présentes. La dernière boucle intracellulaire de Frizzled est aussi importante pour le recrutement de Dishevelled à la membrane. En effet, la substitution d'un acide aminé (M>R) introduite dans cette boucle inhibe le recrutement de Dishevelled (Wu et al, 2008). Il est proposé aussi que des phosphorylations sur les boucles intra cytoplasmiques pourrait réguler l'activité de Frizzled (Djiane et al, 2015).

Pour l'action spécifique lors de la PCP, Wu et al 2008 propose que c'est l'interaction avec le partenaire de Dishevelled, Diego (même si Diego et Frizzled peuvent interagir ensemble en contexte perte de fonction *dishevelled*), qui permet une action spécifique en inhibant le rôle de Dishevelled dans la voie Wnt en le séquestrant à la membrane.

2.2.2.2. *Dishevelled*

Dishevelled (Dsh), partenaire majeur de Frizzled, est une protéine cytoplasmique d'environ 60 kDa. Il a été identifié par Fahmy and Fahmy en 1959, suite aussi à l'observation de défauts d'orientation des soies lors de sa perte de fonction chez la drosophile. Il a été relié à la voie Wnt canonique et à la PCP par Axelrod et al 1998 et Boutros et al en 1998. Dishevelled est conservé chez les vertébrés, codés par trois gènes chez les mammifères DVL1, DVL2 (acteur de la PCP), DLV3, un chez le xénope *xdsh* et chez le zebrafish *dvlike*.

Dishevelled est une protéine cytoplasmique composée de trois grands domaines: DIX, DEP et PDZ (**Figure 10**). Les domaines DIX et PDZ sont importants pour sa fonction dans la voie Wnt canonique alors que les domaines DEP et PDZ le sont plus pour la voie de la PCP. Ainsi, le mutant *dsh1* de la drosophile qui porte une substitution d'acide aminé dans le domaine DEP (Met 438 mutée en Lysine) est viable et ne présente que des défauts de polarité planaire (Axelrod et al. 1998; Boutros et al. 1998).

Dishevelled est recruté à la membrane par Frizzled via son domaine PDZ (Wong et al, 2003) et à son tour recrute, par l'intermédiaire de son domaine DEP, la protéine Diego dans la voie PCP permettant ainsi la stabilisation du complexe. Dishevelled est réprimé par Prickle et Van Gogh du côté opposé au domaine de localisation de Frizzled. Dishevelled possède de nombreuses sérines, tyrosines et de thréonines, dans et en dehors de ses domaines fonctionnels qui en font la cible de multiples phosphorylations: au total de 87 ont été recensées dans une étude récente sur la forme Dvl3 (Hanáková et al 2019).

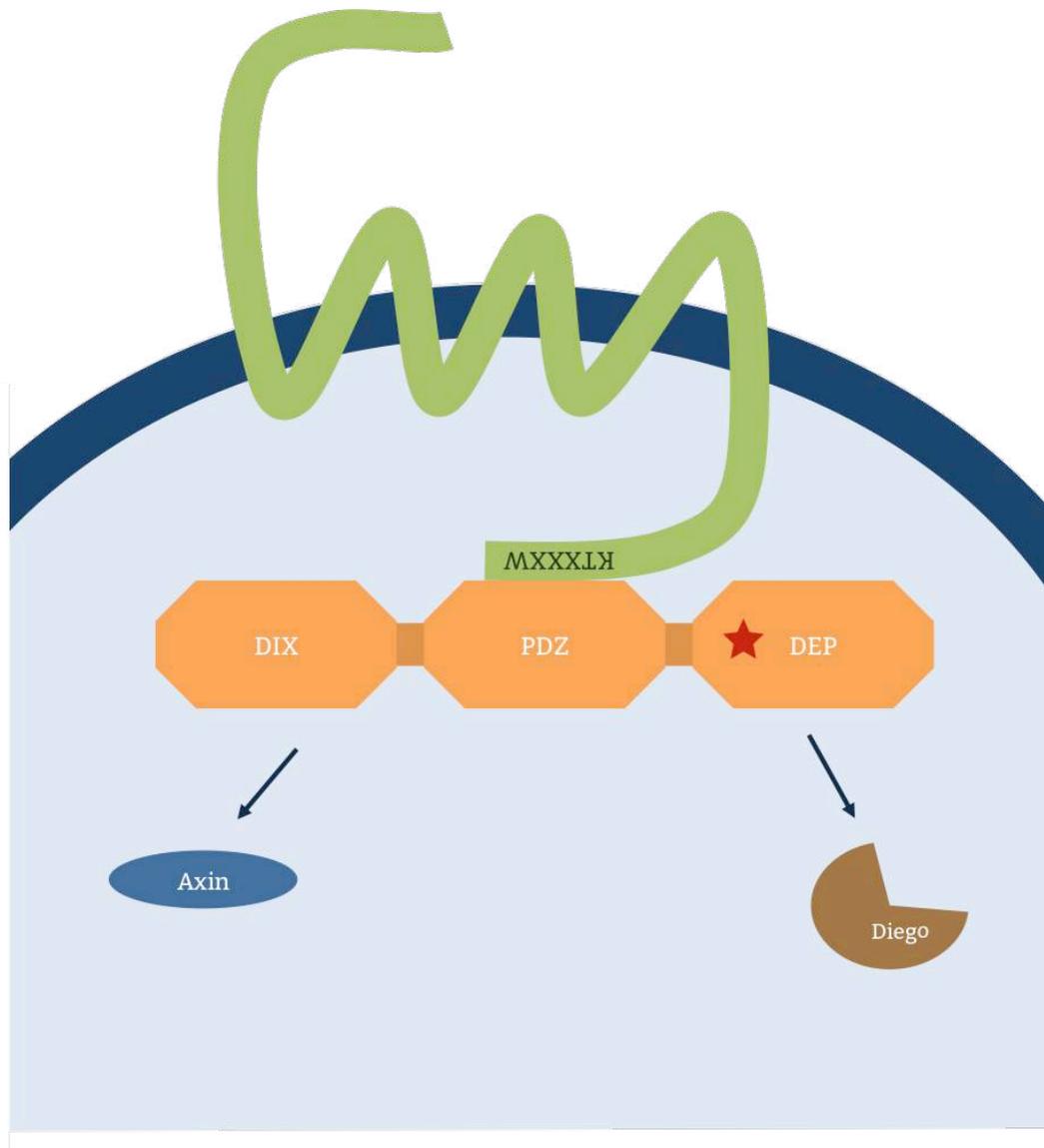


Figure 10: Interaction entre Frizzled and Dishevelled au cortex des cellules L'interaction entre Frizzled (protéine transmembranaire en vert) et Dishevelled (orange) implique la séquence KTXXXW du domaine cytoplasmique de Frizzled et le domaine PDZ de Dishevelled. Le domaine DIX interagit avec Axin dans la voie Wnt canonique et le domaine DEP avec Diego dans la voie PCP. La mutation *dsh* induit une substitution d'un acide aminé dans le domaine DEP (étoile rouge).

Dans une publication de 2011, Yanfeng et al décrit ces phosphorylations en mettant en exergue que le mutant *dsh1*, qui n'impacte que la fonction de Dishevelled dans la PCP a le même phénotype qu'une absence de phosphorylation de la tyrosine 473 du domaine DEP. Cette tyrosine a été décrite comme étant la cible de la famille des tyrosine kinase Abelson dans les événements de rotation des ommatidies (transformation du récepteur R3 en R4 par rotation des cellules, dépendante de la voie PCP, Singh et al 2010). Le domaine DEP contient plusieurs sites consensus de phosphorylations par PKC et ces phosphorylations sont requises chez le xénope pour les mouvements de convergence-extension (Kinoshita et al 2003). Le recrutement de la machinerie du fuseau mitotique dépend de l'interaction entre Dishevelled et Diego.

2.2.2.3. *Diego*

Diego est une protéine ankyrine libre de 104 kDa. Ainsi, il possède six répétitions ankyrines dans sa région N-terminale (Feiguin 2001), connues pour être impliquées dans l'adressage des protéines à la membrane (Bennett et Chen, 2001). Diego n'a qu'un rôle dans la voie PCP et aucun dans la voie Wnt canonique (Jenny 2005, Wu 2008). Il possède des homologues qui sont les protéines Inversin et Diversin chez les vertébrés (Feiguin et al 2001, Moeller 2006), mais contrairement à Diego ces deux protéines possèdent toutes les deux un rôle dans la voie Wnt canonique. Au niveau cellulaire, Diego est retrouvé dans le cytoplasme jusqu'à son interaction avec Dishevelled qui le recrute à la membrane. Quand il se lie à Dishevelled, il le protège de la répression induite par les protéines Van Gogh et Prickle. Une fois le complexe Frizzled/Dishevelled/Diego formé, il recrute les protéines NuMA/Mud et son partenaire Dynéine lors de la division cellulaire pour orienter le fuseau mitotique.

2.2.2.4. *Van Gogh/Strabismus (Starry Night) & Prickle/Spiny Legs*

Strabismus chez la drosophile (Starry Night chez les mammifères), est une protéine à quatre domaines transmembranaires, capable de recruter la protéine cytoplasmique Prickle au cortex. Toutes les deux ont été identifiées chez la drosophile par Taylor en 1998 et Wolff et Rubin en 1998 suite à des défauts d'orientation des ommatidies et des soies mécanosensorielles en contexte mutant. Strabismus possède des homologues chez les vertébrés, Vangl1 et 2 chez les mammifères, Trilobite (Tri/Vangl) chez le Zebrafish et xstrabismus chez le xénope. Prickle, pour lequel il existe quatre gènes chez les mammifères n'en possède qu'un seul, Prickle, chez la drosophile, pour autant la gamme de ses fonctions est assurée par des isoformes distinctes, la Prickle (Pk), Spiny Leg (Pk-Sple) et pricklem. Prickle et Spiny leg sont les deux isoformes fonctionnellement effectives lors de l'établissement de la PCP. L'équilibre entre les deux isoformes est spécifique aux tissus: Pk-Sple est l'isoforme majeure dans les ommatidies et les pattes, et l'isoforme Prickle trouvé majoritairement dans les ailes (Gubb et al, 1999; Tree et al. 2002; Ayukawa et al 2014). Prickle et Van Gogh forme un complexe cortical au pôle opposé de celui formé par Frizzled et Dishevelled, où ils sont requis pour en réprimer la localisation de Dishevelled.

Vang Gogh sert de récepteur à Frizzled dans un contexte non autonome cellulaire entre des cellules adjacentes (action régulée par Wg/Wnt4, Olofsson et al 2014).

2.2.2.5. *Flamingo/Ceslr1*

Flamingo est une cadhérine atypique de 396 kDa possédant sept domaines transmembranaires. Son homologue mammifère Celsr1 est décrit pour sa fonction dans l'orientation des structures de la cochlée humaine (Ezan et Montcouquiol 2014). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Flamingo interagit avec les protéines Frizzled et Strabismus. Au sein de la cellule, elle stabilise Frizzled et Van Gogh au niveau des jonctions adhérentes (Chae et al, 1999, Usui et al, 1999). De plus, Strutt et Strutt (2008) la décrivent comme possible lien entre les cellules adjacentes du fait de sa localisation aux deux pôles des cellules. La localisation de Flamingo à la membrane n'est stabilisée que par interaction avec Frizzled qui lui-même interagit avec la partie extracytosolique du Flamingo de la cellule voisine (avec ou sans Vang Gogh, Strutt 2011). Ainsi, Frizzled et Flamingo forment des puncta qui sont à la base du recrutement des autres acteurs de la PCP. En plus de cette fonction, il a été montré, dans des kératinocytes en division que l'homologue mammifère Celsr1 est impliqué dans l'endocytose de Vangl2 et Frizzled6. Ceci permet aux cellules filles d'hériter uniformément des facteurs PCP pour maintenir la polarité et l'homéostasie du tissu (Devenport et al 2011, Heck & Devenport 2017).

2.2.2.6. *Furrowed*

Furrowed est une protéine de la famille des sélectines qui ne possède qu'un domaine transmembranaire (128 kDa). Comme la protéine Flamingo, elle est localisée aux deux pôles de la cellule et est requise pour stabiliser Frizzled à la membrane (Chin et Mlodzik, 2013) ainsi que Van Gogh (Usui et al, 1999). Son action est décrite comme redondante de celle de Flamingo en tant que stabilisateur des complexes aux deux pôles de la cellule. En effet, il a été montré que sa perte de fonction aggrave significativement le phénotype de perte de fonction *flamingo* (Strutt et Strutt, 2008). De façon surprenante la protéine Furrowed n'est pas conservée chez les vertébrés et aucun homologue n'a été identifié malgré le fait que les autres protéines de la PCP sont conservées.

2.2.2.7. *Meru*

Un nouvel acteur de la PCP a été mis en évidence en 2017 par Banerjee et al chez la drosophile. Meru est un homologue des protéines RASSF9/RASSF10 des vertébrés qui sont requises pour l'homéostasie épithéliale. Pour l'instant, Meru n'a été décrite que dans un type de cellule, les cellules précurseurs des soies mécanosensorielles de la drosophile. Dans ces cellules, Meru interagit avec Frizzled, Dishevelled et Bazooka au pôle apical postérieur. Meru est montré pour être importante pour le recrutement initial de Bazooka au cortex pour son enrichissement à la membrane au cours des divisions du lignage. Sa perte de fonction cause des défauts d'orientation du fuseau mitotique selon l'axe A/P comme les pertes de fonction *frizzled* et *dishevelled*. Ainsi cette protéine, peut être

considérée comme un nouvel acteur de la PCP du fait de son rôle fondamental permettant de relier la polarité planaire et A/B.

2.2.3. La voie PCP non canonique: Fat/Dachsous

La voie Fat/Dachsous a été montrée pour réguler la transcription induite par Yorkie en réponse à la signalisation Hippo/Warts qui contrôle, entre autre, la croissance cellulaire (Rauskolb et al, 2011). Son rôle dans la polarité planaire est plus complexe. Elle repose sur quatre protéines: deux proto-cadhérines, localisées asymétriquement Fat (Brittle et Strutt 2015) et Dachsous, qui interagissent via leur domaine extracellulaire et, les protéines cytoplasmiques Four/jointed et Dachs, la première les stabilisant et la seconde conduisant le signal.

La mise en place de voie Fat/Dachsous est supposée reposer sur le modèle de gradient agissant à courte et à longue portée (**Figure 11**). Brittle et Strutt (2015) ont proposé que Fourjointed et Ds étaient exprimés dans l'aile selon des gradients opposés suite à des expériences de FRAP, Fat quand à lui est exprimé uniformément dans le tissu. De là, l'action de Fourjointed sur les cadhérines induit une polarité que les cellules répercutent permettant ainsi une polarisation globale du tissu (comment la cellule interprète ce signal est encore à découvrir). Selon son gradient, Fourjointed phosphoryle les deux cadhérines mais favorise l'interaction de Fat avec Ds à un pôle de la cellule et y décroît celle de Ds avec Fat à ce même pôle. Cette différence d'activité de Fourjointed induit un recrutement différentiel de Fat à un pôle de la cellule qui se lie alors aux domaines extracellulaires du Dachsous de la cellule voisine. Ainsi la cellule présente plus de Fat à un de ses pôles et, une polarité se crée avec un plus grand recrutement de Dachsous à l'autre pôle (Lawrence et al, 2018). Ce qui va permettre par la suite d'orienter les cils de ces cellules. De plus, de cellule en cellule, les liaisons Fat/Ds en nombre croissant induisent ainsi la polarité du tissu.

Les voies PCP et Fat sont décrites pour être redondantes portant selon les modèles elles sont indépendantes ou bien peuvent interagir l'une avec l'autre. Ainsi dans l'aile, la voie canonique de la PCP est altérée par la perte de fonction de la voie Ft/Daschous suggérant que la voie Fat/Daschous agirait en amont pour définir l'axe de polarité primaire ensuite renforcé par la PCP. Ainsi la PCP serait un effecteur de la voie Fat/Daschous (Matis et Axelrod 2013, Ma 2003).

2.2.3.1. Fat & Daschous

Les protéines Fat (Ft) et Daschous (Ds) sont deux protocadherines qui interagissent via une interaction hétérophilique où Daschous agit comme le ligand de Fat. La protéine Fat est une large proto-cadhérine initialement décrite dans la voie Hippo (Reddy et al, 2008). Elle possède un domaine extracellulaire fait de répétitions de domaines cadhérine dépendante du calcium et contient aussi des domaines EGF ainsi que deux domaines laminines G like.

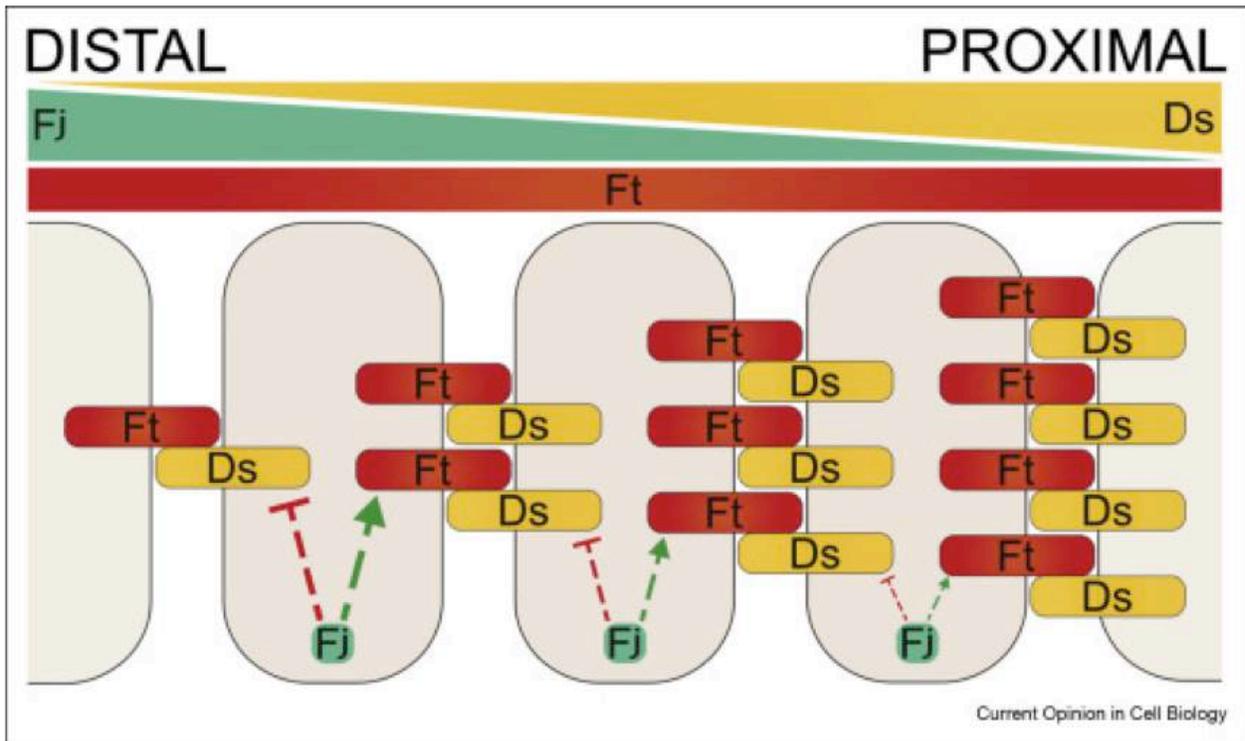


Figure 11: La voie de la polarité planaire non canonique, *Fat/Dachsous* Représentation schématique des gradients opposés *Fj* et *Ds* selon l'axe distal-proximal dans le disque imaginal d'aile. *Fat* est exprimé uniformément. Dans une même cellule, *Fj* favorise l'interaction de *Fat* pour *Ds* et réduit celle de *Ds* pour *Fj*. Ce qui conduit à un recrutement plus prononcé de *Fat* à la membrane proximale. La cellule adjacente recrute alors plus de *Ds*. Ce qui induit une augmentation du recrutement de *Fat* dans la cellule adjacente. Ce phénomène se reproduit de cellule en cellule, ce qui permet de conduire la polarité selon l'axe P/D. Adapté de Fulford et McNeill 2020.

Daschous est aussi une proto-cadhérine possédant 27 répétitions de domaines cadhérine dans sa partie extracellulaire. Les homologues mammifères de Daschous et Fat (Dsch1 et Fat4) sont aussi impliqués dans la PCP (Mao et al 2011a, Saburi et al, 2008, Zakaria et al 2014, Pan et al, 2013).

2.2.3.2. *Fourjointed (Fj) & Dachs (D)*

Fourjointed est une protéine transmembranaire qui porte une fonction kinase. Elle est résidente de l'appareil de Golgi où elle phosphoryle la partie extracellulaire des domaines Cadhérines de Fat et Dachsous pour moduler leur interaction.

Dachs est une myosine atypique qui s'associe au domaine intracellulaire de Dachsous. C'est un excellent marqueur de la polarité. Mao et al en 2011b le montre lors des divisions des cellules épithéliales de l'aile pupale de drosophile. Dans ces cellules Dachs exerce son activité myosine au niveau des jonctions cellulaires de l'épithélium. Par sa polarisation du côté de Dachsous, Dachs entraîne une contractilité apicale polarisée des cellules ce qui orientent le fuseau mitotique des cellules qui induit une croissance dirigée du tissu.

2.2.4. **Mise en place de la PCP et amplification**

La mise en place de la PCP dépend de trois événements (Heck et Devenport 2017): 1) un indice de polarité générale du tissu 2) une asymétrie entre ses composants aux pôles de la cellules 3) transduction de cette polarité au cytosquelette pour créer une réponse orientée du tissu. Pour conduire cette polarité, les voies de la PCP passent par des contact à courte portée entre les cellules voisines (Frizzled/Vang Gogh, ou Fat/Daschous) ce qui définit une polarité à longue portée à travers les tissus.

Pour répondre au point 1, il a été proposé que les voies de la PCP se basent sur des gradients de morphogènes comme Shh, Dpp ou Wnt (Sagner et al, 2012). Chez la drosophile, Wu et al 2013 ont mis en avant que les premières instructions moléculaires de la PCP se faisaient par l'action des protéines de la voie Wnt, Wnt4 et Wingless régulant Frizzled et de Vang Gogh induisant une polarité initiale. Plus précisément, il est suggéré que la voie Wnt inhibe l'interaction Frizzled/Vang Gogh. Il est convenu que la voie Wnt et la PCP suivent le même axe de polarité mais ont des gradients d'activité opposés selon cet axe. Le gradient de Wnt5 induit un gradient de phosphorylation pour Vangl2 et permet sa localisation asymétrique dans les cellules (Gao et al 2011). Il a été aussi admis comme décrit précédemment que la voie Fat/Daschous servait de repère à la PCP mais pas pour tous les tissus: dans l'oeil de la drosophile, la PCP canonique serait en aval alors que dans la zone marginale de l'aile en amont. Comme les deux voies ont le même le readout qui est souvent l'orientation des trichomes, il est difficile de définir le sens de l'interaction. La littérature n'est homogène que pour dire que les deux voies sont redondantes mais indépendantes et que ceci dépend du contexte cellulaire.

Pour répondre au 2, il a été considéré que les composants de la voie canonique PCP sont dans un premier temps cytoplasmiques ou sous formes de saccules pour les

protéines transmembranaires. Sous le gradient de polarité initial, les protéines transmembranaires transitent via le cytosquelette jusqu'à la membrane pour s'associer avec les protéines transmembranaires des cellules voisines (Zallen 2007). Les composants cytoplasmiques de la PCP se lient alors aux protéines transmembranaires aux deux pôles de la cellule (P/D dans l'aile de la drosophile, A/P pour les poils de la souris ou l'épithélium du nota de la drosophile) ce qui stabilise les complexes. Pour donner une direction entre les cellules, Jones et al 1997 montrent que la formation d'un gradient ectopique (ou dans une orientation différente) induit une orientation des trichomes en direction de la zone où l'activité de Frizzled est la plus basse. Ensuite, la polarité mise en place s'affine au cours du développement de l'organisme au fil des divisions. Fu et al 2016 décrivent le procédé d'amplification du signal de la voie PCP canonique dans le développement de l'aile: depuis le premier complexe de Frizzled/Flamingo se greffe en cascade de multitudes de partenaires cytosoliques (Dishevelled/Diego) sous le contrôle de l'action de Prickle qui favorisent ces interactions d'un côté et déstabilisent les complexes opposés (Vang Gogh/Prickle) qui se forment du mauvais côté (Warrington et al, 2017).

Pour répondre au 3, comme la PCP est présente dans les épithélia et les cellules qui migrent, les deux prochains paragraphes détaillent plus précisément les effecteurs de la PCP sur le cytosquelette.

2.2.5. Les effecteurs de la voie PCP

Les effecteurs de la voie PCP (Planar Polarity Effectors:PPE) sont en aval de la voie PCP. Gubb et Garcia-Bellido en 1982 montrent, dans l'aile de la drosophile, que les phénotypes de perte de fonction des gènes *inturned* (In) et *multiple wing hairs* (mwh) sont similaires à ceux des pertes de fonction *frizzled* et *prickle*. En effet, les trichomes ne sont plus orientés vers la partie distale. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que là où la perte de fonction des facteurs de la PCP n'induit que très rarement une duplication des trichomes (en plus de la perte de leur orientation), la perte de fonction des PPE induit de façon notable leur multiplication (Adler, 2017). Les protéines codées par les gènes *in* et *mwh*, ainsi que celles identifiées plus tardivement, par les gènes *fuzzy* (fy), *fritz* (fritz) sont impliquées dans la définition du domaine de formation du trichome par le recrutement et le contrôle local de la dynamique de l'actine (Strutt et Warrington 2008, Wong et Adler 1993 et Yan et al 2008). Ainsi, dans l'aile, Fuzzy et Fritz se localise dans la partie distale des cellules avec Flamingo, Strabismus et Prickle pour restreindre la localisation de Multiple Wing Hairs et limiter le recrutement de l'actine et donc induire la formation du trichome uniquement dans la partie proximale des cellules. L'actine étant la cible première des PPE, se retrouve en plus comme effecteur de la voie des protéines régulant le cytosquelette d'actine comme les protéines de la famille des formines (dDAAM), des Rho-GTPase (dRhoA, dRac1) ainsi que les kinases Rok (Drok). Toutes entraînent aussi une duplication des trichomes lors de leur perte de fonction. Il faut néanmoins noter que la perte de fonction de Drok n'altère pas la polarité des cils selon l'axe A/P, mais induit seulement un défaut de rotation des ommatidies (Winter et al 2001, Strutt et al 2002). Cette action sur le cytosquelette se fait en parallèle du module Scribble chez la souris où il a été décrit une

interaction entre Scribble et de Cesr1 dans les cellules neurales où Scribble est capable de lier Vangl2 pour réguler sa localisation (Elsom et al, 2012).

2.2.6. La PCP dans la migration des cellules

La voie de la Polarité Cellulaire Planaire contrôle donc la polarité de tissus tels que les épithélia mais celle-ci intervient aussi lors de mouvements migratoires collectifs des cellules. Par exemple, lors de la fermeture du tube neural (Munoz-Soriano et al, 2012), le cytosquelette est remodelé suite à l'activation de RhoA par Dishevelled. En plus chez les vertébrés, Vangl1 et 2 ainsi que Celsr1 sont aussi impliqués dans le mouvement des cellules lors de la fermeture du tube neural et de l'élongation de l'axe (Wu G. et al 2011). Dans cette régulation, on retrouve encore l'interaction avec le module Scribble. Aussi chez les mammifères, la PCP participe aussi à la fermeture des blessures du fait de son implication dans le mouvement collectif de cellules (Caddy et al 2010). Cette étude a d'ailleurs permis de mettre en évidence un nouvel acteur de la PCP qui est Grhl3 (grainyhead). Grhl3 est décrit pour intervenir dans la fermeture des blessures en plus de la fermeture du tube neural mais ne présente pas de phénotypes sur l'orientation des cellules de la cochlée. Grh, chez la drosophile, montre aussi des défauts de polarité de trichomes (Lee et Adler 2004). Ainsi, la liste des acteurs de la PCP est en expansion depuis quelques années et devient tissu voire même cellule spécifique.

La PCP intervient aussi dans la migration des cellules cancéreuses du sein: une redistribution de la localisation des facteurs de la PCP a été mise en évidence avec une localisation du complexe Frizzled6/Dvl1 au niveau des protrusions et une localisation du complexe Vangl2/Pk1 à la base de ces protrusions. La répercussion sur le cytosquelette de cette disposition, serait de promouvoir la migration cellulaire. Cette disposition des facteurs au niveau des protrusions résulte de leur exclusion corticale entre les protrusions médiées par l'inhibition de RhoA par Polo kinase 1 (Zhang et al 2016). Une autre étude montre que la mobilité de ces cellules cancéreuses pourrait aussi être due à la sur-activation du récepteur Frizzled6 (Corda et al, 2017), impactant le réseau de fibronectine, lui aussi dérégulé dans les cancers. Aussi dans ces cellules, Vangl2 interagit avec un marqueur de la polarité apico-basale Scribble pour promouvoir la migration cellulaire. En plus de promouvoir la dispersion des tumeurs, la dérégulation de la voie de la PCP a été impliquée dans le maintien des tumeurs en promouvant l'angiogenèse. De façon générale, il a été observé qu'une surexpression des facteurs de la PCP ou de la voie Wnt canonique dans les tumeurs étaient présage d'un diagnostic plus dramatique pour les patients.

Ainsi, les différentes voies de polarité s'entremêlent pour répondre aux contraintes 3D dans lesquels les tissus et cellules se trouvent. Les axes de polarité définis sont importants pour le développement des organismes pour guider les cellules mais aussi le contrôle de leur prolifération.

3. La Division Asymétrique

D'après Richard, mon ami anglais: "Pénélope there is no such thing as symmetric division, all divisions are asymmetric." Dans un sens Richard, n'a pas vraiment tort car en soit peu de divisions génèrent des cellules en tous points identiques sauf dans des événements de simple prolifération et, encore peut-on dire que la multiplication d'un organisme unicellulaire produit deux organismes identiques? Comment génère-t-on de la diversité?

3.1. Génération de la diversité

Le destin de chacune des cellules filles est unique. La diversité entre les cellules peut être générée de façon intrinsèque ou alors extrinsèque dictée par des éléments extérieurs. Dans ce chapitre, je décrirai surtout le processus de diversité intrinsèque où la diversité est générée par la ségrégation différentielle de déterminants cellulaires, la répartition du génome ou par la position du site de clivage de la cellule mère induisant des destins cellulaires différents et/ou une asymétrie de taille entre les cellules filles.

Ce processus correspond à la division asymétrique (ACD) qui s'étend des procaryotes aux eucaryotes. Cette acquisition différentielle d'identité et/ou de taille est contrôlée par deux processus clés (**Figure 12**). Le premier repose sur la mise en place de domaines corticaux antagonistes au niveau de la membrane cellulaire définissant un axe de polarité intracellulaire permettant, par exemple, le recrutement de différents facteurs de déterminations. Le second est l'orientation dynamique du fuseau mitotique en réponse à la fois à la position des domaines corticaux et à des signaux moléculaires de la cellule mère afin d'aligner le fuseau de concert avec l'axe de polarité. Ainsi, la définition d'un axe de polarité interne chez la cellule permettra, au cours de la division de la cellule, aux déterminants, organelles et autres composants cellulaires (RNA et autres) de se localiser différentiellement selon la polarité de la cellule. S'en suit l'orientation du fuseau selon l'axe de polarité. Puis la séparation des cellules filles aux contenus différents qui va induire un destin cellulaire différent chez l'une et l'autre. Par exemple dans le cas des cellules souches, une des cellules est identique à la cellule mère et l'autre va acquérir une autre identité. La génération de la diversité par ACD peut être aussi dictée par des facteurs extrinsèques aux cellules filles tel que microenvironnement ou des facteurs sécrétés.

3.2. Modèles de divisions asymétriques

3.2.1. Nématode

La première division de *C. elegans* est la star des divisions asymétriques (**Figure 13**). Dès l'entrée du spermatozoïde, une polarité différentielle se crée dans la cellule P0 grâce aux protéines PAR, soutenues par une activité différentielle de la myosine et du cytosquelette d'actine pour permettre à la cellule P0 de générer les deux cellules filles AB et P1 (Gönczy, 2005 Wormbook).

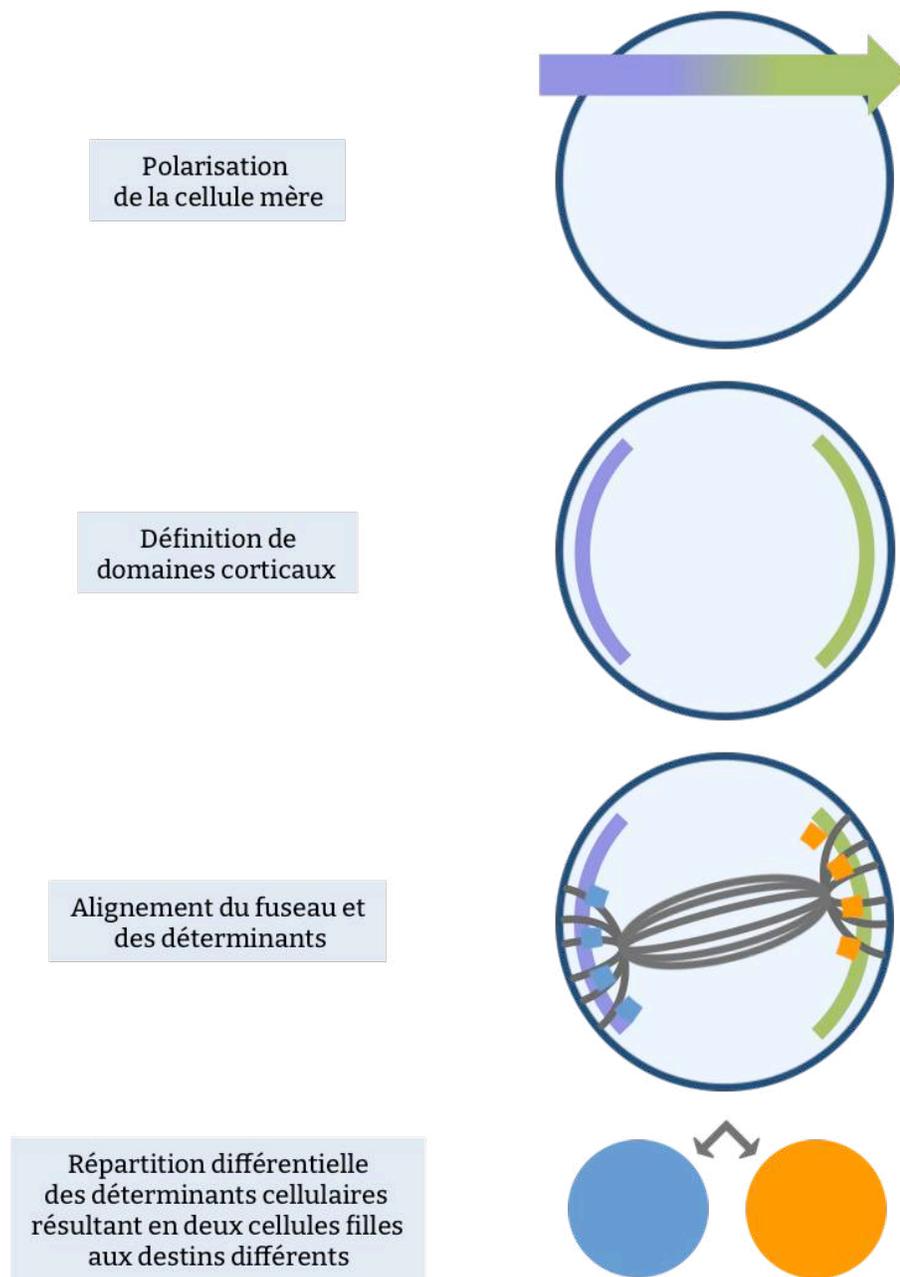


Figure 12: *Principe de la division asymétrique* Dans un premier temps, la cellule se polarise en réponse aux voies de signalisation (PCP, etc...). Dans un second temps, des domaines corticaux différents se forment pour permettre dans un troisième temps, le recrutement des déterminants cellulaires et l'alignement du fuseau. Et dans un dernier temps, après division, répartition différentielle des déterminants cellulaires entre les cellules filles qui confèrent à celles-ci une identité différente.

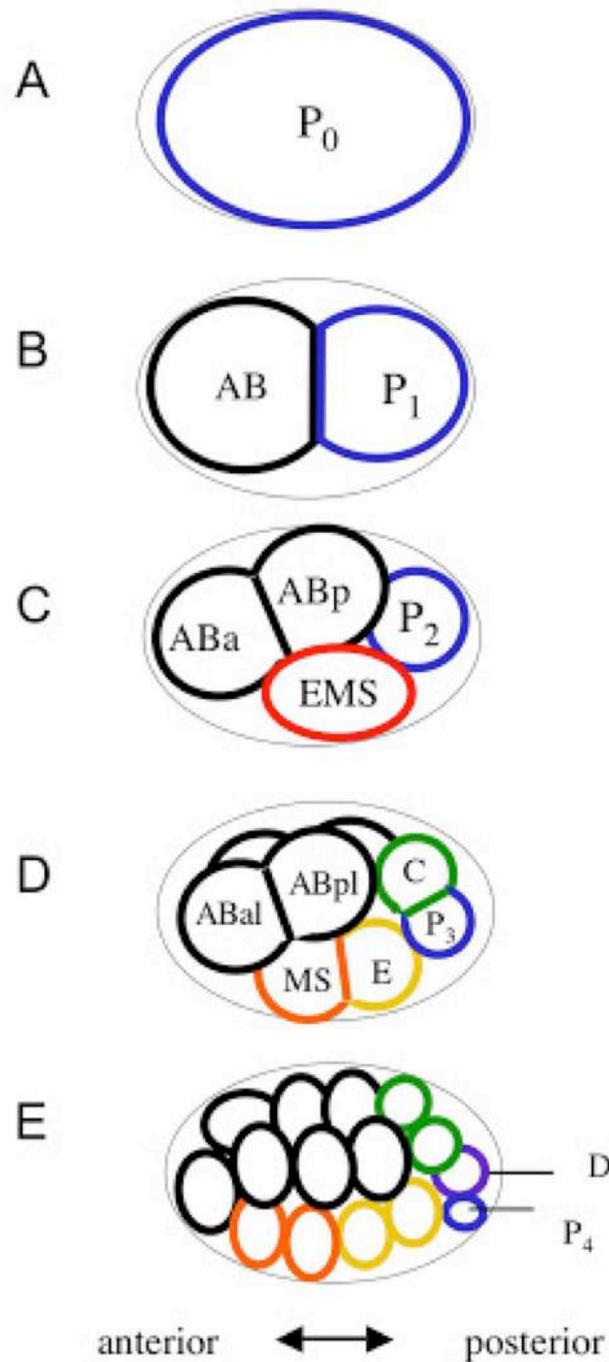


Figure 13: *Lignage cellulaire de l'embryon de C. elegans A-D)* Après la fécondation, la cellule P_0 se divise asymétriquement pour donner une cellule antérieure AB et une cellule postérieure p_1 selon l'axe A/P. AB se divise selon l'axe A/P pour donner ABa et ABp . P_1 se divise pour donner P_2 et EMS . EMS donne les cellules MS et E . Les cellules ABa et b donnent chacune deux cellules filles. P_2 donne C et P_3 . **E)** stade plus avancé montrant la répartition des cellules issues du lignage AB et P . Les cellules bleues sont le lignage P qui permet la formation des cellules germinales. Antérieur à gauche, dorsal en haut. *Adapté du Wormbook.*

Au cours de cette division, en plus des facteurs de polarité décrits précédemment sous l'action des PAR, des déterminants de destin cellulaire sont aussi localisés asymétriquement tels que PIE-1 en postérieur et MEX-5 & MEX-6 en antérieur. Les protéines PAR régulent aussi le timing des divisions en contrôlant la localisation antérieure PLK-1 et Cdc-25 pour que la cellule AB se divise plus tôt que P1 (Noatynska et al, 2013). Durant la division de la cellule P1, un autre marqueur de polarité notoire se cache derrière les granules P, qui tirent leur nom du fait qu'ils ségrégent différenciellement à chaque division des cellules du lignage P pour finir par être spécifique des futures cellules germinales (Pitt et al 2000). Ce sont des condensés d'ARN périnucléaires, spécifiques de la lignée germinale. À chaque division, il reste quelques granules dans l'autre cellule voués à être dégradés.

La cellule AB se divise par contre symétriquement perpendiculairement à l'axe A/P et génère les cellules ABa et ABb, alors que la cellule P1 se divise asymétriquement selon l'axe A/P comme P0 pour donner les cellules P2 et EMS. La voie de signalisation Notch, GPL1 chez le nématode, intervient alors pour spécifier l'identité des descendants de ces deux divisions. Ainsi le ligand Delta, APX-1 chez le nématode, est présent dans P2 mais pas dans la cellule EMS. Suite à la division ici symétrique de AB, il y a répartition symétrique GPL-1. Cependant, comme l'orientation de la division de AB impose qu'une seule de ces cellules filles, ABa, soit en contact physique avec P2, la voie Notch est activée uniquement dans cette cellule et va induire le destin dorsal de ces cellules. Ce qui est en fait au début une division symétrique va par une contrainte extérieure, permettre de classer cette division dans les divisions asymétriques. P2 active aussi la voie Wnt dans les cellules EMS (ainsi que la voie SRC-1/MES-1) pour induire sa propre division asymétrique. Au stade 4 cellules, l'axe G/D se forme suite aux divisions des cellules AB et, les descendants des cellules EMS et P2 continuent de se diviser dans la partie dorsale de l'embryon asymétriquement. Le contact entre les cellules filles des cellules AB définit l'axe G/D.

3.2.2. Vertébrés

Chez les vertébrés, les divisions asymétriques les plus étudiées sont celles des cellules souches et du système nerveux (Homem et Knoblich 2012), introduites dans le chapitre précédent où l'orientation de l'axe du fuseau est important pour le destin de la cellule suivant sa délamination ou non. Cependant, les lymphocytes T de la souris sont aussi un modèle d'ACD et, un exemple extrême d'ACD est l'énucléation des futures hématies lors de la division des érythroblastes puisque tout le matériel génétique est transféré dans une seule des cellules filles. Un autre exemple d'ACD chez les mammifères concerne la stratification et l'homéostasie du tissu épidermique de la souris. L'épiderme est un tissu stratifié, avec du côté basal, des cellules souches et leurs descendantes, ainsi que des cellules progénitrices qui sont prolifératives et, du côté supra-basal, des cellules en différenciation en plusieurs couches superposées (**Figure 14**). Les cellules progénitrices peuvent soit se diviser symétriquement selon le plan de l'épithélium ou orthogonalement et faire une division asymétrique. Dans ce cas, une des cellules filles remplace la cellule progénitrice, l'autre perd son attache basale (Lechler and Fuchs, 2005, Williams et al, 2011).

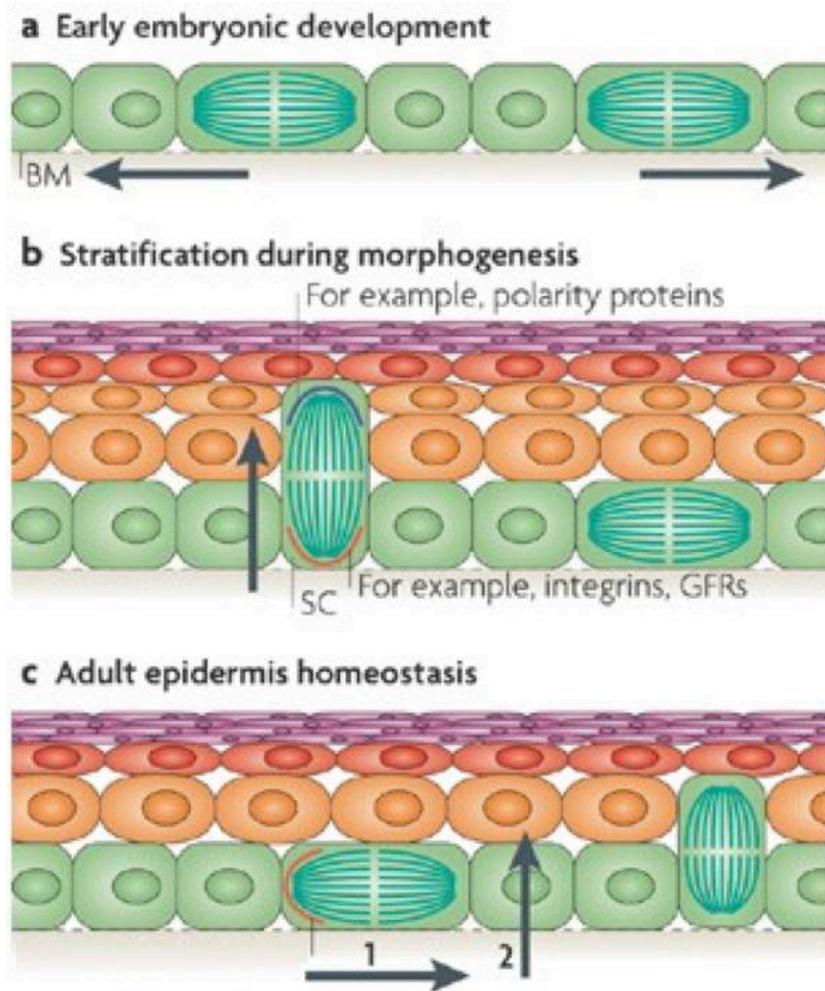


Figure 14: *Stratification de l'épithélium épidermique* (a) Durant l'embryogenèse, les divisions se font dans le plan épithélial. (b) Au cours de la stratification de la peau durant la morphogenèse, deux types de divisions sont observées : des divisions symétriques dans le plan épithélial pour maintenir le pool de cellules souches et des divisions asymétriques orthogonales au plan épithélial avec une cellule passant dans la couche supérieure et entrant en différenciation. (c) Dans le tissu adulte, même si les deux types de divisions peuvent se produire, les divisions se font majoritairement de façon symétrique. *Adapté de Blanpain et Fuchs 2009.*

Et entre dans le processus de kératinisation (expression de transaminases différentielle dans les couches les plus basales puis accumulation de granules de kératine de plus en plus prononcée dans les couches apicales). L'asymétrie de la cellule progénitrice peut être vue au travers de deux facteurs LGN (homologue de Pins et Notch. La perte de LGN, dans la cellule progénitrice n'induit pas une perte de kératinocytes mais ceux-ci ne peuvent plus se stratifier ou se différencier car la voie Notch est impactée. Durant l'embryogenèse, la majorité des divisions se font de manière asymétrique alors que dans la vie adulte ce n'est plus le cas. Mais, à ce stade, si une dérégulation de la prolifération survient, les divisions se font orthogonalement au plan de l'épithélium pour maintenir l'homéostasie (Morrow et al 2019) en limitant le nombre de progéniteurs puisqu'une des cellules filles est contrainte de se différencier, ce qui prévient la surprolifération du tissu.

3.2.3. *Drosophila melanogaster*

Chez la drosophile, de nombreux modèles de divisions asymétriques existent. J'ai choisi de décrire ici les neuroblastes et les cellules souches germinales qui illustrent les différences de mise en place de l'asymétrie. Puis dans la sous partie suivante, les ACD des cellules précurseurs des organes mécano-sensoriels qui sont mon modèle d'étude.

Les neuroblastes délaminent du neurectoderme ventral pendant l'embryogenèse et effectuent jusqu'à 20 divisions asymétriques générant ainsi les neurones qui composent le système nerveux embryonnaire (**Figure 15A**). Les neuroblastes passent ensuite par une phase de quiescence à la fin de l'embryogenèse pour être finalement remobilisés pendant le stade larvaire. Ils effectuent alors une nouvelle vague de divisions asymétriques pour donner naissance aux neurones du futur cerveau adulte. Suite à leur délamination, la division de la plupart des neuroblastes se fait de manière asymétrique générant à la fois un nouveau neuroblaste et une cellule Ganglion Mother Cell (GMC) qui en se divisant à son tour donnera deux cellules différenciées.

Les neuroblastes issus de ces divisions sont caractérisés par une succession d'identités (dans l'ordre: Hb, Svp, Kr, Pdm et Cas) avant de sortir du cycle cellulaire et de se différencier en neurones (Homem et Knoblich et al, 2012). Comme expliquée auparavant, la division des neuroblastes se fait orthogonalement au plan du neurectoderme suite à la mise en place de domaines corticaux. Cette polarisation préfigure la position du futur neuroblaste du côté apical et de la GMC du côté basal, où se trouvent les facteurs BRAT, Miranda, Prospero, Numb et son partenaire PON. La protéine Numb, inhibitrice de la voie Notch (Berdnik et al, 2002, Bhalerao et al 2005) et l'inhibiteur de traduction BRAT (Sonoda and Wharton 2001) s'accumulent transitoirement en fin de prométaphase (Spana et al 1995, Lee et al 2006, Betschinger et al 2006). La localisation asymétrique de BRAT dépend de Miranda (Lee et al, 2006) alors que celle de Numb dépend de la protéine PON (Lu et al 1999, Wang et al 2007). Miranda oriente aussi la localisation symétrique de Prospero, facteur de transcription (Knoblich et al, 1995). Peu après la localisation basale de ces différents facteurs, le fuseau mitotique est mis en place selon l'axe apico-basal permettant ainsi la localisation exclusive des déterminants dans la cellule basale, GMC.

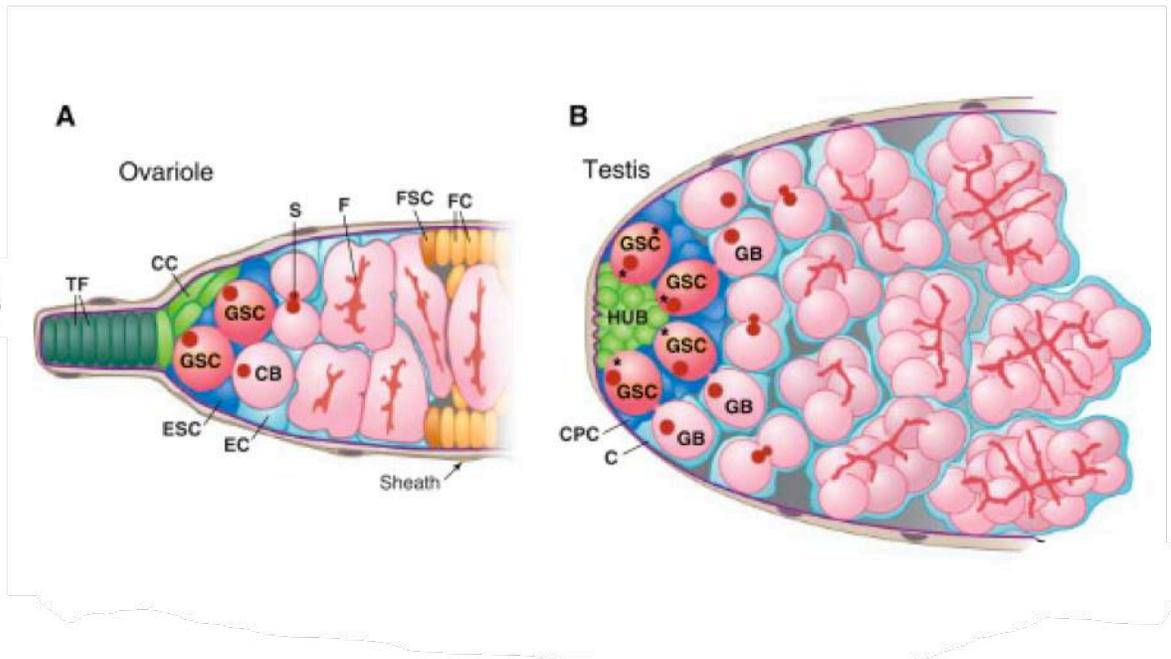
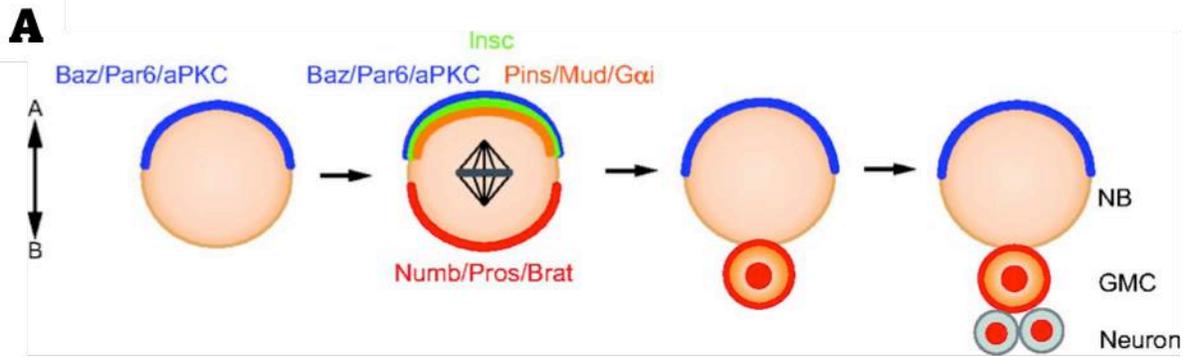


Figure 15: *Divisions asymétriques chez la drosophile: Neuroblastes et cellules souches germinales* **A)** Division asymétrique des neuroblastes selon l'axe A/B. Au pôle apical se localisent Baz/PAR6/aPKC, qui recrutent Insc qui à son tour recrute Pins/Mud/Gai. Au pôle basal, les déterminants Numb, Prospero et Miranda se localisent asymétriquement afin de ségréger uniquement dans la GMC qui en se divisant, donnera des neurones. **B)** Division asymétrique des cellules souches germinales femelle (gauche) et mâle (droite). Les GSC restent liées à la niche et se divisent asymétriquement et orthogonalement à la niche pour donner une cellule souche germinale et un Cystoblaste. L'activation de la voie Dpp/Gbb et JAK-STAT respectivement chez la femelle et chez le mâle permet l'induction des identités entre les cellules filles. A chaque division les cellules filles issues du cystoblaste restent liées entre elles par le fusome (rouge). Adapté de Homem et Knoblich 2012 et Fuller 2007.

Le domaine apical regroupe les protéines aPKC, PAR-6, bazooka, Pins, Gai et Inscuteable ainsi que la protéine Pins qui fixe la protéine Mud. Ce dernier s'associe aux microtubules via la Dynéine et fournit ainsi un site d'attachement cortical aux microtubules astraux permettant l'orientation A/B du fuseau (Siller et al, 2006, Bowman et al 2006).

Les cellules souches germinales (GSC) mâles et femelles de la drosophile sont aussi de beaux exemples de divisions asymétriques dont les destins cellulaires sont dictés par le microenvironnement de la niche (Fuller et Spradling 2007, **Figure 15B**). L'acquisition asymétrique de destins cellulaires intervient après la division de la cellule souche. Chez le mâle comme chez la femelle, les cellules issues de la division d'une cellule germinale qui reste au sein de la niche conservent leur identité GSC alors que celles qui quittent la niche initient leur différenciation. Les interactions cellulaires entre les cellules souches et les cellules de la niche répriment la différenciation des cellules souches et favorisent leur adhésion à l'intérieur de la niche, mais réduit celle des cellules extérieures à la niche ce qui favorise leur différenciation.

Il est à préciser qu'entre mâle et femelle, deux mécanismes différents gouvernent ces divisions. Les GSC femelles sont liées à leurs cellules nourricières (qui forment un épithélium) par des jonctions adhérentes et la signalisation est régulée par la voie Dpp/Gbb alors les GSC mâles aussi liées aux cellules de la niche par des jonctions adhérentes, requièrent la voie de signalisation JAK/STAT. Dans les deux cas, les divisions sont orientées: les GSC mâles se divisent orthogonalement à la niche suite à l'action de l'APC/C et E-Cadhérine. Durant la division des GSC mâles, le centrosome mère s'accroche préférentiellement au pôle proche des cellules de la niche ce qui contraint le centrosome fille dans la cellule fille. Et dans la lignée GSC femelle, Hinnant et al revoient en 2020 les mécanismes en montrant que la division asymétrique de la GSC femelle repose aussi sur l'attachement du fuseau mitotique à un pôle celui proche des cellules de la niche où l'activité Rac est présente et dicte son plan de division. Au contraire des GSC mâles, les cellules souches résultant de la division des GSC femelles, héritent du centrosome fille ainsi que du midbody (Salzmann et al, 2013). Il faut ajouter à cela des structures particulières qui régulent l'orientation des divisions des deux types de GSC: le fusome et le spectroosome sont des structures spécifiques aux GSC (Lin et al, 1995, même si trouvées chez certains lymphocytes) héritées par les cellules filles. Ils régulent l'orientation du fuseau en ancrant un des centrosomes à la membrane et au réseau créé au fil des divisions (Haifan Lin 1997). Le fusome passe à travers les ring canals, canaux qui se forment entre cellules filles, et relie toutes les cellules issues de la division des GSC. Les protéines Baz, aPKC et PAR-1 ont été décrites pour réguler la répartition des facteurs de spécification de la future cellule germinale ainsi que l'établissement du fuseau au pôle opposé des cellules de la niche (Cox et al, 2001).

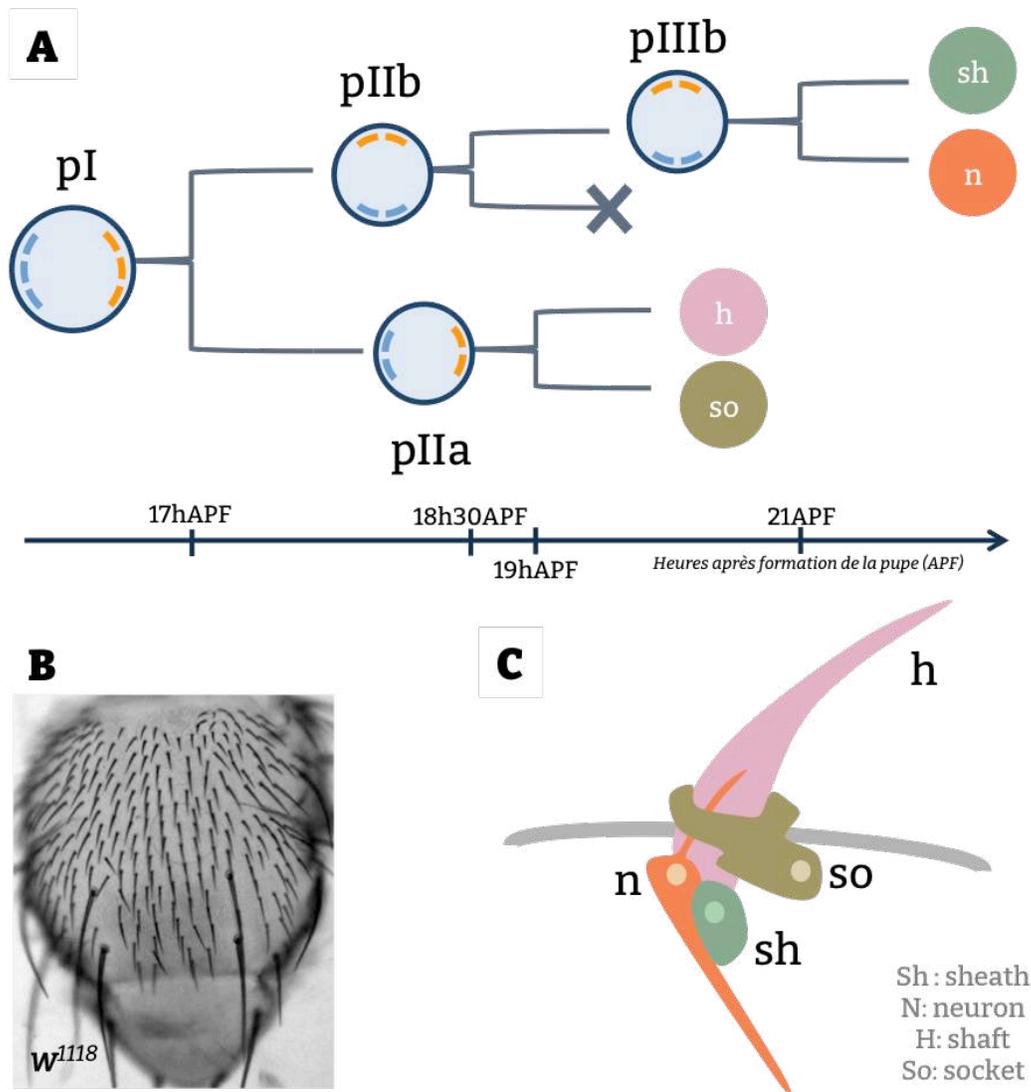


Figure 16: Le lignage cellulaire aboutissant à la formation des soies mécanosensorielles de la drosophile **A)** Lignage cellulaire. La cellule pI se divise asymétrique à 17h APF selon le plan de l'épithélium et donne deux cellules précurseurs secondaires pIIa et pIIb. pIIb se divise à 19h APF orthogonalement au plan de l'épithélium pour donner une cellule vouée à mourir, la cellule gliale et le précurseur tertiaire pIIIb. pIIIb se divise orthogonalement au plan de l'épithélium pour donner les cellules de gaine (sheath, sh) et le neurone (n). pIIa se divise à 21h APF pour donner les cellules qui forment les structures externes de l'organe: la soie (h) et la cellule socle (so). Il y a une activation différentielle de Notch à chaque ACD dans les cellules (pIIb, pIIIb, les cellules gaine et socle sont Notch positives) Croissants orange et bleu: répartition différentielle des déterminants suivant l'orientation des ACD: planaires pour Pi et PIIa et orthogonales au plan épithélial pour pIIb et pIIIb. **B)** Organisation des organes mécanosensoriels sur le thorax adulte d'une drosophile. Elles sont orientées selon l'axe A/P et organisées en ligne sur chacun des hémithorax selon 5 rangées. Elles apparaissent sous deux formes, les petites soies (microchaetes) et les grandes soies (macrochaetes) localisées selon un profil spécifique sur le thorax. **C)** Schéma de l'organe final. Les cellules terminales externes issues de pIIa sont la soie (rose), la socle (kaki), et les cellules terminales issues de la division de pIIIb sont le neurone (orange) et la gaine (verte). Adapté de Gho et al, 1999.

3.3. Le modèle du lignage des soies de la drosophile

Le lignage des organes mécanosensoriels du système nerveux périphérique de la drosophile est une succession de quatre divisions asymétriques se produisant lors du stade pupal (**Figure 16A**). C'est un modèle d'études d'ACD de choix par son accessibilité, sa temporalité précise et sa compréhension très étendue. L'organe final est composé de quatre cellules aux identités et aux formes caractéristiques et distinctes: la soie, la gaine, la cellule socle et le neurone (**Figure 16C**). Les organes mécanosensoriels sont suspectés de transmettre des signaux pour que l'animal se repère dans l'espace. Ces organes sensoriels recouvrent tout le corps de l'animal, mais les plus étudiés restent ceux localisés sur le thorax dorsal dit notum: des soies de petite et grande tailles nommées respectivement micro- et macro-chaetes. Répartis sur 5 lignes rangées de part et d'autre de la ligne médiane dans la région centrale du notum, se trouvent les microchaetes et sur les bords du notum, sont disposés les macrochaetes dont leur formation précède de quelques heures celle des microchaetes (**Figure 16B**).

3.3.1. Lignage cellulaire

La division des cellules précurseurs des organes mécanosensoriels du nota se déroule lors du stade pupal de l'animal après sélection des cellules pI par des vagues de gradients d'inhibition latérale (Delta puis Notch, Shard et al, 2020) vers 10h après formation de la puppe (à 25°C, APF). Les cellules pI sont alors arrêtées en G2 et vers 17h APF, les cellules pI reprennent le cycle cellulaire et subissent une séquence stéréotypée de divisions générant le lignage (Gho et al, 1999). Bien que toutes les divisions des cellules pI ne soient pas parfaitement synchrones, la reprise des mitoses se fait selon une vague se propageant vers les extrémités antérieure et postérieure de chaque rangée (Lacoste et al, en préparation).

La cellule pI, précurseur du lignage, se divise dans le plan de l'épithélium le long l'axe A/P avec une légère inclinaison, appelée tilt, selon l'axe A/B pour former les deux précurseurs secondaires pIIa et pIIb. Les axes de division de la cellule pI font que la cellule fille pIIb est localisée du côté antérieur et légèrement plus basale que la cellule fille pIIa, qui se retrouve en position postérieure apicale. Ensuite, pIIb se divise vers 18h30 APF, puis une demi-heure après à 25°C la cellule pIIa se divise à son tour. pIIb donne une cellule précurseur pIIIb (qui se divisera à 21h APF) et une seconde cellule, gliale, vouée à mourir très peu de temps après sa formation (Fichelson et Gho, 2003). La cellule pIIb se divise orthogonalement au plan de l'épithélium, comme pIIIb. pIIa au contraire se divise comme pI, avec un léger tilt dans le plan de l'épithélium. Sa division résulte en deux cellules filles, la socle et la future soie, qui forment la partie extérieure de l'organe. Les cellules filles de pIIIb donnent la partie interne de l'organe à savoir le neurone et la gaine (Gho 1999).

Au cours du lignage, les phases du cycle cellulaire sont parfaitement caractérisées. Ainsi, pI est d'abord arrêtée en G2. La phase G1 est absente du cycle cellulaire de ses cellules filles qui entrent en phase S dès la fin de la télophase de la division pI. La division de pIIIb présente quant à elle, une phase G1 très courte d'environ 15 min. Après la division de pIIa, la cellule soie et la cellule socle vont effectuer plusieurs cycles d'endoréplication et

devenir polyploïdes (Audibert et al 2005). Des expériences d'incorporation de BrdU ont montré que les endocycles sont asynchrones dans les deux cellules. La cellule de la soie est la première à entrer en phase S (à environ 22h APF) suivie par la cellule socle (à environ 23h APF, Sallé et al 2012).

3.3.2. Mise en place des identités cellulaires

Cinq identités cellulaires différentes sont acquises lors de la formation des organes mécanosensoriels. Un des vecteurs de cette diversité est l'activation différentielle de la voie Notch entre chaque cellule fille. Cette voie de signalisation est très courante pour déterminer les destins cellulaires: chez *C. elegans* les homologues Glp-1, Lin-12 de Notch interagissent avec APX-1 comme expliqué au début de ce chapitre. Elle est aussi impliquée dans la neurogenèse chez la souris (Jossin 2020). La voie Notch se caractérise par l'activation du récepteur Notch par son ligand Delta ou Serrate, porté par la cellule adjacente. Notch et Delta sont deux protéines transmembranaires qui interagissent par leurs domaines extracellulaires (**Figure 17**). Cette interaction va enclencher le clivage de la partie cytoplasmique du récepteur Notch. Cette partie de la protéine, appelée NICD, va alors être importée dans le noyau pour lever l'inhibition des cibles de la voie qui est médié par un complexe Su(H)-CoR (Suppressor of Hairless, facteur de transcription de la famille CSL associé à des co-répresseur, Schweisguth 2004). La partie extracellulaire de Notch (NECD) soit n'est plus accrochée au récepteur à la membrane plasmique, soit est relarguée dans l'espace extracellulaire, soit reste liée à Delta et est endocytée avec Delta dans la cellule pIIb, c'est ce qui est appelé 'transendocytose de NECD par Delta. La voie Notch possède de nombreux régulateurs dont Numb et Neuralized.

Dans le lignage des soies de la drosophile, une perte de fonction continue de Notch entraîne en premier la transformation de pIIa en pIIb puis des changements d'identité de ses descendants de sorte que l'organe final n'est composé que de neurones (Hartenstein et Posakony 1990). Au contraire le gain de fonction de Notch dans pIIb transforme celle-ci en pIIa et les cellules produites sont des soies et des socles (Guo et al 1996). On note l'importance de l'alternance de l'activation de cette voie pour la génération de la diversité dans un organisme.

Suite à la division de pI, parmi les déterminants qui vont s'accumuler spécifiquement dans pIIb se trouvent deux modulateurs de la voie Notch: Numb et Neuralized. Cette répartition asymétrique se retrouve aussi lors des divisions des autres précurseurs (pIIb, pIIa et pIIIb). En contexte *numb* mutant pIIb adopte un destin pIIa, mimant les phénotypes d'expression ectopique de Notch dans pIIb. De plus, la protéine Partner of Numb (PON) recrute Numb au pôle basal antérieur de la cellule pI permettant leurs ségrégations dans la cellule fille pIIb (Lu et al 1998 et 1999, Schweisguth 2015). Ceci indique que Numb agit en inhibant la voie Notch dans pIIb.

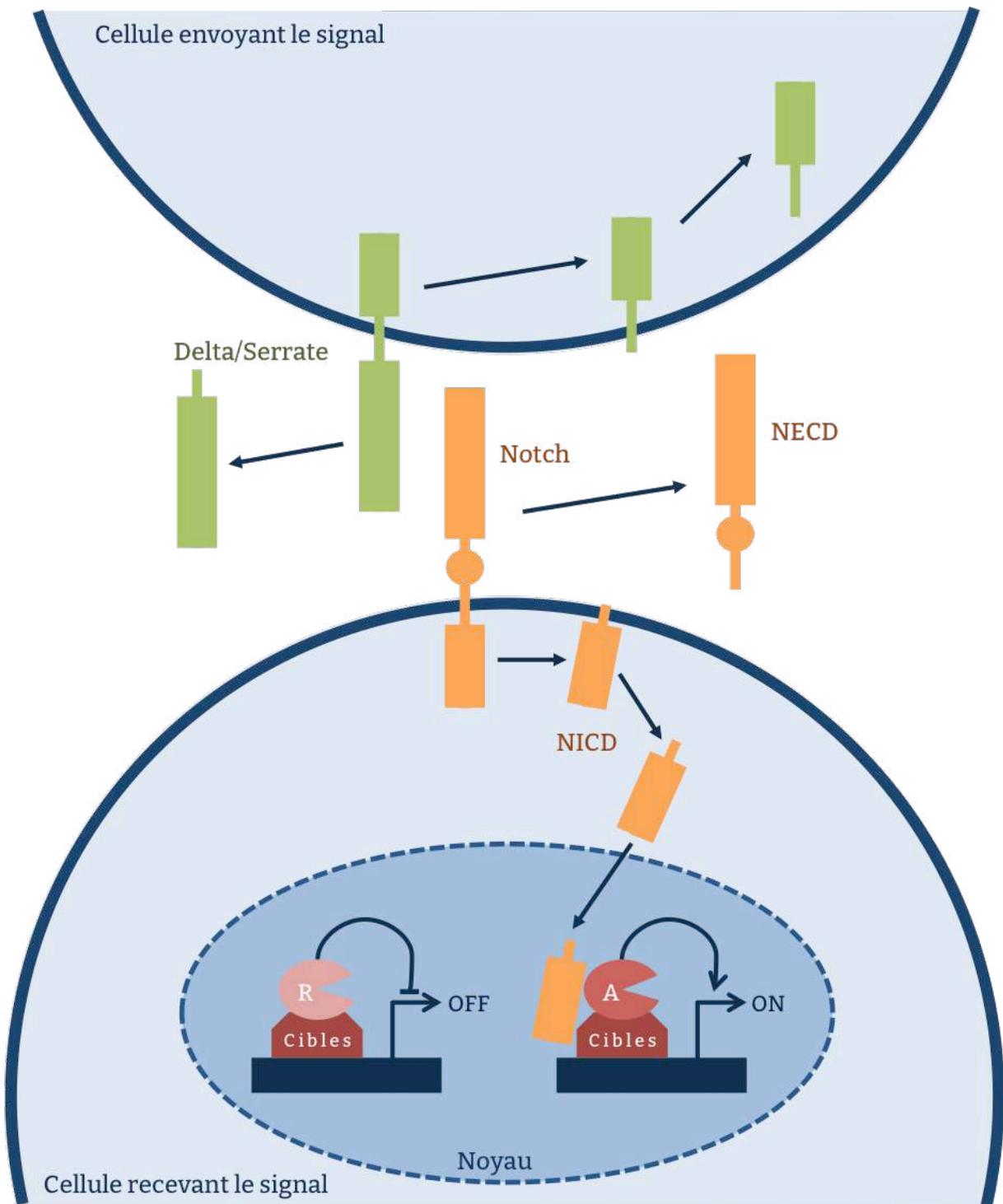


Figure 17: *Voie de signalisation Notch* Après son interaction avec Delta (ou Serrate) via son domaine extracellulaire NCED, le récepteur Notch subit deux clivages protéolytiques qui libèrent son domaine intracellulaire, NICD. Celui-ci est alors transloqué dans le noyau, où il promeut la transformation du complexe répresseur, en un complexe activateur permettant de promouvoir l'activation de gènes cible de la voie. *Adapté de Langevin et al, 2005*

Ainsi, il est proposé que dans pIIb où la voie Notch est inhibée, Notch est endocytosé avec Sanpodo (spécifique du lignage), celui-ci interagissant avec Numb qui va alors inhiber le recyclage du complexe Notch/Sanpodo à la membrane, ce qui permet d'inhiber la voie Notch dans pIIb. Neuralized, identifié par Le Borgne et Schweisguth en 2003, agit aussi sur la voie Notch mais sa perte de fonction induit un phénotype à l'opposé de l'altération de Numb. La perte de fonction *numb* conduit à un organe formé uniquement de socle, alors que celle de *neuralized* conduit à la formation de neurones. Tout comme Numb, Neuralized est hérité par pIIb suite à la division de la cellule pI, indiquant que Neuralized agit dans la cellule pIIb pour activer la voie Notch dans la cellule pIIa. Cet effet est régulé par l'endocytose de Delta dans pIIb ce qui promeut la transactivation de Notch dans pIIa. Le maintien de l'identité neurale passe aussi par les facteurs Escargot et Scratch (Ramat et al 2016). Ces deux protéines agissent de manière redondante pour contrôler l'identité cellulaire dans la partie neurale du lignage en maintenant l'état off de la voie Notch dans ces cellules. Pour ce faire, Escargot et Snail réprime la transcription des gènes activés par Notch en se liant à leur promoteur en déplaçant les facteurs de transcription de la voie Notch. Ceci dans le but de moduler toute montée d'activité de la voie Notch.

3.3.3. Orientation des divisions du lignage

Le lignage cellulaire aboutissant à la formation des soies mécanosensorielles est un excellent modèle d'étude de l'orientation des divisions au sein d'un épithélium. Comme énoncé précédemment, la polarité des divisions est différente selon les divisions: avec les précurseurs pI et pIIa qui se divisent dans le plan de l'épithélium suivant l'axe A/P avec un tilt le long de l'axe A/B (entre 10 et 20°) alors que les précurseurs pIIb et pIIIb se divisent orthogonalement au plan de l'épithélium selon l'axe A/B en pointant généralement vers le postérieur. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'orientation de ces divisions ont été intensivement étudiés lors de la division du précurseur pI et ont montré l'implication de la voie de la PCP dans le contrôle de l'orientation selon l'axe A/P ainsi que selon l'axe A/B où elle agit en opposé avec le module Pins/Disc Large/G*li*. De façon schématique, l'orientation de la division de pI repose sur un équilibre de forces générées entre le pôle postérieur/apical où le complexe Frizzled/Dishevelled/Dgo est décrit pour recruter la machinerie de tension du fuseau et le pôle antérieur/basal où le complexe Pins/Disc Large/G*li* recrute cette même machinerie.

L'étude des phénotypes de perte de fonction de ces deux complexes permet de décrire cet équilibre de forces, les données de la littérature ont pu révéler que cet équilibre était asymétrique lui aussi. Pour le comprendre, il faut opposer *pins* et *frizzled*. Leur perte de fonction conduit à des phénotypes opposés. Ainsi, la perte de fonction *frizzled*, conduit à une perte du tilt selon l'axe A/B conduisant à un aplatissement de l'orientation de la division. Alors que la perte de fonction *pins* (ou *g*li**), induit un redressement du fuseau (David et al 2005, Segalen et al 2010 **Figure 18**). Ceci montre que la force générée au pôle apical est plus forte que celle générée au pôle basal. Ce qui est confirmé par la double perte de fonction *pins* et *frizzled* résultant en une orientation de division de pI parallèle au plan épithélial, comme *frizzled*. Cependant cela sous entend aussi qu'une autre voie

participerait dans l'orientation de la division pour qu'elle ne soit pas totalement randomisée. Nonobstant, ce qui est surprenant est que la perte de fonction du partenaire majeur de *Frizzled*, *dishevelled* ne produit pas le même phénotype que celui-ci selon l'axe A/B. Cela se traduit par une réduction de la taille des angles de la division mais surtout à une randomisation plus prononcée de la distribution, avec dans 40% des cas une inversion de position entre les cellules filles selon l'axe A/B (correspondant aux angles négatifs) montré dans **A** et **B** de **Figure 18**. Cette différence d'orientation est notable mais n'est pas vraiment adressée dans la littérature. Elle peut s'expliquer par le fait que la perte de fonction *frizzled* induit une relocalisation uniforme de *Dishevelled* au cortex et donc de la machinerie du fuseau. Alors que la mutation *dsh¹* utilisée dans la publication impacte totalement la fonction *dishevelled* dans la PCP et ne permet pas de recruter la machinerie du fuseau. Aussi en perte de fonction *dishevelled*, il y a un étalement du croissant basal de *pins* ce qui déséquilibre les forces. Par contre selon l'axe A/P, la différence n'est pas aussi tranchée, il faut comparer **D** et **E** de la **Figure 18**: la perte de fonction *dishevelled* induit le même phénotype que celle de *frizzled* (même si la dispersion est moins étendue) et l'orientation de la division est randomisée dans les deux cas. Cette donnée complexifie le système: comment expliquer que les facteurs de la PCP aient des actions différentes selon les axes de polarité? La première hypothèse serait qu'en fonction du facteur de la PCP affecté, il y a une répercussion sur le recrutement de la machinerie du fuseau et une induction d'un déséquilibre sur la force basale. Une seconde hypothèse serait qu'il existe d'autres facteurs et voies plus ou moins accessoires pour réguler l'orientation des divisions en plus de la PCP pour sécuriser l'orientation de cette ACD.

L'orientation de la division de pIIb au contraire ne repose pas sur la PCP: l'orientation orthogonale au plan de l'épithélium de sa division est donnée par un point d'ancrage défini par une accumulation de la E-Cadhérine au pôle apical de la cellule et par la localisation du complexe Bazooka/Inscuteable au pôle basal (Le Borgne et al, 2002, Roegiers et al 2001). L'asymétrie de tailles entre ces cellules filles est beaucoup plus prononcée avec la cellule pIIb plus grosse que la cellule destinée à mourir. Il y a aussi une asymétrie au niveau du fuseau mitotique dans cette cellule où le centrosome apical est plus enrichi en microtubules que le basal en télophase (asymétrie faible en pI) découlant du fait que le pied apical de pIIb est très petit et enclavé dans celui de pIIa (Roegiers et al, 2001). Ici les différences d'orientation de fuseau selon l'axe A/B peuvent s'expliquer par le fait que les précurseurs neuraux (pIIb et pIIIb) vont donner des cellules qui vont par la suite délaminer de la lame basale pour former le neurone et la glie, les cellules internes de l'organe. pIIa est décrit dans Le Borgne et al 2002 pour avoir une orientation comme pI selon le plan épithélial, d'ailleurs les cellules pIIa ont tendance à suivre la même orientation selon l'axe A/P que leur cellule mère pI. Et l'orientation de pIIa selon cet axe dépend aussi de ce pied de Cadhérine (voir **Résultats supplémentaires**).

Le contrôle de l'orientation de la division reste le fer de lance d'une division asymétrique réussie. Et cela passe par l'organisation du fuseau mitotique.

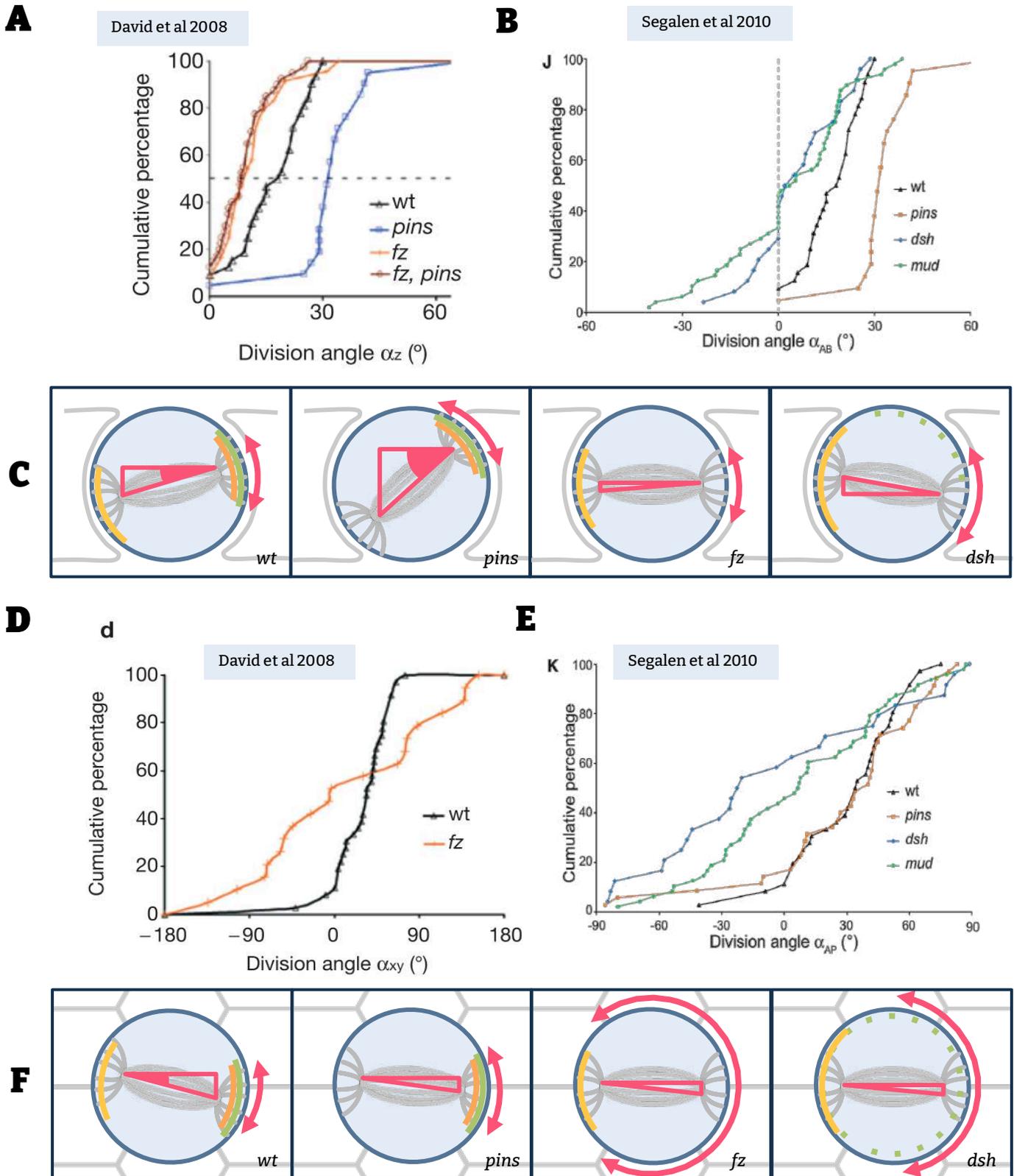


Figure 18: Analyses de l'orientation de la division de pI en contexte mutant pour des facteurs de la PCP **A et B)** Graphes cumulatifs représentant les angles de divisions de pI (abscisse) selon l'axe A/B (az) en fonction de leur pourcentage cumulatif (ordonné) **A)** contextes mutant *pins*, *fz* et *fz, pins* (respectivement courbe bleu, orange et marron) et **B)** *pins*, *dsh* et *mud* (respectivement courbe orange, bleue et verte). **A)** En contexte *fz* mutant, les divisions sont plates, se faisant plus dans le plan que chez le contrôle alors qu'en contexte mutant *pins* elles sont redressées c'est à dire plus perpendiculaire au plan de l'épithélium. Cela montrant que la force générée par *Frizzled* est plus forte que celle de *Pins* (montrée aussi en *dsh* mutant). **B)** En contexte mutant *dsh* les angles sont plus randomisés et leur amplitude est plus grande ce qui peut conduire à une inversion de la location des deux cellules filles selon l'axe A/B. **C)** Représentation schématique de l'orientation du fuseau mitotique de pI selon l'axe A/B en différents contextes mutants. L'absence de *pins* redresse le fuseau, alors que la division est plate en contexte *fz* mutant et l'orientation des divisions est randomisée pouvant même être inversée en contexte *dsh* mutant. **D et E)** Graphes cumulatifs représentant les angles de divisions de pI selon l'axe A/P en contexte mutant pour *fz* (courbe orange **C)** et en **E)** pour *pins*, *dsh* et *mud* (respectivement courbes orange, bleue et verte). En contexte mutant *fz* (**D)** et *dsh* (**E)**, l'orientation des divisions est randomisée, celles-ci ne se font plus en suivant l'axe A/P, par contre la perte de fonction *pins* n'influe pas sur l'orientation A/P. **F)** Représentation schématique de l'orientation du fuseau mitotique de pI selon l'axe A/P en différents contextes mutants. La perte de fonction *pins* ne perturbe pas l'orientation de la division selon l'axe A/P, celle de *fz* induit une randomisation de l'orientation de la division de pI. Il en est de même pour la perte de fonction *dsh*. Notez les phénotypes *mud*, qui sont similaires à ceux observés en perte de fonction *dsh* induisent une randomisation de l'orientation des divisions selon l'axe A/P et un aplatissement des divisions selon l'axe A/B. Adapté de Segalen 2010 et David 2008.

4. Orientation du fuseau mitotique

L'orientation du fuseau mitotique est cruciale lors des ACD et pour l'homéostasie des épithélia. Malgré la répartition asymétrique des déterminants, un défaut dans l'orientation du fuseau mitotique perturbe l'alignement de celui-ci avec les domaines corticaux. La conséquence est la perte de la répartition asymétrique des déterminants, comme dans 3% des mutants *mud* dans les neuroblastes où une mauvaise répartition de Baz et Mira est observée (Cabernard et Doe 2009). L'orientation du fuseau mitotique est aussi important lors des divisions symétriques pour que les deux cellules filles restent dans le même tissu, même si dans le cas des épithélia, une cellule fille sortant du tissu est souvent réintégrée (Bergstralh et al 2015) ou extrudée et destinée à mourir, comme dans le disque imaginal de l'aile de la drosophile (Nakajima et al 2013).

4.1. L'orientation des divisions au sein des épithélia

4.1.1. Structure et fonction

Les tissus épithéliaux tapissent la surface extérieure du corps et des organes, ainsi que la surface intérieure des vaisseaux sanguins et des cavités de nombreux organes creux, formant une barrière de perméabilité entre deux types d'environnements différents. Plusieurs types d'agencement cellulaires existent entre les épithélia à simple couche cellulaire et ceux à plusieurs couches. Ces cellules peuvent avoir plusieurs formes: pavimentaires, cuboïdes ou cylindriques. Les multicouches cellulaires peuvent former des épithélia pseudo-stratifiés où toutes les cellules sont liées à la lame basale mais où leurs surfaces apicales n'ont pas la même hauteur ou alors des épithélia stratifiés comme le derme où les différentes couches ne reposent pas toutes sur la lame basale (**Figure 19**).

Les épithélia peuvent avoir des fonctions d'échanges et de réception de signaux sensoriels. Pour remplir ce rôle de barrière et d'échanges avec le reste de l'organisme, les cellules formant ce tissu présentent toutes une polarité apico-basale et souvent aussi une polarité planaire sous le contrôle de la PCP définie précédemment. Chacune des cellules épithéliales est jointe à ses voisines par des jonctions serrées ainsi que par des jonctions adhérentes stabilisées par des E-Cadhérine et Caténines (α et β). Dans les cellules épithéliales de drosophile, un type équivalent de jonction serrées a été décrit correspondant aux jonctions septées dont deux types existent: les plissées qui sont trouvées dans les épithélia dérivés de l'ectoderme (épiderme, trachées ou disques imaginaires) et les lisses dans les épithélia dérivés de l'endoderme. Chez la drosophile, les jonctions septées sont localisées à la membrane latérale, juste sous la ceinture des jonctions adhérentes et sont composées d'une vingtaine de composants incluant des protéines transmembranaires, des protéines cytoplasmiques dont le module Scribble/Disc Large/Lethal Giant larvae et des protéines régulant l'assemblage de ces jonctions (Furuse, 2014).

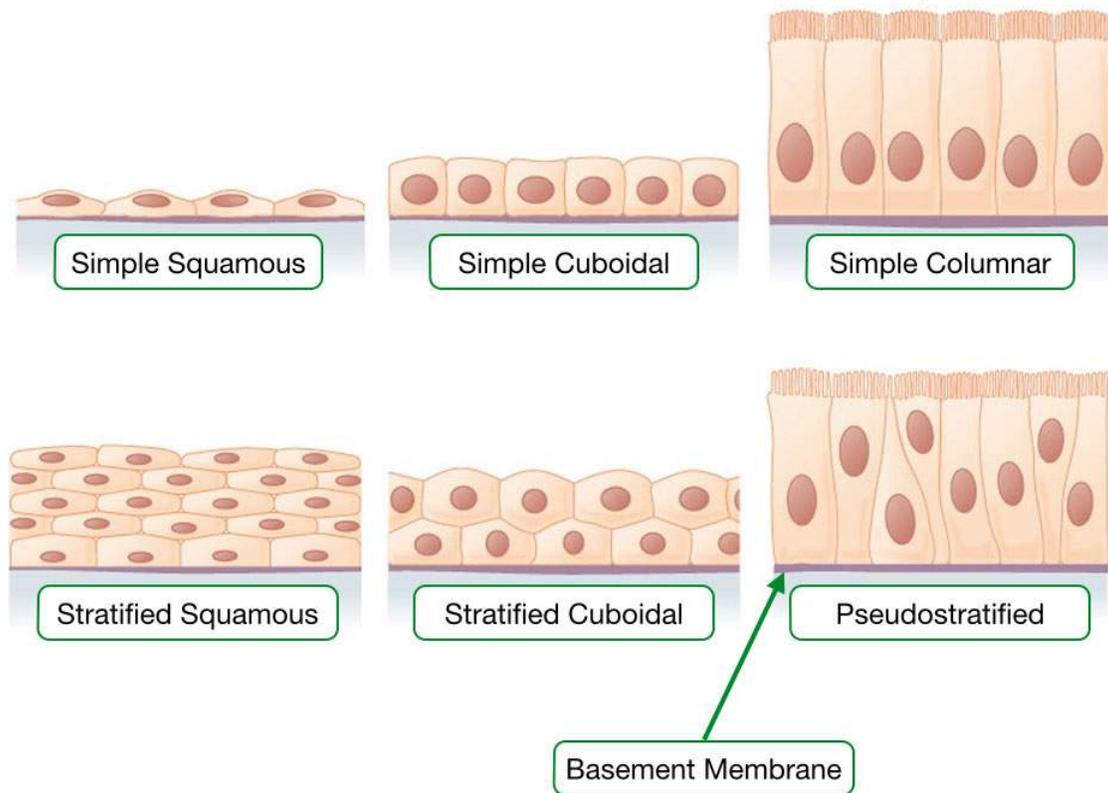


Figure 19: Différents types d'épithélia Les cellules épithéliales peuvent se trouver sous différentes formes: squameuses, cuboïdes ou colonnaires, et être organisées en simple couche (figure du haut) ou en multiple couches formant des épithélia squameux stratifiés ou stratifiés cuboidal. Dans ces deux organisations, les cellules apicales n'ont plus accès à la lame basale. Un dernier type d'organisation correspond aux épithélia pseudostratifiés, où les cellules ont toutes un accès à la lame basale et ont toutes la même hauteur. *Adapté de Anatomy & Physiology 2013.*

Deux types de divisions sont observées dans les épithélia correspondant aux divisions des différents types cellulaires qui les forment: les divisions symétriques qui correspondent aux cellules épithéliales qui font la structure générale du tissu et des divisions asymétriques qui forment des organes spéciaux au sein des épithélia comme les soies mécanosensorielles de la drosophile ou ceux du zebrafish. Chacune de ces divisions peut dépendre d'un axe de polarité différent. Le contrôle de ces orientations est crucial pour le développement et le maintien de l'intégrité du tissu et des organes présents en son sein.

4.1.2. Orientations de divisions au sein des épithélia

Le contrôle de l'orientation des divisions au sein des épithélia est donc crucial et peut être illustré par l'exemple de l'épithélium gastro-intestinal qui de plus est assez intéressant par sa géométrie. Au creux des microvillosités, se trouve la crypte où se divisent les cellules souches selon l'axe de l'épithélium qui tapisse les microvillosités. Au cours de leur vie, les cellules de cet épithélium vont se diviser selon le plan épithélial puis vont se déplacer selon le même axe, poussées au rythme des divisions pour ensuite être extrudées en arrivant au sommet de la microvillosité pour assurer un renouvellement de cellules constant. Le maintien de cet épithélium est crucial pour l'animal, Hu et Jasper 2019 expliquent le rôle critique de l'orientation des divisions qui régulent le destin cellulaire et où la division asymétrique est cruciale pour la prolifération (soutenu par Sei et al, 2019).

Aussi, les progéniteurs neuraux des vertébrés forment un réservoir qui s'apparente à un épithélium pseudostratifié polarisé selon l'axe A/P, et les futurs neurones sont produits par divisions asymétrique ou symétrique (**Figure 20**). Le destin cellulaire et l'orientation du fuseau mitotique par rapport à l'orientation de l'épithélium sont liés: dans le cas d'une division symétrique, l'axe du fuseau est parallèle à la lame (zone ventriculaire) offrant aux deux cellules filles, un pied apical. Dans le cas d'une division asymétrique, l'axe du fuseau est plus orthogonal à la lame et une des cellules filles perd son ancrage apical et migre vers la partie basale du tissu (zone neuronale). Dans le premier cas, les deux cellules filles gardent leur identité progénitrice alors que dans le second, seule une cellule fille conserve cette identité alors que l'autre cellule fille acquiert une identité neuronale. Xavier Morin en 2007 montre, durant le développement de l'embryon du poulet, que la perte de fonction *lgn* favorise la délamination des cellules filles par randomisation du fuseau et dans certains cas ces cellules délaminées mais issues de divisions symétriques vont proliférer dans la zone neurale de façon abérante. Ceci montre l'importance du contrôle de l'orientation des divisions dans l'homéostasie épithéliale.

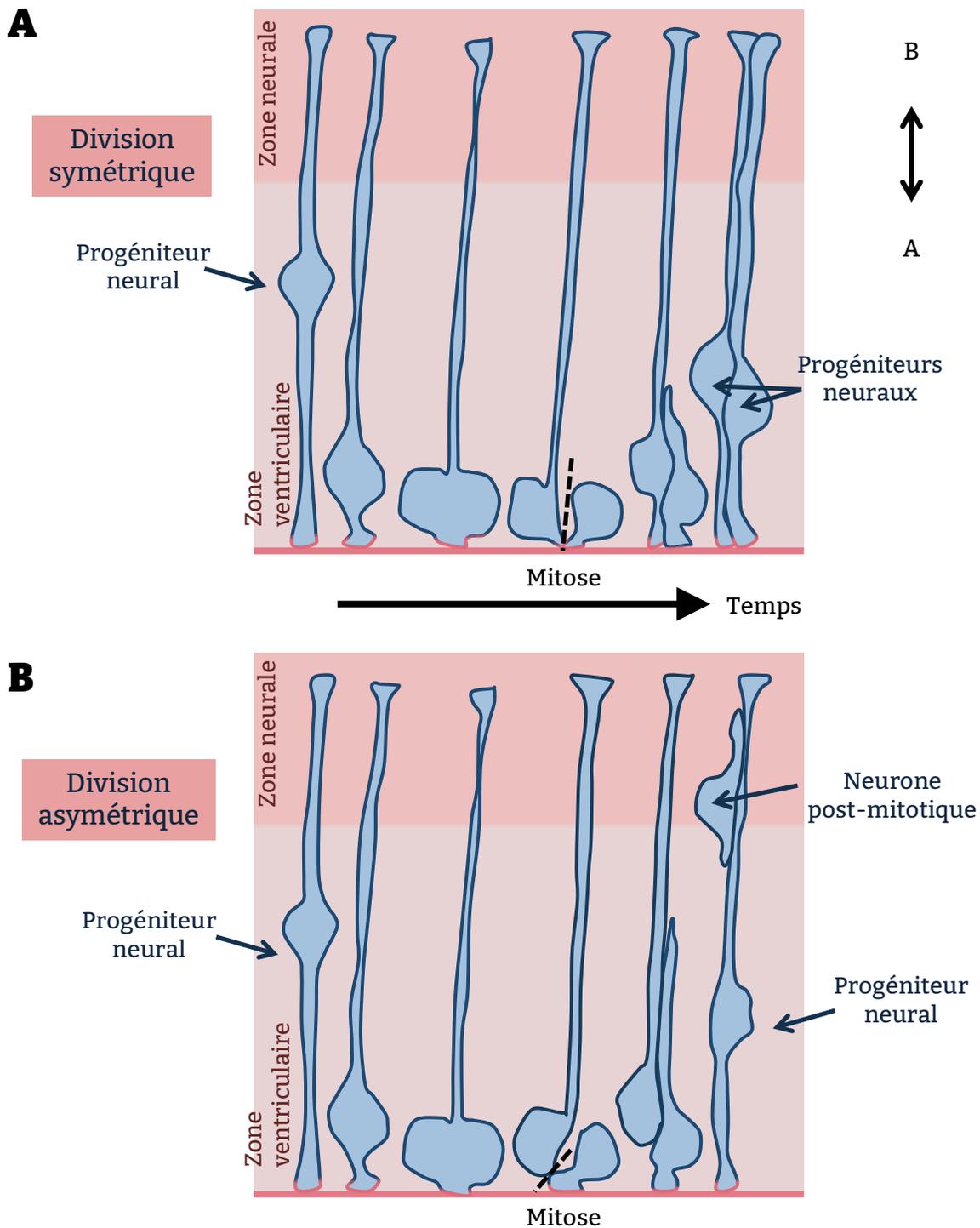


Figure 20: Neurogenèse des vertébrés **A)** Division symétrique des progéniteurs neuraux. La cellule mère se divise parallèlement à la lame basale de telle sorte que les deux cellules filles gardent un ancrage à la membrane ainsi qu'une identité de progéniteurs neuraux. **B)** La cellule mère se divise de façon à ce qu'une cellule fille perde son ancrage à la membrane apicale. Celle-ci se décroche et quitte la zone ventriculaire pour la zone neurale afin d'adopter une identité de neurone. L'autre cellule fille reste attachée à la membrane et maintient une identité de progéniteur neural. *Adapté de Morin et al, 2007.*

Dans le neuroépithélium de la drosophile, l'orientation des divisions des neuroblastes est dictée par la protéine Pins et certaines protéines PAR et celles des cellules épithéliales autour par les jonctions cellulaires via les protéines APC et EB1 (Lu et Al, 2001), donc de façon indépendante de la PCP. De même, Lovegrove en 2019 explique que l'épithélium folliculaire se polarise suivant un signal basal donné par les intégrines comme proposé aussi par Hynes en 2002. En 2007 Fernandez-Minan, aussi propose en plus que la division des cellules épithéliales de l'épithélium folliculaire se fait selon l'axe A/P grâce aux intégrines et que la perte de fonction de l'intégrine Myosphéroïd n'impacte pas l'orientation du fuseau mitotique. Ce qu'avait déjà montré Bergstrahl en 2013 en montrant que c'était bien Disc Large qui en plus de son rôle dans la polarité des cellules joue un rôle dans cet épithélium comme dans les neuroblastes pour recruter Pins et Mud. La perte d'intégrines, elle, conduit à la multiplication des couches de cellules. Dans ce cas, le trio Disc Large/Mud/Pins oriente le fuseau mitotique dans une direction opposée à celle du neuroblaste.

Dans l'épithélium dorsal du notum des drosophiles, orientées selon l'axe A/P par la PCP, les cellules épithéliales et les cellules précurseurs des organes mécanosensoriels présentent aussi des modes de divisions distincts, symétrique et asymétrique. La polarité des cellules épithéliales est dirigée par les facteurs de la PCP, et la contrepartie LGN/Pins/Insc est aussi présente pour recruter Mud et Dynéine aux pôles de la cellule. Pour autant, Bergstrahl & St Johnston (2016) ont mis en exergue que la perte de fonction des facteurs de aPKC, Disc Large et Pins n'avait pas d'effets sur la localisation de Mud et sur l'orientation des fuseaux. Ainsi, ils proposent que d'autres systèmes soient mis en place pour le recrutement de Mud/Dynéine, soulignant la robustesse du maintien de l'homéostasie épithéliale. L'étude propose qu'au sein des épithélia, les cellules qui subissent une division mal orientée sont extrudées (Bergstrahl 2015 et Nakajima 2013) et ne possèdent pas de jonctions septées matures contrairement aux cellules de l'épithélium du notum pupal qui possèdent des jonctions matures et des jonctions tri-cellulaires. Ainsi, à l'aide de modélisations, B. Bosveld (2016) propose que les jonctions tri-cellulaires servent de marqueurs aux cellules épithéliales pour «retenir» leur orientation et orienter le fuseau mitotique grâce à la localisation de la protéine Mud au niveau de ces jonctions. Cette organisation permettrait aux cellules épithéliales de se diviser dans le plan de l'épithélium. Ils en viennent à prédire l'orientation des divisions pour répondre à la loi d'Hertwig qui postule que les cellules vont préférentiellement se diviser selon leur plus grand axe. Au sein du notum, les ACD sont celles du lignage des soies mécanosensibles décrit précédemment.

L'orientation des divisions au sein des épithélia est intrinsèquement liée aux destins cellulaires des cellules filles (ACD ou non). Cette orientation dépend des voies moléculaires qui polarisent les cellules mais aussi surtout de la machinerie du fuseau mitotique décrite dans la partie suivante.

4.2. Mécanismes moléculaires régulant l'orientation du fuseau mitotique

4.2.1. Contrôle de la division par les centrosomes et microtubules

Le fuseau mitotique est un réseau organisé de microtubules qui se met en place au moment de la prophase suite à la réorganisation des microtubules. Les microtubules sont organisés à partir des centrosomes, structures composées de deux centrioles faits d'anneaux de tubuline β et de matériel péri-centriolaire. Les centrosomes se dupliquent lors de la phase S du cycle cellulaire et à l'instar du matériel génétique, sont composés d'un centriole mère et d'un centriole fille (**Figure 21**).

Lors de la formation du fuseau mitotique, vont partir, depuis les centrosomes, plusieurs types de microtubules (tous formés de tubuline β et α) définis par le point d'ancrage de leur extrémité (+), l'extrémité (-) étant attachée aux centrosomes: Les microtubules astraux ancrent les centrosomes au cortex de la cellule.

Les microtubules kinétochoriens s'ancrent sur les kinétochores des chromosomes pour les accrocher et permettre la séparation des chromatides soeurs équitablement. Et enfin, les microtubules polaires qui rejoignent les deux centrosomes pour induire une tension repoussant les deux centrosomes vers les pôles de la cellule. Les microtubules kinétochoriens et polaires sont cruciaux pour la séparation équitable des chromatides et les microtubules astraux pour positionner et maintenir le fuseau dans la cellule. Les microtubules sont définis comme des éléments instables en oscillation continue entre polymérisation et dépolymérisation.

Du fait de leur rôle dans la formation et le maintien du fuseau mitotique, il est attendu que les centrosomes soit une structure importante dans le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique. Ainsi, l'équipe de Renata Basto en 2006 a montré que la mutation du gène *sas4* (codant une protéine requise pour la duplication des centrosomes) cause une perte de l'orientation de la division des neuroblastes de la drosophile ce qui conduit dans certains cas à une mauvaise répartition du facteur de détermination Miranda entre les deux cellules filles. Il en est de même lors des ACD chez les mammifères où un dysfonctionnement des centrosomes conduit à une neuropathologie telle que la microcéphalie (Nano et Basto 2017). Par ailleurs, il a été montré dans les cellules souches germinales mâles de la drosophile que la mutation de la protéine centrosomine (composant essentiel des centrosomes) induit une mauvaise disposition des centrosomes conduisant à des défauts d'orientation des divisions (Yamashita et Fuller, 2007). Le positionnement des centrosomes est donc important et de plus il est peut être dépendant des facteurs de polarité: Inaba et al 2015 montre, dans les cellules germinales de la drosophile, que le centrosome apical interagit avec Bazooka et que cette interaction est cruciale pour passer le checkpoint de l'alignement des centrosomes. En effet, la perte de fonction *bazooka* influence l'ancrage apical du centrosome et sa surexpression induit des points d'ancrage surnuméraires des centrosomes.

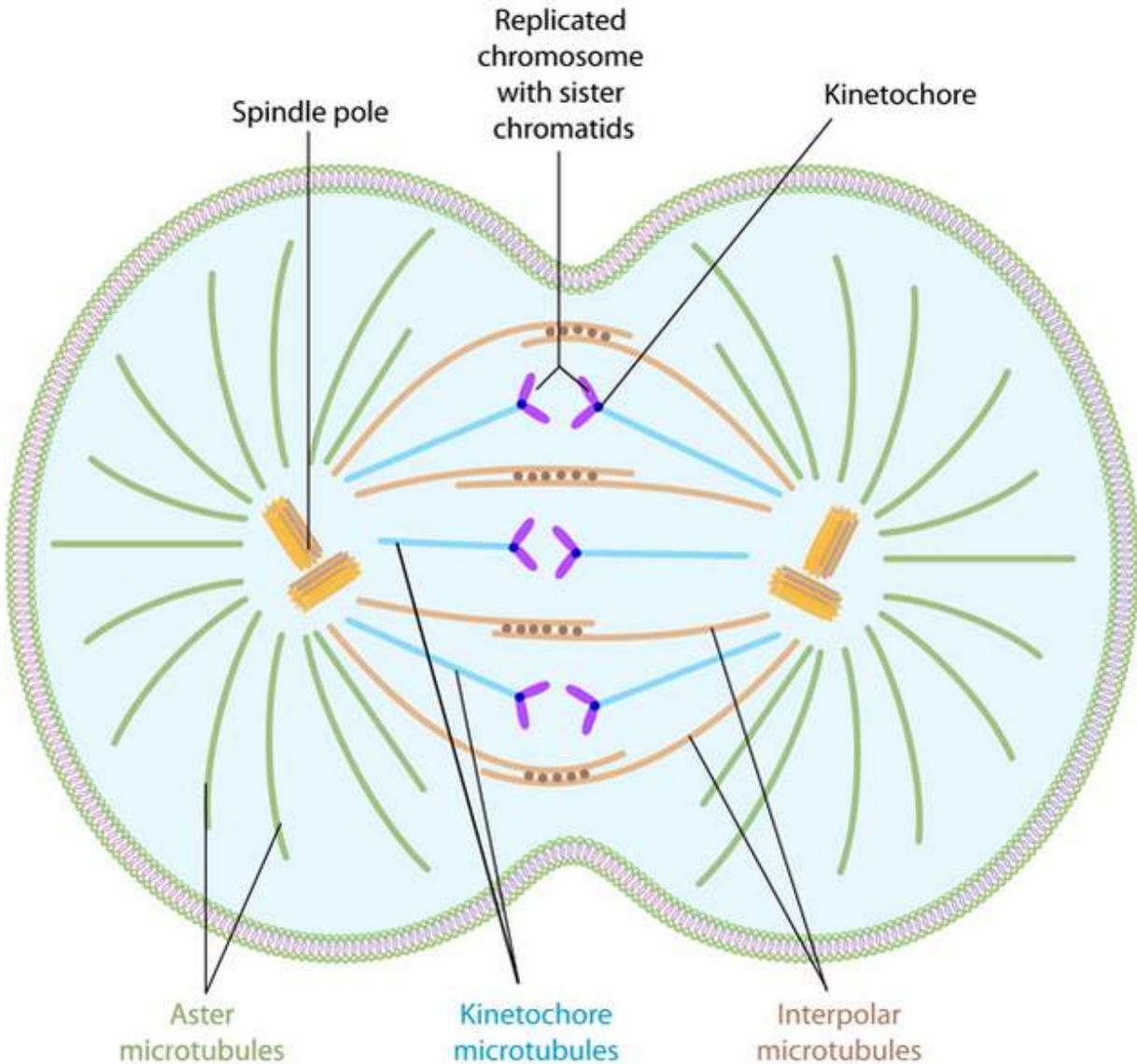


Figure 21: Le fuseau mitotique en métaphase. Depuis les centrosomes (spindle pole), irradient trois types de microtubules; les microtubules kinétochoriens qui sont fixés au kinétochores des chromatides alignées le long de la plaque métaphasique. Les microtubules polaires qui relient les deux centrosomes au centre de la cellule pour les maintenir de part et d'autre de la cellule et les microtubules astraux qui ancrent chacun des centrosomes à un pôle de la cellule en s'attachant au cortex. La tension générée sur les kinétochores permet le maintien de la plaque équatoriale et permettra la séparation des chromatides sœurs aux deux pôles de la cellule. *Adapté de Dharod 2017.*

Jauffred et al 2013 montre l'importance de la régulation des mouvements des centrosomes. Durant la télophase de cellule pI, il y a des mouvements asymétriques entre les deux centrosomes du fait de l'accumulation différentielle de la protéine Numb dans une cellule fille. Le centrosome basal antérieur reste accroché au cortex alors que le centrosome apical postérieur est plus mobile. Cette mobilité est due à la réduction de l'activité de la Dynéine, d'une part par l'action de Numb via la protéine CRMP et d'autre part par l'accumulation différentielle de Rab11 au pôle antérieur de la cellule qui lui aussi réduit l'activité de la Dynéine. Cette étude montre un rôle inédit pour Numb dans la régulation de l'asymétrie centrosomale.

Pour finir sur l'impact direct des microtubules, récemment il a été montré qu'une petite protéine associée aux microtubules (SKAP) et sa partenaire Astrin, cause une perte de l'orientation du fuseau mitotique quand le domaine de la protéine Astrin qui permet l'attachement aux extrémités (+) des microtubules est muté dans les cellules HeLa (Kern et al 2016).

La machinerie permettant l'attachement de l'extrémité (+) des microtubules astraux du cortex cellulaire a été décortiquée au cours des dernières années et est décrite dans la partie suivante.

4.2.2. Acteurs du fuseau

4.2.2.1. NuMA/Mud/Lin-5

La protéine Nuclear Mitotic Apparatus (NuMA) est une protéine se liant aux microtubules décrite pour jouer un rôle dans la formation et le maintien du fuseau mitotique. Avec son partenaire la Dynéine, elle permet de relier les microtubules au pôle du fuseau mitotique et de le maintenir au sein de la cellule jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la tension du fuseau. C'est une protéine de près de 2000 acides aminés (238 kDa), identifiée en 1980 par Lydersen et Pettijohn. Elle possède plusieurs localisations durant le cycle cellulaire: localisée dans le noyau et aux jonctions tri-cellulaires en interphase, elle passe aux pôles du fuseau mitotique, aux centrosomes et au cortex des cellules durant la mitose (Bosveld et al, 2017 et 2016, Ségalen et al, 2010, Radulescu & Cleveland 2010). Dans le noyau, son rôle a été suggéré pour participer au maintien de la matrice nucléaire via son domaine C-terminal, pour jouer dans la condensation de l'ADN. Sa perte de fonction de NuMA induisant des phénotypes de désorganisations nucléaires (Radulescu & Cleveland 2010).

NuMA est conservée entre les espèces: son homologue chez la drosophile s'appelle Mud (Bowman et al 2006, Siller et al, 2006) et Lin-5 chez le nématode (Lorson et Al 2000). Ces trois protéines possèdent toutes dans leur région N-terminale quatre domaines coil-coiled et une région adjacente NLM (NuMA related proteins domains) (**Figure 22**). Elles peuvent interagir avec le domaine TPR des protéines se liant aux protéines G comme Pins, LGN ou GPR1/2 via leur dernier domaine coil-coiled et un domaine PBD localisé dans la région C-terminale de la protéine (Siller et al, 2006).

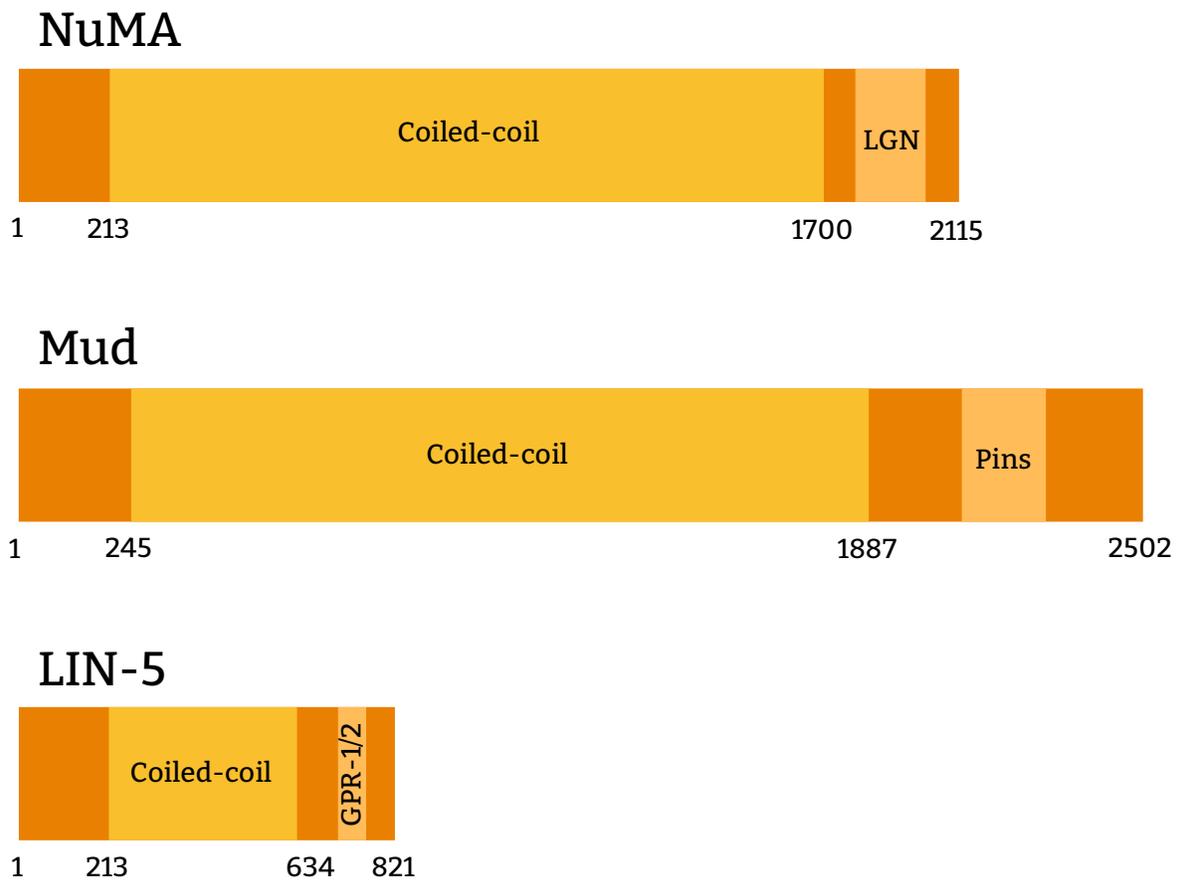


Figure 22 La protéine NuMA et ses homologues Les trois homologues possèdent tous un domaine pouvant se lier à Pins et ses propres homologues. *Adapté de Segalen 2009.*

L'interaction entre les homologues de NuMA et ceux de Pins régulent principalement le recrutement cortical de NuMA. Cette interaction permet aussi le recrutement de la Dynéine et est importante pour l'orientation du fuseau dans les ACD. En anaphase, le complexe NuMA/Dynéine/dynactine continue à servir de point d'ancrage aux microtubules astraux en étant retenu à la membrane par les protéines 4.1 (Mattagajasingh et al, 2009).

Chez la drosophile, NuMA a été initialement identifié suite à l'observation en contexte mutant de graves défauts dans le cerveau de la mouche (ce qui lui a valu le nom de Mud, pour Mushroom Body Defects, Guan et al 2000). Dans cette étude, le phénotype est associé à la délamination des neuroblastes. Il montre que Mud se lie à Pins à un pôle des neuroblastes et participe ainsi à l'orientation de leur division, puisqu'en contexte de perte de fonction *mud* 40 à 60% des divisions sont mal orientées par rapport à l'axe A/B (Siller et al 2006). L'équipe montre aussi que dans une fraction des cas, la division n'en est plus asymétrique (3%), la protéine Miranda ségrégeant dans les deux cellules filles (aussi montré par Bowman et al, 2006). Il est important de noter que dans les neuroblastes, Mud ne se localise qu'au cortex apical instruisant ainsi une division orientée le long l'axe apico/basal (Bowman et al, 2006).

Par contre, dans le précurseur pI du lignage des soies qui se divise dans le plan de l'épithélium, Mud se localise aux deux pôles antérieur/basal et postérieur/apical (Ségalen et al, 2010). Dans ce cas aussi, la perte de fonction *mud* induit une randomisation de l'orientation des divisions selon l'axe A/P et selon l'axe A/B. Dans ces cellules, deux modes de recrutement de Mud au cortex ont été décrit, le classique passant par Pins du côté apico/basal et via la protéine Dishevelled du côté postérieur/apical. Il est à noter que dans ce même tissu, la perte de fonction *mud* (*mud4*) dans les cellules épithéliales qui font des divisions symétriques, conduit à des délaminations des cellules épithéliales. De plus, dans ces cellules l'orientation des divisions passant par des repères aux jonctions tri-cellulaires laissés par Mud (Bosveld et al, 2017), cela leur confère une indépendance vis à vis du système médié par Pins. Ceci a aussi été montré dans le disque imaginal de l'aile de la drosophile, où la perte de fonction de Pins, aPKC et Disc Large n'impacte pas l'orientation du fuseau, suggérant que Mud se localise différemment (Bergstrath et al, 2016) possiblement aux TCJ (Bosveld et al 2017).

De multiples systèmes régulent la dynamique de NuMA et de ses homologues dans la cellule. Sous l'action de CDK1/Cycline B, NuMA est libérée de la chromatine au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Ensuite, Kotak et Gonczy 2013 montrent que ce même complexe régule négativement la localisation corticale de NuMA en métaphase. Cette régulation permet de limiter le recrutement de la Dynéine au cortex et d'affiner l'orientation du fuseau. Ensuite, l'inhibition de CDK1 en anaphase, permet d'augmenter le recrutement cortical de Dynéine ce qui renforce la robustesse du fuseau. En plus de CDK1, d'autres kinases essentielles régulent l'enrichissement de NuMA au cortex: Aurora A dans les kératinocytes favorise le recrutement de NuMA depuis les pôles du fuseau (Kotak et al 2016) et Plk1 régule l'interaction entre Dynéine et NuMA (Sana et al 2018). Dans le disque imaginal de l'aile de la drosophile, Warts de la voie Hippo favorise

aussi le le passage de Mud vers le cortex en phosphorylant pour qu'il s'associe à Pins, en quittant les pôles du fuseau (Bergstrath et al, 2015). Chez le nématode, l'homologue LIN-5 subit aussi des phosphorylations pour réguler ses fonctions (Portegijs et al 2016). La régulation de NuMA au niveau quantitatif à chaque pôle et qualitatif est essentielle pour l'orientation du fuseau afin de contrôler les forces aux pôles via le recrutement du moteur moléculaire Dynéine/Dynactine. Ainsi, une perte de fonction *mud* dans les neuroblastes de la drosophile induit une mauvaise ségrégation des déterminants neuraux qui perturbe la mise en place de leur détermination et les maintient dans un état prolifératif (Guan et al, 2000). Ainsi, dans les cellules cancéreuses de la prostate en culture, les phosphorylations de NuMA par Aurora A sont requises pour la progression du cycle cellulaire: leurs mutations entraînant dans premier temps son accumulation dans le cytoplasme au lieu du noyau et ainsi que celle de la machinerie de l'apoptose des cultures de cellules (Toughiri et al, 2013).

4.2.2.2. *Dynéine/Dynactine*

Pour induire une tension sur les microtubules, NuMA recrute le complexe Dynéine/dynactine où la dynactine est le moteur moléculaire qui lie les microtubules et se déplace vers l'extrémité (-) donc vers le centrosome et la Dynéine est l'adaptateur entre NuMA et Dynactine. L'association de Mud avec la dynactine a été montrée pour être importante pour le contrôle de l'orientation du fuseau. De plus, Florencia di Pietro en 2017 a mis en exergue dans les cellules HeLa et dans le neuroépithélium du poulet que la protéine de l'Actin-Capping Protein Z β (CAPZ β) pouvait aussi exercer de la tension sur les microtubules en régulant l'assemblage, la stabilité et l'activité du complexe dynéine/dynactine indépendamment de son rôle sur le cytosquelette. Ainsi, dans le cas de forces générées sur le fuseau dépendantes de la dynéine l'équipe a montré que CAPZ β était un nouveau régulateur en aval de la voie Gai/LGN/NuMA dans des cellules HeLa.

4.2.2.3. *Les protéines G & Pins & Disc Large*

Les protéines G hétérotrimériques sont formées de trois sous unités: G α , G β et G γ . La sous unité G β est couplée au GDP. Lors de l'activation de ces protéines, cette sous unité se sépare des deux autres et sous l'action d'une GEF (Guanine exchange factor), échange son GDP contre du GTP. Le rôle des sous unités des protéines G α , β , γ dans l'orientation des divisions a été montré dans plusieurs types de divisions asymétriques. Dans l'embryon de *C. elegans*, les sous unités GOA-1 et GPA-16 (sous classe de alpha Gi/o) en association avec Ric-8 (régulateur positif des protéines G) sont requises pour l'orientation asymétrique du fuseau lors de la première division. Dans l'ACD du neuroblaste, Gai se localise au cortex apical et interagit avec Pins pour orienter le fuseau et se localise apicalement au cortex (Bellaïche et al, 2001). G β n'a pas été montré localisé asymétriquement durant cette division mais est requis pour la polarité des neuroblastes (Yu et al 2003), tout comme G γ 1 (Izumi et al, 2004). Durant la division de la cellule pI, (Ségalen et al, 2010, David et al, 2005) Ric-8 régule la localisation de Gai pour promouvoir son action sur l'orientation du fuseau dans le plan l'épithélium mais pas selon l'axe A/P. En perte de fonction de *gai*, Pins ne se

localise pas au cortex et l'orientation selon l'axe A/P n'est pas affectée celle-ci étant principalement contrôlée par les facteurs de la PCP. Par contre un changement de l'orientation selon l'axe A/B est observé dans ce contexte. Gai sert d'ancrage à Pins/LGN, induisant un changement de conformation de ce dernier pour permettre le recrutement de Mud/NuMA (Du et Macara 2004, Nipper et al 2007, Sidervosrki et Willard 2005). Katanaev et al 2005 ont montré l'implication d'une autre sous-unité Gao dans les précurseurs pI en aval de Pins et Frizzled, suggérant un rôle différent de Gai. Notez que chez les vertébrés Gai n'est pas restreint à un pôle mais est réparti uniformément sur tout le cortex des neuroblastes ce qui révèle chez la drosophile un mécanisme spécifique pour le recrutement de la machinerie aux pôles (Di Pietro et Morin 2016).

Pins (Partner of Inscuteable) homologue de GPR1/2 chez le nématode et de mPins/LGN chez les mammifères est une protéine au domaine GoLoco qui interagit avec les protéines G. Elle participe à l'orientation des divisions via le recrutement de Mud et de ses homologues NuMA et LIN-5. Même si fondamentalement, Pins possède toujours la même fonction, la machinerie protéique qui la localise est différente en fonction des espèces, voire même des types cellulaires. Chez la drosophile, Pins se localise à un pôle de la cellule. Dans les neuroblastes, Pins est localisé au cortex apical avec Insc, Bazooka (PAR-3) (Schaefer et al, 2000) et Locomotion defect, alors qu'il est localisé au cortex basal dans les cellules pI et n'interagit pas avec Bazooka lors de sa division, puisqu'ils sont localisés à des pôles opposés (Bellaïche et al, 2004). Chez *C. elegans*, les distants homologues de Pins, GPR-1 et GPR-2, sont localisées au cortex postérieur par les protéines PAR et y entraînent LIN-5, la perte de fonction de l'un ou l'autre impacte l'orientation de la division (Park et Rose 2008). Cependant Morin en 2007 montre une localisation corticale de Pins aux deux pôles des progéniteurs neuraux vertébrés et sa perte de fonction induit encore une réorientation du fuseau mitotique (Morin et Bellaïche, 2011). Par ailleurs, Pins a aussi été impliquée dans la régulation l'orientation des ACD des progéniteurs de la peau, puisqu'un RNAi dirigé contre Pins ou NuMA conduit à une division dans le plan de l'épithélium (Williams et al, 2011).

Disc Large, une Membrane-Associated Guanylate Kinase (MAGUK), a été montrée pour réguler l'orientation des divisions via son interaction avec Pins. Il intervient lors des divisions symétriques dans l'épithélium folliculaire de la drosophile mais aussi dans le neuroépithélium de poulet (Bellaïche et al 2001, Bergstralh et al 2013). En effet, la perte de fonction *disc large* se traduit par une localisation uniforme de Pins au cortex dans les cellules folliculaires de la drosophile associé à une désorientation des divisions. Dans les ACD, le rôle de Disc Large a été montré dans les neuroblastes (Knoblich 1995, Bellaïche et al 2001). Son rôle n'est visible qu'en contexte sensibilisé pour Inscuteable, son ancre, la position corticale apicale de Pins et G*ai* est perdue. Dans les pI, où la protéine Ins est absente, la perte de fonction disc large provoque aussi la perte de la localisation corticale au pôle basal de Pins (Bellaïche et al, 2001). Ainsi, quelque soit son mode de recrutement, la localisation unipolaire au cortex de Pins corticale dépend de sa stabilisation par Disc Large. Disc large est en plus décrite pour avoir un lien direct sur les microtubules en se liant au complexe Khc7/14-3-3 (Kinésine couplée à un adaptateur) et sur la Dynéine via la

protéine NudE. L'existence de toutes ces interactions complexifie la compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse des forces de tension via les microtubules astraux (**Figure 23**, Bergstralh et al, 2017).

4.2.2.4. Canoë/Afadin

Afadin/Canoe est une protéine corticale connue pour intervenir dans de nombreux processus. Ainsi, il intègre les voies Notch, Ras et Wnt lors de la spécification des progéniteurs du muscle de la drosophile (Carmena et al, 2006) et sert d'effecteur Rap1 dans la voie kinase N-terminale Jun pendant la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile (Takahashi et al., 1998; Boettner et al., 2003). Son orthologue mammifère Afadin ainsi que Canoë est localisé aux jonctions adhérentes des épithelia et relie les cadhérines au cytosquelette. Elles ont un rôle dans l'organisation A/B des épithelia. En plus de ces fonctions, il intervient pour réguler la polarité des neuroblastes et l'orientation du fuseau. Ainsi, dans les neuroblastes, il se localise apicalement et co-immunoprécipite avec Pins. Cette interaction a aussi été montrée dans des cellules S2 polarisées, où Canoë et Pins permettent le recrutement de Mud et ainsi contrôlent l'orientation des divisions de ces cellules (Wee et al, 2011). Dans les cellules pI, l'interaction Pins/Canoë a aussi été montrée du côté antérieur de la cellule, mais de façon surprenante, Canoë interagit avec le domaine PDZ de Dishevelled du côté postérieur. Bien que cette interaction ne soit pas le moteur permettant le recrutement de Mud, la présence Canoë au pôle postérieur de la cellule est requise pour le contrôle de l'orientation du fuseau (Johnston et al, 2013). Ainsi, le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique des cellules pI passe au pôle antérieur de la cellule par son ancrage via les protéines Pins, Mud et Canoë et au pôle postérieur par deux voies parallèles l'une impliquant Dishevelled et Mud et de l'autre Dishevelled et Canoë. Il a été proposé que le rôle de Canoë serait d'impliquer le cytosquelette d'actine dans ce contrôle, mais à l'heure actuelle des expériences complémentaires sont nécessaires pour définir précisément le rôle de Canoë dans cette voie parallèle.

4.3. **Telophase rescue**

Dans les neuroblastes, la perte de fonction *mud* n'entraîne qu'un très faible pourcentage de défaut de répartition de déterminants cellulaires avec pourtant une très forte désorientation de l'orientation du fuseau (Siller et al, 2006 et Bowman et al, 2006). Cette observation suggère qu'il y a un phénomène capable de rectifier l'orientation du fuseau: c'est ce qu'on appelle le télaphase rescue.

Dans l'épiderme de souris, Lough et al en 2019 mettent en exergue que le fuseau reste dynamique jusqu'à la fin de la mitose et peut se ré-orienter. Ainsi, il montre que 30% des cellules se divisant dans le plan de l'épithélium ont une orientation initiale de 30 à 60° et met en avant le rôle du complexe β -Caténine/E-Caténine/Vinculine/Afadin pour modeler le cytosquelette d'actine et changer les capacités de traction des domaines corticaux, ce qui permet de réorienter le fuseau mitotique avant la séparation des cellules filles.

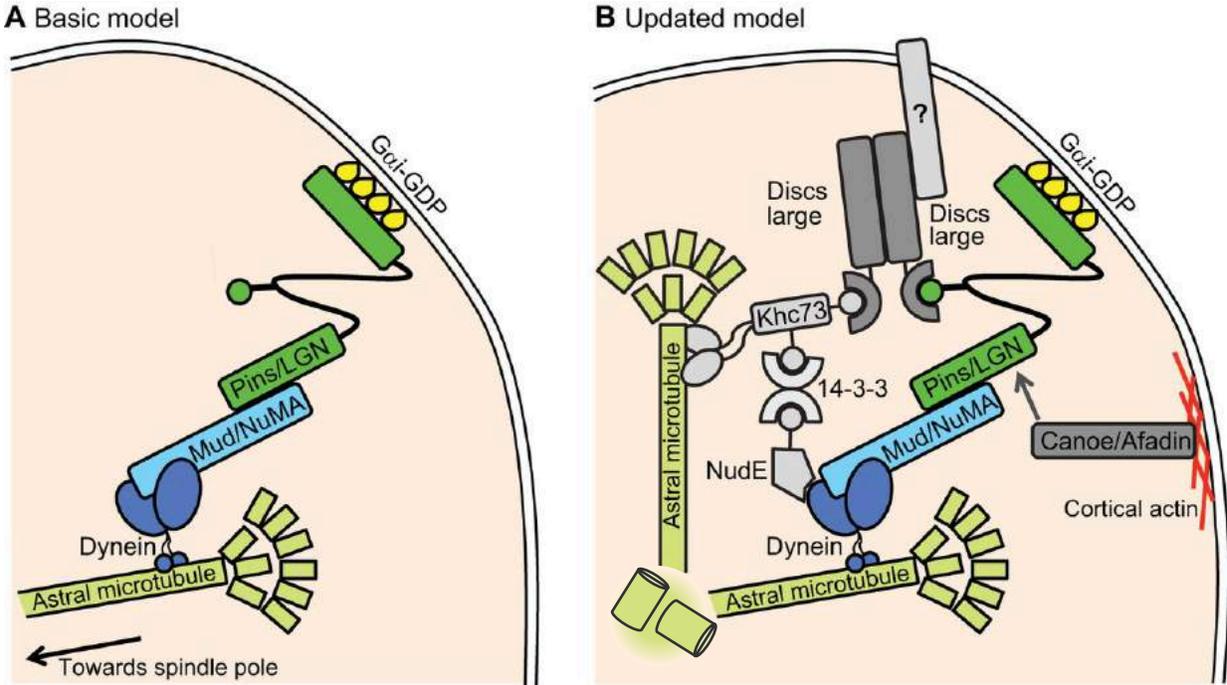


Figure 23: Evolution du modèle d'accrochage du fuseau au cortex par Pins **A)** Machinerie canonique formée de Mud/NuMA, Pins/LGN et G*β*i qui lie Dynéine à la membrane pour tirer sur le fuseau en marchant sur les microtubules astraux. **B)** Modèle mis à jour avec des voies additionnelles: Disc Large et Canoe procurent des informations de position pour la machinerie canonique et, Dlg avec d'autres facteurs comme Khc73, 14-3-3 et NudE permettent le recrutement de la dynéine. Et ainsi donc complexifie la machinerie. *Adapté de Bergstrath et al 2017.*

Cette correction de l'orientation du fuseau a été aussi montrée dans les neuroblastes de la drosophile (Peng en 2000) puisqu'en contexte mutant *lethal giant larvae ou bazooka* où le fuseau mitotique retrouve son orientation selon l'axe A/B. De plus, il a été montré dans les neuroblastes mutants *inscuteable*, qu'un réalignement des déterminants cellulaires avec le fuseau au moment de la télophase/anaphase permet aussi de maintenir l'asymétrie de la division (Cai et al 2001). Tous ces mécanismes soulignent la robustesse des mécanismes impliqués dans les divisions asymétriques. Cai et al 2001 montre l'importance de la famille de gènes *snail* abolit ce processus. Cinq ans après, ils décortiquent encore plus le procédé montrant le rôle d'un complexe formé par un homologue du facteur de nécrose tumorale TNF, son récepteur DTRAF1 et Eiger pour le sauvetage de la localisation de Miranda et Prospero dans ce processus (Wang et al 2006).

5. Objectifs de thèse

Ces quatre ans de recherche m'ont permis d'étudier les liens et les nouveaux rôles de protéines bien connues et que j'ai introduit dans les quelques pages qui précèdent mes résultats. Ce que j'aime dans le développement c'est le côté holistique de la discipline: rien n'est distinct, rien n'est indépendant. Tout se connecte et c'est ce que j'ai aimé dans ce projet. Décortiquer le nouveau rôle d'une protéine de cycle dans la polarité au sein d'un système robuste et compliqué. Un facteur de polarité ayant un rôle dans un autre procédé n'est pas nouveau, Knoblich et al a montré que Aurora A avait aussi un rôle dans la polarité en phosphorylant les protéines PAR dans les pI pour réguler l'identité (Wirtz-Peitz et al 2008) et Plk décrit par Shrestha et al 2015 régule l'endocytose de Celsr1 (PCP). Mais notre étude sur Cycline A apporte un nouveau rouage à la mécanique complexe des ACD.

Mon travail porte sur Cycline A et n'a pu voir le jour que grâce à Jérémie Sallé qui par une observation a pu mettre en exergue une localisation particulière et inattendue de Cycline A au cortex apical postérieur des cellules pI (**Figure 26**). Durant mon doctorat j'ai pu montrer que durant la division de cette cellule, un pool de Cycline A est localisée au même domaine que les facteurs de la PCP Frizzled et lveled. Ensuite j'ai pu montrer l'interaction entre Cycline A et les facteurs de la PCP par co-IP et par expériences de délocalisations montrant que Frizzled/Dishevelled recrutait Cycline A au cortex. Ces observations inédites sont d'autant plus intéressantes puisque la perte de fonction *cycline A* (permissive de la mitose) montre que Cycline A modifie l'orientation du fuseau de la cellule pI se divisant dans le plan de l'épithélium comme Frizzled/Dishevelled. En plus, la présence de Cycline A au cortex peut réorienter une division orthogonale où la PCP n'est pas présente. Aussi, j'ai aussi montré Cycline A peut influencer sur le fuseau en recrutant la protéine Mud en parallèle de la voie PCP, étoffant encore plus la complexe et redondante organisation du fuseau mitotique d'une division asymétrique. Un rôle inédit pour une cycline.

Dans la partie **Résultats**, sera développé dans un premier temps, le manuscrit correspondant à nos recherches sur Cycline A puis dans un second, des résultats supplémentaires à partir de la page 114.

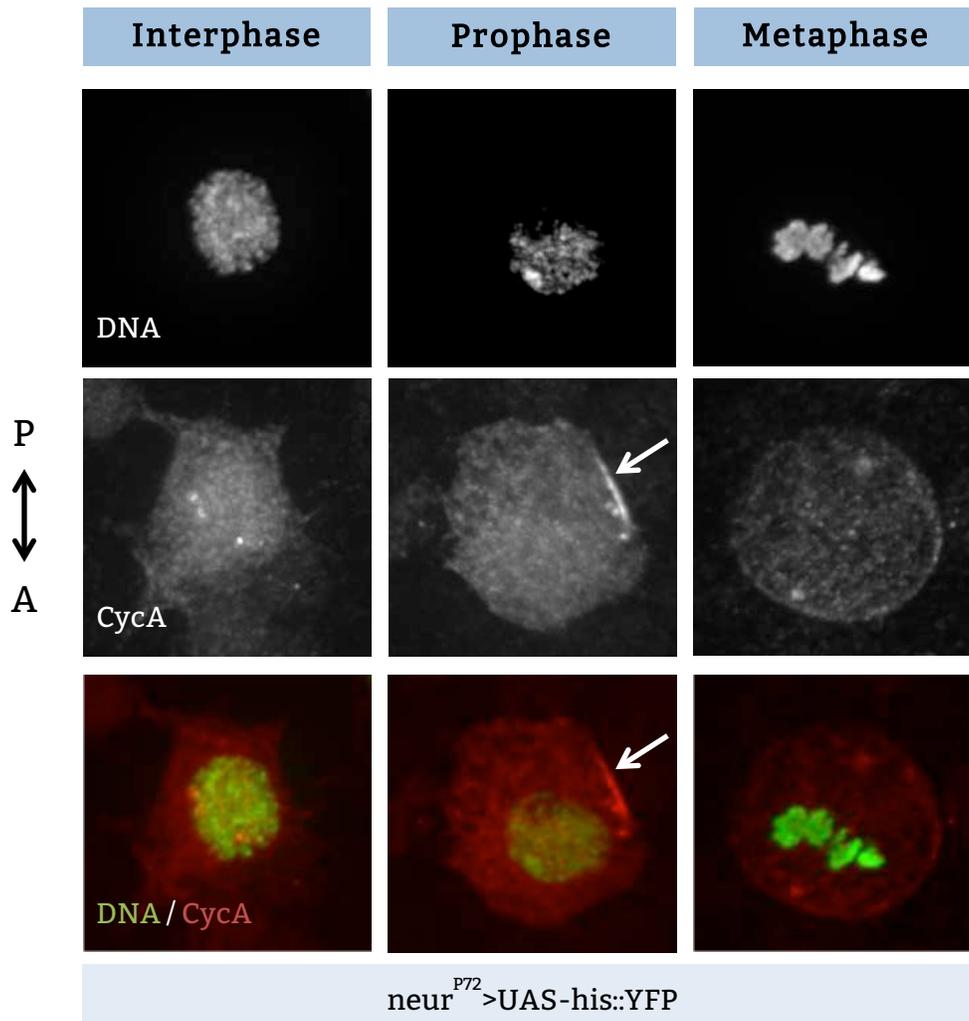


Figure 24: Cycline A se localise au cortex apical postérieur de pI Les cellules pI sont identifiées par l'expression spécifique de l'histone ::YFP ($neur^{P72} > UAS-his::YFP$). En interphase, Cycline A est uniformément répartie dans le cytoplasme. Une fraction de Cycline A s'accumule spécifiquement en fin de G2/début de prophase au cortex apical postérieur (flèche). En métaphase la Cycline A est en cours de dégradation, l'enrichissement cortical de Cycline A a disparu. Panneau supérieur : ADN. Panneau du milieu : Cycline A. Panneau du bas : superposition des deux marquages. Cycline A en rouge, l'ADN en vert. Postérieur en haut/droite.

Résultats

Article

Cyclin A interacts with Frizzled at the cell cortex to orient the spindle.

Pénélope Darnat¹, Angélique Burg¹, Jérémy Sallé², Jérôme Lacoste¹, Sophie Louvet-Vallée¹, Michel Gho^{1#*} and Agnès Audibert^{1#*}

1 Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement - Institut de Biologie Paris Seine (LBD-IBPS), Cell cycle and cell determination Team, F-75005 Paris, France.

2 Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot/CNRS, Cellular Spatial Organization Team, F-75005 Paris, France.

Key Words: Asymmetric cell division, Sensory organ progenitor/precursor, Cyclin A, Spindle orientation, Planar cell polarity.

co-last authors

* authors for correspondence: agnes.audibert@sorbonne-universite.fr; michel.gho@sorbonne-universite.fr

Abstract

Coordination between cell proliferation and cell polarity is crucial to assure asymmetric cell divisions and generates cell diversity into epithelia. In many instances, the Frizzled/Dishevelled planar cell polarity pathway is involved in the orientation the mitotic spindle, but how spatial and temporal coordination occurs with cell cycle progression is yet an elusive problem. Using *Drosophila* sensory organ precursor cells as a model system, we show that Cyclin A, the main Cyclin driving the transition toward the M-phase, is recruited to apical-posterior cortex in prophase by Frizzled/Dishevelled complex. This cortical localized Cyclin A regulates the orientation of the division by recruiting Mud (NuMA's homologue). These data highlight an unusual subcellular localization of Cyclin A and reveal this mitotic factor as a missing link between cell proliferation, cell polarity and spindle orientation.

Main

Tight coordination between cell proliferation and planar cell polarity (PCP) is fundamental for a proper development and morphogenesis of multi-cellular organisms¹. This is particularly important during asymmetric cell division (ACD) where the mitotic spindle must be carefully oriented to ensure the differential segregation of polarized cellular determinants to the daughter cells during mitosis of precursor cells. But this coordination is important also, during tissue morphogenesis where the control of cell division orientation influences cells position within the tissue^{2,3}. As such, defective spindle orientation leads to failures in morphogenesis and organogenesis during development^{4,5}, and to carcinogenesis in adult⁶. Despite many advances in knowledge on mechanism that govern cell polarity, cell proliferation and orientation of the mitotic spindle, little is known about those that coordinate these three processes. This coordination could imply the existence of multifunctional proteins, called moonlighting proteins, performing a large variety of functions in diverse physiological processes, some of them have been described as connecting multiple biochemical pathways⁷.

Planar cell polarity is a type of cell polarity that controls the alignment of cells or groups of cells within the plane of an epithelium as well as the orientation of planar cell division^{8,9}. This polarity is mediated by two main pathways. On the one hand a mechanism involving the atypical cadherins Fat (Ft) and Dachshous (Ds) and the golgi resident protein Four-jointed (Fj)¹⁰. On the other hand, the so-called core-PCP pathway that includes the serpentine receptor Frizzled (Fz), the multi-domain protein Dishevelled (Dsh), the Lim domain protein Prickle (Pk), the 4-pass transmembrane protein Van Gogh (Vang also called. Strabismus/Stbm), the Ankyrin repeat protein Diego (Dgo) and the seven-transmembrane atypical cadherin Flamingo (Fmi; also called. Starry night/Stan). The organization of these highly conserved proteins in two mutually excluding complexes located at two opposite cell poles, Vang, Pk, and Fmi on one side and Fz, Dsh, Dgo, and Fmi on the other side produces molecular asymmetry within the cell and between them¹¹⁻¹³. In

dividing epithelium, this asymmetry controls the mitotic spindle orientation in vertebrates as well as in invertebrates⁸, particularly during the ACD of *Drosophila* sensory organ precursors where originally it has been described^{14,15}.

ACD is a mechanism for cell-type diversification occurring in numerous species from yeast to plants or animal cells resulting in the formation of two daughter cells with distinct fates^{16,17}. This process can be divided into four steps; i) acquisition by the mother cell of a polarity axis, ii) redistribution of cell fate determinants accordingly to this polarity axis; iii) lining up the mitotic spindle along the cell polarity axis, and iv) asymmetric segregation of cell determinants at cytokinesis inducing different cell fates in the two daughter cells. This process occurs at each division in the bristle cell lineage leading to the formation of four different cells that conform each mechano-sensory organ (or microchaetes)¹⁸. Particularly, the primary sensory organ precursor (SOP or pI) cell divides asymmetrically, into the epithelial plane to produce a posterior precursor cell, pIIa, and an anterior one, pIIb. Then, pIIb divides to give rise a glial cell that died just after its birth and a pIIIb precursor cell, which in turn divides to generate the both inner cells of the organ (the neuron and the sheath cells). pIIa divides later on to generate the outer cells of the organ (the shaft cell and the socket cell)^{19,20}. Among the four precursor cells, two, pI and pIIa, divide along the antero-posterior axis into the plane of the epithelium and the two others, pIIb and pIIIb, divide orthogonally to the epithelium^{19,21}. How the Fz/Dsh pathway controls the orientation of the mitotic spindle has been extensively studied in the pI cells. It has been shown that spindle positioning depends on an equilibrium of forces generated by the Fz/Dsh complex localized at the apical-posterior cortex of the cell and by the components of the heterotrimeric G protein (HGP) pathway located on the opposite side of the cell i.e at the basal-anterior cortex. This induces the spindle alignment along the antero-posterior axis with a tilt toward the basal-anterior pole of the cells^{14,22,23}. All the forces exerted on the spindle are generated by the dynein, which is recruited at each spindle pole by Mud (Mushroom body defective, NuMA in mammals)²⁴. However, Mud is recruited differentially at each pole, by the HPG components Pins at the basal-anterior pole and by the PCP component Dsh at the apical-posterior pole respectively^{22,23}.

While analyzing the expression of cell cycle factors during ACD, we observed that Cyclin A (CycA) was asymmetrically localized at the apical-posterior pole during pI division. CycA, in addition to its well-known role during phase S progression, is the main Cyclin driving the transition toward the M-phase^{25,26}. This essential role of CycA in mitosis entry was discovered long time ago in *Drosophila* in seminal works showing that the activation of CycA/Cdk1 complexes occurs prior to CycB/Cdk1 complexes during G2/M transition^{25,27} and was recently confirmed in vertebrates²⁸. As a matter of fact, in G2 phase of xenopus egg, CycA/cdk1 acts as the triggering factor promoting mitotic commitment through the phosphorylation of Bora to promote Aurora A-dependent Plk1 phosphorylation and mitotic entry²⁸. The role of CycA on S and M phase functions correlates with its intracellular localization, CycA is first located into the cytoplasm during interphase and accumulates in the nucleus in prophase²⁵, even if this mitotic function doesn't require this nuclear accumulation²⁹. Then, CycA is degraded by the Anaphase

Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) which marks the entry into metaphase³⁰. This role in mitosis was confirmed in bristle lineage cells since CycA mutant progenitor cells didn't divide properly causing the loss and other abnormalities in terminal mechano-sensory organs³¹.

Using *in vivo* experiments to follow CycA dynamics and the orientation of SOP cell division combined with CycA loss of function (LOF) and ectopically localized CycA analyzes, our data show, for the first time, that form of CycA a cortical crescent with Fz/Dsh at the apical-posterior pole of the pI cells during the G2/M transition. Moreover, this particular localization is dependent on Fz/Dsh complex that acts as an anchor to recruit CycA at the cortex of the cell. More importantly, we show that cell divisions are misoriented under a CycA LOF condition or when CycA was ectopically tethered at the cell cortex. Our data indicate that the particular CycA localized at the apical-posterior cortex restricts orientation of the precursor cell division along the antero-posterior axis and maintains the mitotic spindle into the epithelial plane. Finally, we show that this control of spindle orientation occurs through a CycA dependent localization of Mud at the apical-posterior cortex of the precursor cells. Together, these data unravel the involvement of this asymmetric CycA localization in cell division orientation and, highlight a new function for this conserved cell cycle factor..

Results

CycA is enriched at the apical posterior cortex during pI cell mitosis

When analyzing the dynamic of CycA intra-cellular localization during division of the pI cells, identified by the expression of HistoneH2B::YFP under the control of *neuralized^{DP72}-Gal4 (neur)*¹⁵, we observed that, besides its canonical localization in cytoplasm during G2 phase and its nuclear restriction in prophase, CycA was asymmetrically enriched at the cortex at the transition G2/M phase (arrows in **Fig 1A**). This cortical accumulation, called thereafter CycA crescent, was apical-posteriorly localized as revealed by its colocalization with the apical pTyr and the apical-posterior aPKC markers (arrows in **Fig 1B and 1C** respectively, arrows). To analyze the dynamics of this asymmetric localization, we generated a CycA-CRISPR-mediated C-terminal eGFP-tagged knock-in (CycA::eGFP). **Figure 1D** shows six frames from a typical time-lapse recording of the pI cell identified by the expression of HistoneH2B::RFP (blue in the movie). Movies were segmented to separate apical and basal CycA in green and red respectively (in **Fig 1D**, supplemental movie 1 and in kymograph shown in **Fig 1E**). At the apical pole of pI cells, CycA aggregated first as puncta (arrowheads in **Fig 1D**), then the CycA crescent was formed (arrows in **Fig 1D**) and persisted to the end of the prophase (time duration at the cortex = 21.5 ± 1 minutes, n=38). Similarly, as the evanescent the cytoplasmic CycA pool, the cortical CycA spreaded around the cell cortex and disappears at the onset of metaphase. This kinetics is clearly shown in the kymograph (**Fig 1E,F**). As already describing CycA also localizes basally at the centrosomes³² (red channel in **Fig 1D,E**). The CycA centrosomal pool vanished following a similar timing as the CycA crescent.

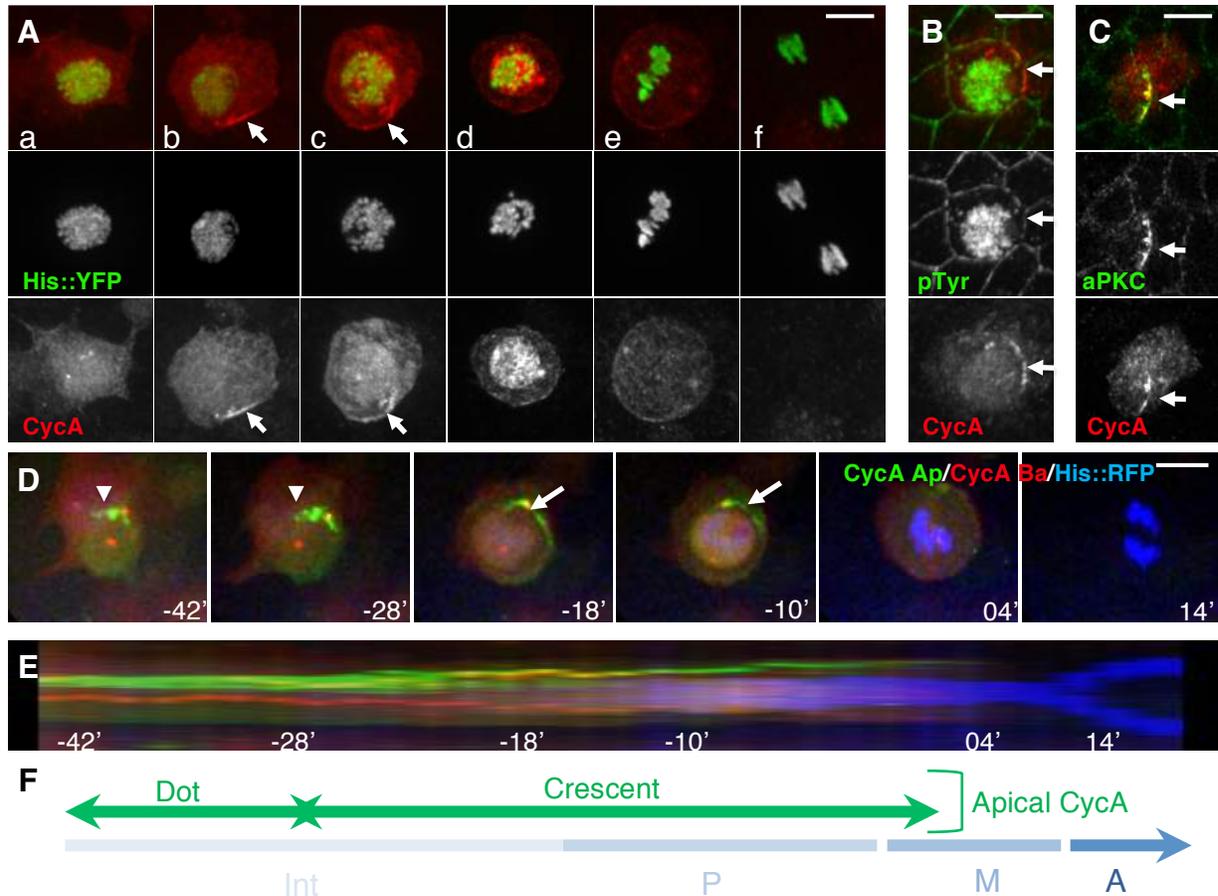


Figure 1: CycA is asymmetrically localized during pI mitosis. (A) Intracellular localization of CycA (red). Sensory cells are identified using *neur>H2B::YFP* (green) allowing the visualization of the condensed state of DNA during mitosis (green). Panels from the left to the right correspond to (a) G2 phase, (b) late G2 phase, (c) prophase, (d) late prophase, (e) metaphase, (f) anaphase. Note that CycA forms a crescent (arrows) at posterior cortex of the pI cell at the end of the G2 phase and at the beginning of the prophase. Bottom panels, separate channels (**B**, **C**) Apical section of pI cells. CycA (red) is apically posteriorly localized at the cortex (arrows) of the pI mitosis as revealed by its colocalization with pTyr (green in **B**) and aPKC (green in **C**). (**D**) Snapshot of 4D live imaging of CycA::eGFP. Apically (CycA Ap in green) and basally (CycA Ba in red) located CycA are artificially separated, H2B::YFP revealing DNA is in blue (arrowheads pointing accumulation of CycA dots at the apical part of the cell and arrows indicating the apical posterior crescent). Time is given in minute relatively to the onset of metaphase. (**E**) Kymograph of the pI cell shown in **D**, build along a line passing through the apical pole of the pI cell from G2 phase onwards. Note that accumulation of apical posterior dots occurred before the formation of CycA crescent. (**F**) Schematic view of the apically located CycA behavior during pI mitosis. Anterior is to the left in **A**, **B**, **C** and to the bottom in **D** and **E**. Scale bars: 5 mm.

The dynamics of CycA crescent was completely different from the cortically marker, Partner of Numb (PON::GFP, expressed in SOP under the control of *neur*)³³, which is enriched at the basal-anterior pole after the formation of the CycA crescent (two first panel in **Fig S1A**) and it is maintained all along the division (last panel in **Fig S1A**). The apical crescent of CycA was also observed during pIIa cell division identified by Pdm1 immunoreactivity (**Fig S1B**) and by *in vivo* recording (**supplemental movie 2**) while this localization was never observed during pIIb and pIIIb division (**Fig S1C and supplemental movie 2 and 3**). Since pI and pIIa precursor cells divide within the plane of the epithelium, whereas pIIb and pIIIb precursor cells divide orthogonally to the epithelial plane, these observations suggest that CycA localization at the apical-posterior cortex is specific to cells dividing into the epithelial plane. Finally, we addressed whether the formation of a CycA crescent is specific to the bristle asymmetric cell divisions by following CycA dynamics during the division of the surrounding epithelial cells. Although CycA shuttled between the cytoplasm and the nucleus before vanish during epithelial cell division, was never observed a cortical apical enrichment of CycA during epithelial even in prophase cells identified by the CycA nuclear restriction (n= 15; **Fig S1D and supplemental movies 4**). Altogether, these data show that a pool of CycA is asymmetrically localized at the apical-posterior cortex at the G2/M transition specifically during planar cell division of the bristle precursor cells.

Apico-posterior cortical localization of CycA is dependent on PCP factors.

The apical-posterior cortical localization of CycA was reminiscent of that observed for Fz and Dsh, two PCP factors. This prompted us to analyze interplays between CycA and PCP by three strategies. First, immunofluorescence staining was done and showed that CycA immunoreactivity at the apical posterior crescent was colocalized with Fz and Dsh immunoreactivity (arrows in **Fig 2A**). To enhance the resolution, we realized super-resolution microscopy (STED), which enables an imaging with a resolution down to 50 nm³⁴ (**Fig 2B-D**). Quantification profiles, shown on the figures **2B"-D"**, have revealed that almost all CycA fluorescent peaks correspond with Fz's and Dsh's (**Fig 2B",C"**; n=4 and 3, respectively). Same results were obtained for Fz and Dsh immunoreactivity, which are two PCP proteins well known to interact together³⁵ (**Fig 2D"**, n=3). This close colocalization between CycA and Fz was confirmed using polymerase linear amplification³⁶ to detect close pairs of CycA and GFP fused with the intracellular part of the Fz protein (**Fig S2A-C**). In order to validate this technique, CycA:HA were overexpressed in sensory organs precursor cells expressing Fz::GFP under the armadillo promotor (*Arm-fz::GFP*)^{37,38}. Under this condition, PLA dots, corresponding to close pair CycA-GFP epitopes, were abundantly detected in pI cells (n=9,7 ± 3.1 Fz::GFP-CycA dots in 13 pI cells) whereas less dots (n=1.9 ± 1.2 Fz::GFP-CycA dots in 15 pI) were observed in control condition (stars, compare **Fig S2A,B**). When PLA technique was tested during pI cell division in *arm>fz::GFP* animals, alignments of PLA dots were observed at the apical-posterior cortex overlaying with the CycA crescent (n=4, arrows in **Fig S2C-C"**) whereas no PLA dots were detected in pI cells expressing cadherin::GFP used as a negative control (n=4, **Fig S2D-D"**).

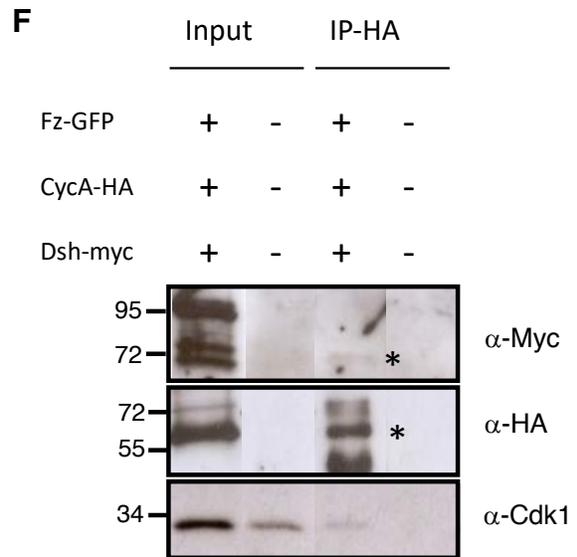
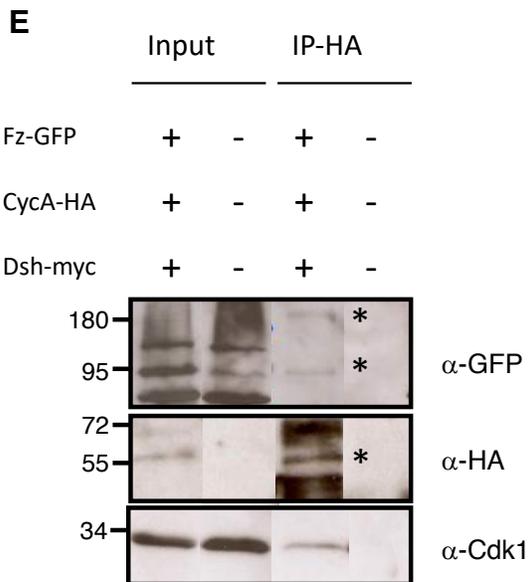
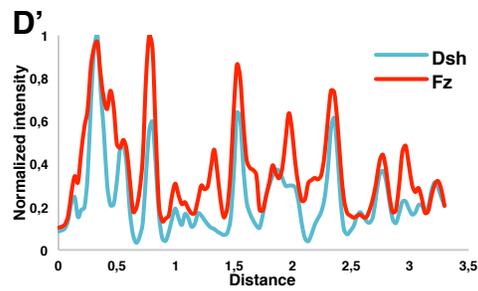
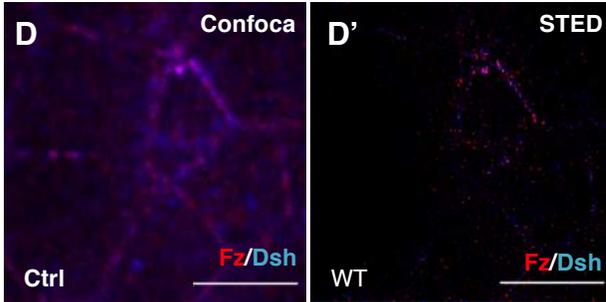
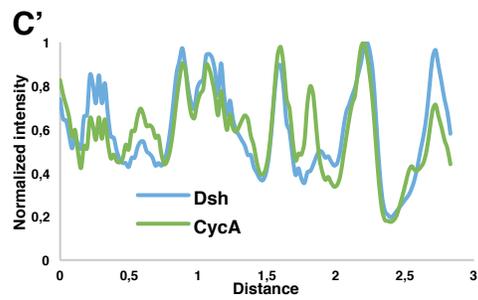
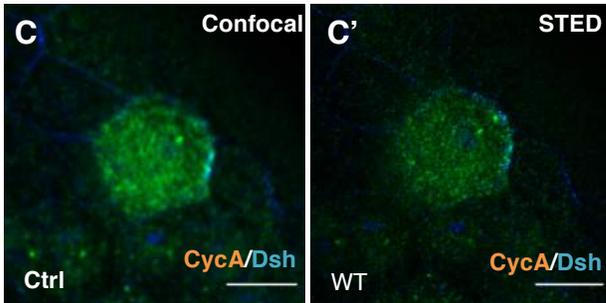
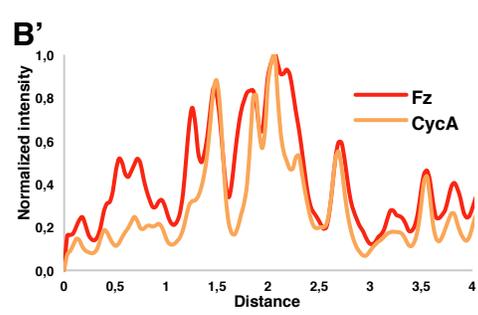
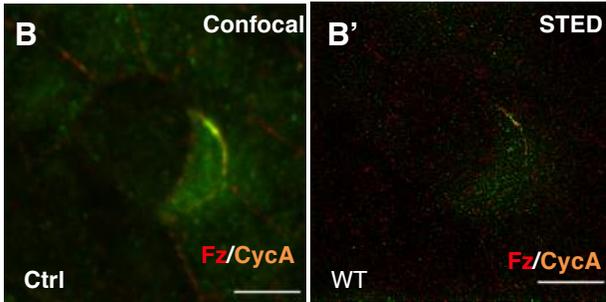
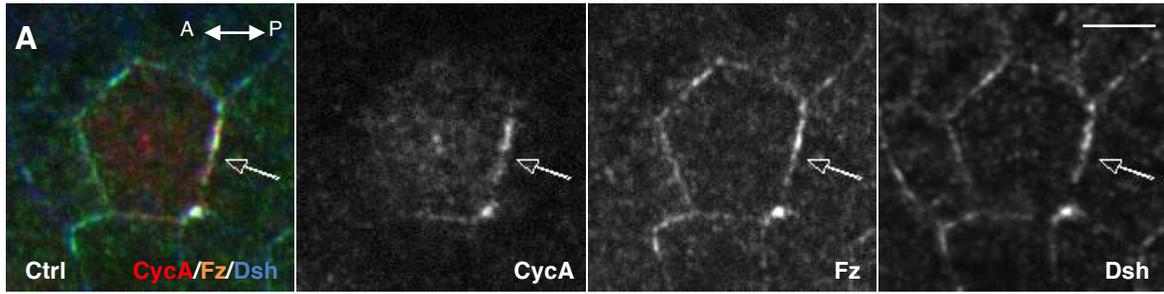


Figure 2: CycA co-localizes and interacts with PCP components. (A) CycA (red), Fz (green) and Dsh (blue) immunoreactivity in pI cell of 17 H APF old pupae. Cortical enrichment of the three proteins at the posterior pole is shown by an arrow. Separate channels on the right. (B, D'') STED analysis of CycA, Fz and Dsh immunodetection. Immunostaining of a same pI cell after image capture realized by confocal (B, C, D) or STED (B', C', D') microscopy. Comparison was done two by two; (B, B') CycA in green and Fz in red, (C, C') CycA in green and Dsh in blue, (D, D') Fz in red and Dsh in blue. (B'', C'', D'') Graphs showing the intensity of the staining over a line passing through the CycA crescent on STED immunostaining; in abscissa the distance in mm and in ordinate the intensity of each signal (CycA green and Fz red in B''; CycA green and Dsh in red in C'', Fz in red and Dsh in blue in D''). Note that CycA fluorescent peaks correspond with those of Fz and Dsh, in the same extend than those of Fz and Dsh. Posterior is to the right. Scale bars: 5 mm. (E, F) CycA co-immunoprecipitates with Fz (E) and Dsh (F). Immunoprecipitated proteins using anti-HA beads were obtained from embryos expressing CycA::HA, Fz::GFP and Dsh::myc and as negative control from *w¹¹¹⁸* embryos. CycA, Fz and Dsh was revealed using anti-HA, anti-GFP and anti-myc antibodies respectively. Cdk1 detection was used as positive control. For each blot, line was reorganized and for each antibody, the exposure time was adapted to obtain an optimal signal.

Second, to further test whether CycA interacts physically with Fz and Dsh, co-immunoprecipitation experiments in embryos overexpressing CycA::HA, Fz::GFP and Dsh::myc were performed. CycA was immunoprecipitated using beads coated with anti-HA antibodies (star, **Fig 2E**). Consistently with our co-localization data, Fz and Dsh was immunoprecipitated with CycA, as well as Cdk1 used as positive control (stars, **Fig 2E,F**). As previously described, Fz was detected as a monomeric form at approximately 90-95 kDa, but also as a dimeric form resistant to denaturing conditions at 180-190 kDa³⁹ (stars, **Fig 2E**). Moreover, among the multiple forms of Dsh, only the lower form, which corresponds to a membrane bound form was immunoprecipitated⁴⁰ (star, **Fig 2F**). These data show that Fz, Dsh and CycA interact physically to form a complex.

Finally, since Fz and Dsh are essential to establish the initial planar cell asymmetry, we have determined whether the formation of CycA crescent depends on Fz and Dsh by analyzing CycA localization in *fz* and *dsh* LOF contexts. Whereas CycA formed a posterior crescent in 95% of control pI prophase (**Fig 3A**, n=20), the CycA crescent was not or very faintly detectable at the apical-posterior cortex in *fz*^{K21/KD4} mutant prophase pI cells (75% and 25% respectively, n= 14, **Fig 3B**). Same observation was done in *dsh*¹ mutant pI cells (a missense *dsh* mutant that abrogates only its PCP activity⁴¹), using immunostaining (**Fig 3C**, n=10) or the CycA::eGFP fly line (**Fig 3D,E and movie 5**, n=16) to detect CycA. These data suggest that Fz and Dsh are required to localize CycA at the apical-posterior cortex. To further test this possibility, we analyze whether a Fz ectopic cortical delocalization could lead to a combined CycA delocalization. Thus, we over-expressed a myc-tagged-Fz form in pI cells, and analyzed the CycA localization. We observed, contrary to the control situation that Fz, Dsh and CycA stainings were not restricted to the posterior pole of the pI cells (**Fig 2A**, arrow), but were extended along the lateral part of the pI cell (**Fig 3F**, yellow arrows, n=6, the white arrow points the apical-posterior CycA/Fz localization). This result confirms that Fz and/or Dsh acts as an anchor to drive the apical-posterior localization of CycA.

Altogether, these data show that Fz, Dsh and CycA interact together to form a complex at the apical-posterior pole of the pI cells during the G2/M transition.

CycA LOF induces spindle mis-orientation during pI mitosis

During precursor cell division, spindle orientation along the antero-posterior and the apico-basal axes is maintained by the Fz/Dsh and HPG complexes^{14,15,23}. As CycA is recruited by the Fz/Dsh complex, we analyzed the role of CycA in mitotic spindle positioning. Since the complete CycA LOF induces a drastic cell cycle arrest, we studied a weaker LOF conditions, either analyzing a trans-heterozygous combination, CycA^{C8LR1/hari} or using CycA^{RNAi} line (see **Materials and methods**). Both combinations were viable and displayed weak sensory bristle defects^{31,42} (**Fig S3A-C**). In these contexts, spindle orientation was followed by *live* imaging in PON::GFP and His::RFP pupae in order to assess the asymmetry of the division and the DNA..

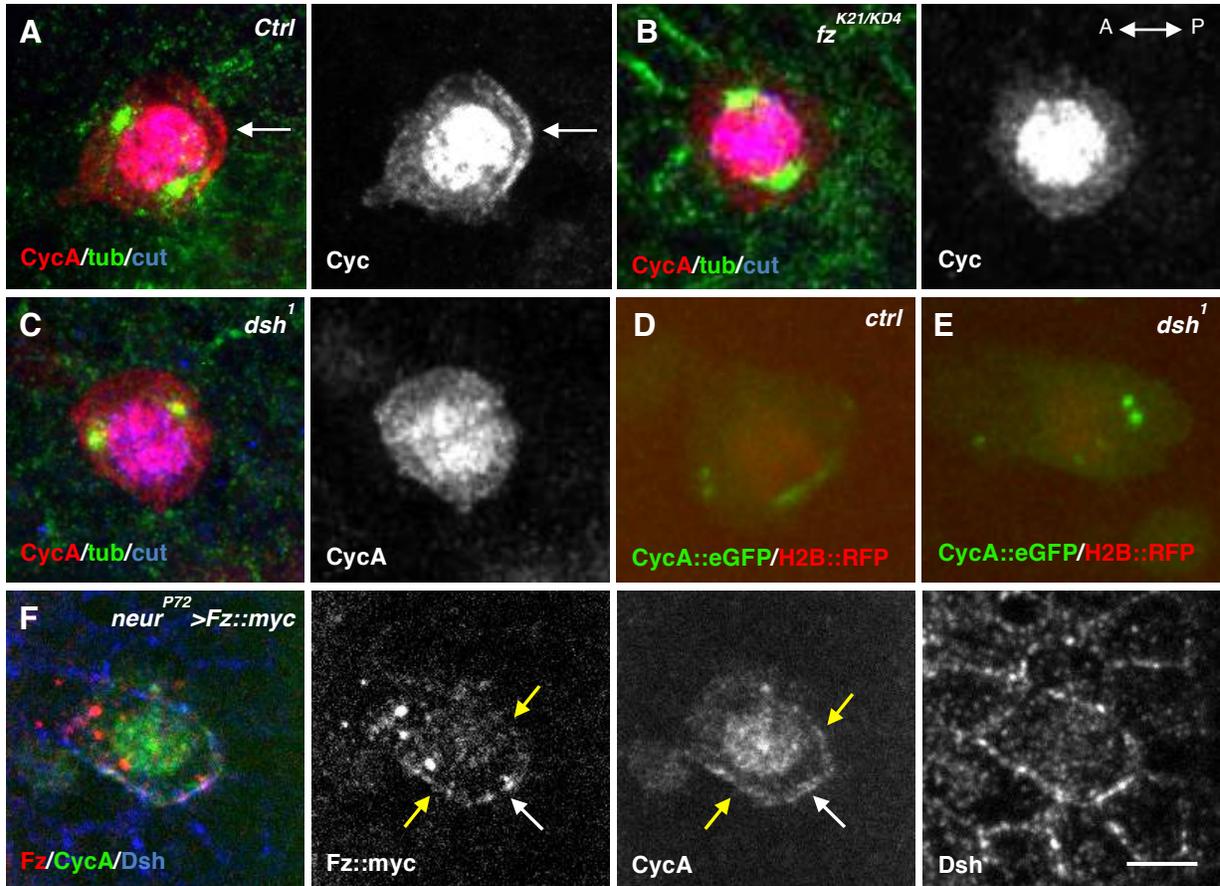


Figure 3: CycA is recruited by the posterior PCP complex. CycA localization in control (**A**, **D**), *fz* mutant (**B**) and *dsh* mutant (**C**, **E**). CycA immunoreactivity (red) in prophase pI cells identified by Cut (blue) immunostaining in control (**A**), *fz*^{K21/KD4} (**B**) and *dsh*¹ (**C**). gTubulin immunoreactivity in green. 17 h APF old pupae. Note that all the pI cells are at the same stage as revealed by the gTubulin staining and the apical-posterior enrichment of CycA (arrow in control background) is not observed in *fz*^{K21/KD4} (**B**) and *dsh*¹ (**C**). (**D**, **E**) *in vivo* dynamic of CycA::eGFP (green) in control (**D**) and *dsh*¹ (**E**) pupae expressing H2B::RFP (red) under the control of *neur* to identify pI cells. (**F**) Cortical CycA localization after Fz overexpression. CycA (green), Fz (red) and Dsh (blue) immunoreactivities in pI cells of 17 APF old pupae expressing a myc-tagged-Fz form. White arrows point the apical-posterior CycA crescent whereas yellow arrows indicate a lateral extension of the cortical recruitment of CycA. Posterior is to the right. Scale bar: 5 mm.

Position of the mitotic spindle, relative to both the anterior-posterior axis and to the plan of the epithelium, was monitored by measuring the angles between a vector pointing toward the PON-crescent passing by both daughter nuclei at the metaphase/anaphase transition relative to the midline (a_{xy}) and the plan of the epithelium (a_{xz}) respectively (**Fig 4A,B**). In *CycA*^{RNAi} pI cells, orientation of spindle relative to the antero-posterior axis was biased towards the mid-line (30.8 ± 2.9 (n=74) in *CycA*^{RNAi} instead 19.1 ± 2.4 (n=67) in control, $P=0.0031$). In *CycA*^{C8r1/hari} mutant pI cells, no clear difference was observed in the orientation of the division relative to the anterior-posterior axis (21.1 ± 3.4 (n=64) in *CycA*^{C8LR1/hari} instead 25.4 ± 2.2 (n=91) in control; $p=0.26$), probably reflecting a mild LOF condition. In contrast, in both *CycA* mutant contexts, orientation of the spindle relative to the epithelial plane was altered (19.0 ± 1.3 (n=60) in *CycA*^{C8LR1/hari} and 20.6 ± 1.8 (n=59) in *CycA*^{RNAi} instead 12.7 ± 1.0 (n=84) in control pI cells, $p=0.0006$ and $p=0.00043$ for *CycA*^{C8LR1/hari} and *CycA*^{RNAi} respectively, **Fig 4D**). These spindle mis-orientations didn't result from a mitotic alteration due to the decreased of CycA activity, since there was no correlation between the mitosis duration and the axz angle (**Fig 4E,F**). Thus, in *CycA* LOF the spindle is deflected along the anterior-posterior axis towards the mid-line and is more orthogonally oriented toward the basal pole.

To define whether *CycA* LOF is also involved in pI cell asymmetry, we have monitored localization of fate determinants in *cycA*^{C8r1/hari} pI mutant cells, analyzing the asymmetric localization of PON::GFP and aPKC (**Fig S3D-E**). The canonical asymmetrically localization of PON-GFP at the basal-anterior pole and of aPKC at the apical-posterior pole of the *CycA*^{C8r1/hari} mutant pI cell before mitosis onset were similar to the one observed in control conditions. These data indicate that in these conditions, *CycA* mutant pI cells have normal distribution of cell determinants.

Altogether these data show that *CycA* mild LOF induces a mis-orientation of the spindle during pI cell division, with a bias towards the mid-line along the antero-posterior axis and a more orthogonally oriented along the apico-basal axis. This indicates that *CycA* controls spindle orientation of the pI cells along the antero-posterior axis and maintains it in the epithelial plane of the pI cells without affecting cell determinants partitioning.

Cortical CycA is sufficient to control spindle orientation of pI cell division

Next, we tested whether the *CycA* cortical contribution is relevant for the control of the spindle orientation. To this end, we analyzed spindle orientation in pI cells when *CycA* was ectopically tethered at the cortex. Two forms of *CycA* were used: PON::CycA and PH::CycA (hereafter called PON-CA and PH-CA). PON::CycA is a fusion between *CycA* and the PON cortical domain that forces *CycA* to localize to the basal-anterior pole³³ (**Fig 5 A, B**) and PH::CycA is a fusion of *CycA* with the domain of the phospholipase C⁴³, driving *CycA* to localize at the entire cortex (**Fig. 5C**). We observed no differences on the orientation of the divisions along the apico-basal axis after PON-CA overexpression (10.8 ± 1.0 (n=81) in PON-CA and PH-CA expression (11.4 ± 0.8 (n=80) instead 12.7 ± 1.0 (n=84) in control condition; $p=0.32$ and $p=0.08$ for PON-CA and PH-CA respectively) (**Fig. 5E**).

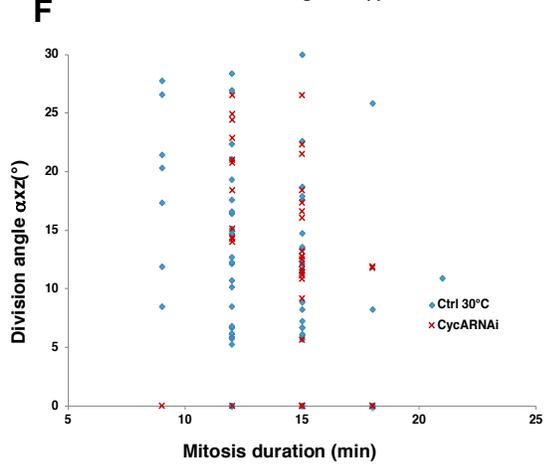
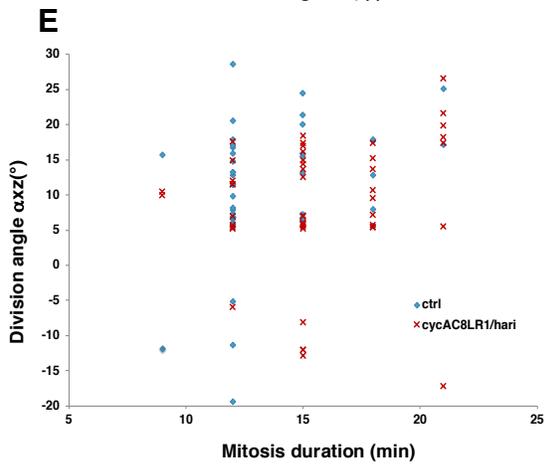
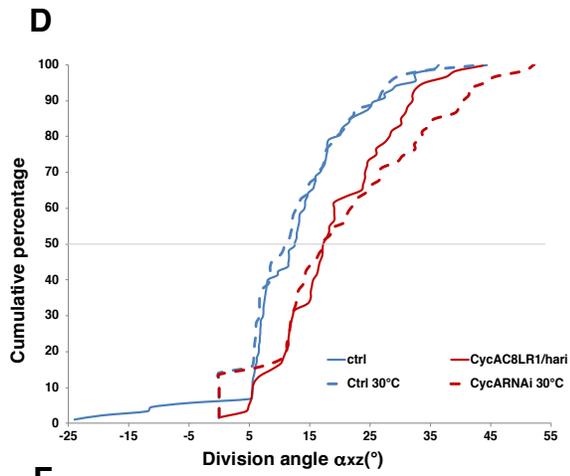
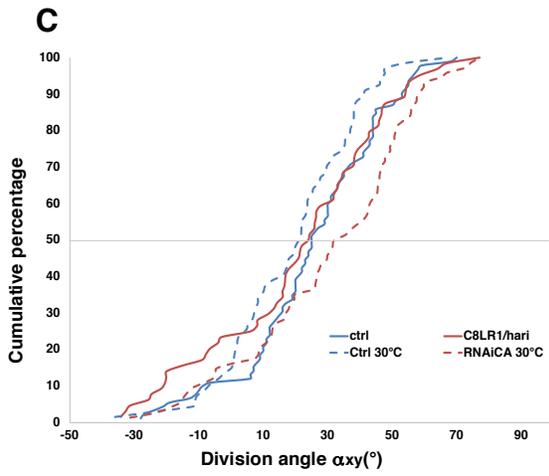
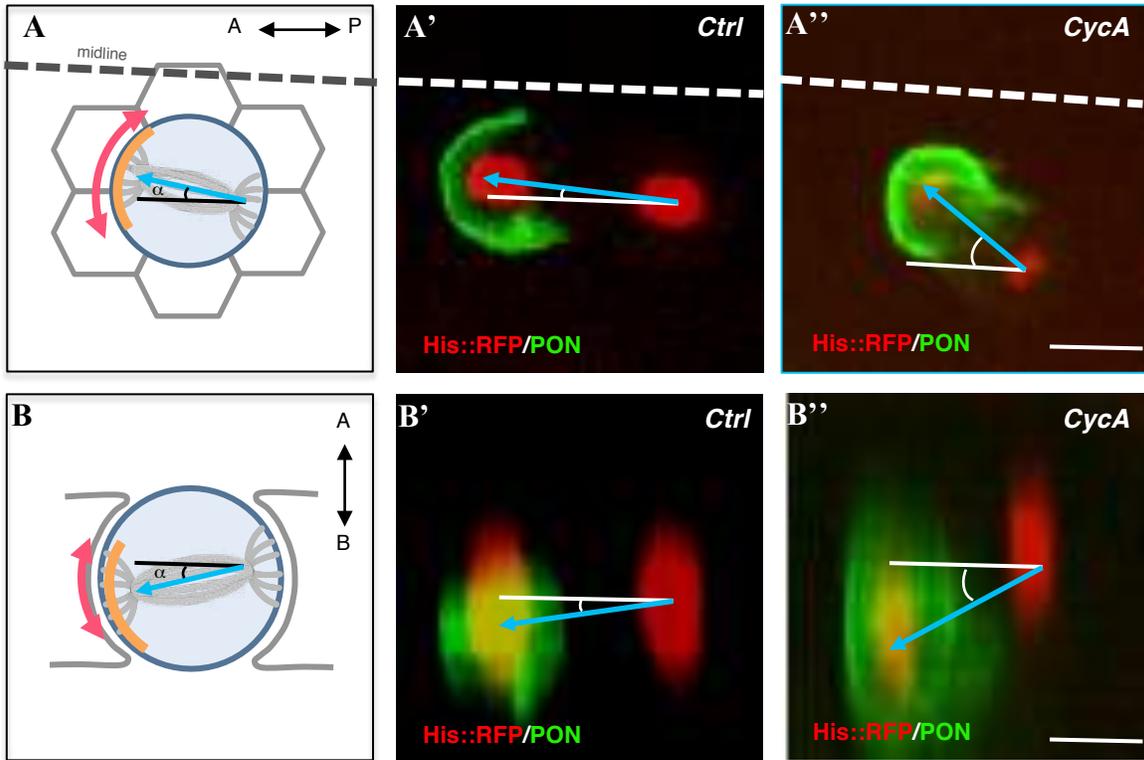


Figure 4: *CycA* LOF induced mis-orientation of pI cell division. (A-B'') Angles of the mitotic spindle relative to both the anterior-posterior axis (axy, **A-A''**) and to the apico-basal axis (axz, **B-B''**). Schematic cartoon (**A, B**) and representative examples of axy and axz angles in control (**A', B'**) and in *CycA*^{C8r1/hari} (**A'', B''**). In **A'-B''**, PON::GFP (green) and Histone H2B::RFP (red) reveal the antero-posterior polarity and DNA respectively. axy angles are measured relative to the midline (dashed lines in the cartoon (**A**) and in the control (**A'**) and in *CycA*^{C8r1/hari} (**A''**) respectively). The blue arrow indicates the orientation of the spindle relative to the basal anterior PON::GFP marker (**C, D**) Cumulative plots of α_{xy} (**C**) and of α_{xz} (**D**) in control (n=91 and 67 in **C** and n= 84 and 63 in **F**; blue line and hatched blue line) and in *CycA*^{C8r1/hari} (n=64 in **C** and n=60 in **D**, brown lines) and *CycA*^{RNAi} (n= 74 in **F** and n= 59 in **G**; hatched brown line respectively). Abscissa represents angles between the axis of division and the midline in **C** and the epithelial plane in **D** and ordinate the cumulative % of cells. Along the antero-posterior axis, measured angles are positive when the anterior spindle pole is closer of the midline than the posterior one and along the apico-basal axis, measured angles are positive when the anterior spindle pole is more basal than the posterior one. Note that in *CycA* LOF, the spindle was more tilted relatively to the plan of the epithelium. (**E, F**) Correlation between the mitosis duration and the axz angles. For control (n=51 in **E** and n=64 in **F**, blue marks) and *CycA*^{C8r1/hari} (n=48, brown marks in **E**) and *CycA*^{RNAi} (n=56; brown marks in **F**) pI cells. Note that for each mitosis duration, angles dispersion was similar in control and *CycA* LOF. Scale bars: 5 μ m.

In contrast, the orientation of the divisions along the antero-posterior axis tended to be shifted towards the mid-line (**Fig. 5D**; $32,8 \pm 3.8$ (n=76) in PON-CA and 31.8 ± 3.1 (n=80) in PH-CA instead 25.4 ± 2.2 (n=91) in control condition; $p=0.081$ and $p=0.08$ respectively). It is important to note that the effects were similar as those observed in *CycA* mild LOF ($p=0,67$ and $p=0.80$ for PON-CA and PH-CA respectively). These effects were independent of the mitosis progression since no correlation between the orientation of the spindle and the duration of the mitosis was observed after expression of PON-CA or PH-CA (**Fig S4A,B**). Thus, our data indicate that the orientation of the mitotic spindle depends on a subtle balance between forces at the two spindle poles and changes in the location and/or amount of *CycA* at the cortex induces an imbalance that impairs the orientation of the spindle. In contrast to the antero-posterior axis.

Mitotic spindle orientation in pI cells results from an equilibrium between forces generated at the two spindle poles. As such, the basal-anterior forces generated by the HGP pathway are counterbalanced by the one generated by the apical-posterior Fz/Dsh complex²³. In this context, we reasoned that if the apical-posterior cortical pool of *CycA* contributes to the posterior forces, its presence must counteract effects observed in presence of PON-CA. To test this possibility, we have expressed PON-CA in a *CycA* heterozygous background (*CycA*^{CBLR1/+}) and measured orientation of the spindle during pI cell division as previously (**Fig 5F,G**). In context of PON-CA expression, the decrease of endogenous *CycA* (*CycA*^{CBLR1/+}) induced a drastic shift of the spindle orientation away from the antero-posterior axis (15.1 ± 3.3 (n=60) in PON-CA; *CycA*^{CBLR1/+} instead $32,8 \pm 3.8$ (n=76) in PON-CA; $p= 0,0006$) (**Fig 5F**). Spindle orientation was also affected along the apico-basal axis, since orientation of pI division was more orthogonally tilted (18.2 ± 1.2 (n=51) in PON-CA; *CycA*^{CBLR1/+} instead of 10.8 ± 1.0 (n=81) in PON-CA $p=0,00015$) (**Fig 5G**). Here again, mis-oriented divisions did not result from a defective cell mitosis (**Fig S4C,D**). These data show that in heterozygous *CycA* condition, ectopic expression of a basal-anterior tethered *CycA* induced a more drastic change in spindle orientation, revealing the subtle equilibrium of forces that control mitotic spindle orientation.

Finally, to non-ambiguously demonstrate that cortical *CycA* controls spindle orientation, we have analyzed whether ectopic cortically tethered *CycA* (**Fig 5H-J**) changes spindle orientation in pIIb cell, a precursor cell devoid of cortical *CycA* (**Fig S1C and supplemental movie 2**) which divides perpendicularly to the epithelial plane^{19,21}. In control conditions, spindle of pIIb cells was oriented along the apico-basal axis with an angle of 46.2 ± 1.3 (n=114). This mean significantly increased to 50.3 ± 1.8 (n=93) in PON-CA ($p=0.006$) and decreased to 39.2 ± 1.4 (n= 77) when *CycA* was tethered all around cortex using PH-CA ($p=0.001$) (**Fig 5K**). As expected, since there is no cortical *CycA* during pIIb mitosis, expression of PON-CA in a *CycA* heterozygous background didn't modify orientation of the spindle (52.2 ± 1.4 (n= 65) in PON-CA/PON-CA; *CycA*^{CBLR1/+} instead of 50.3 ± 1.8 (n=93) in PON-CA; $p =0.28$) (**Fig 5L**). Here again, there is no correlation between the mitosis duration and the alteration of the α_{xz} angle, indicating that spindle mis-orientation was only due to the cortical *CycA* contribution and not to cell cycle dysfunctions (**Fig S4 E-I**).

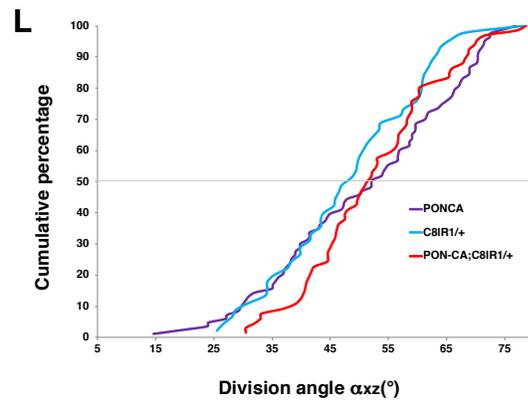
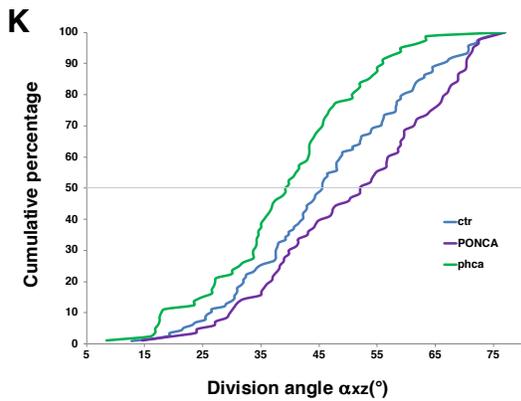
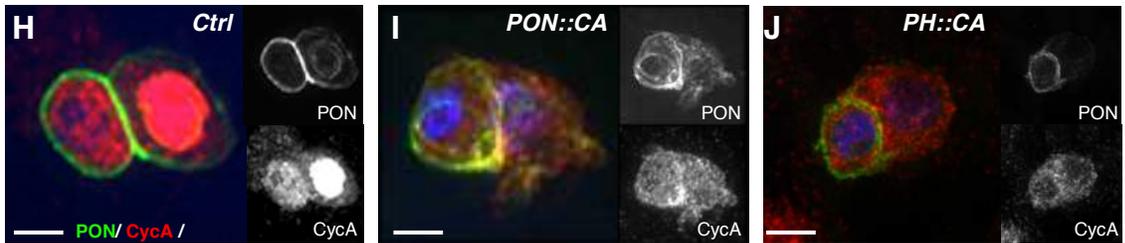
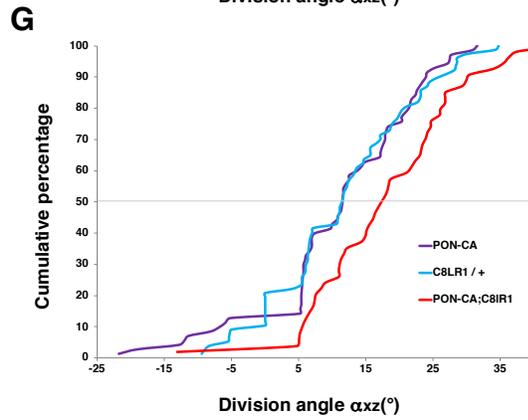
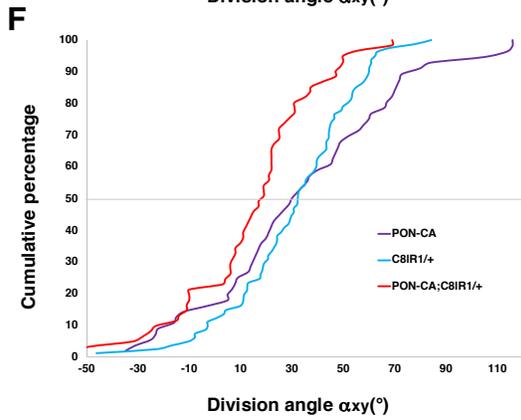
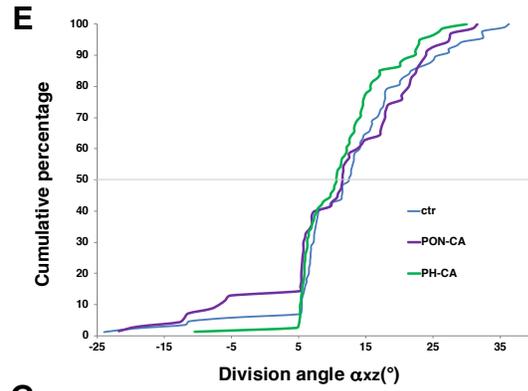
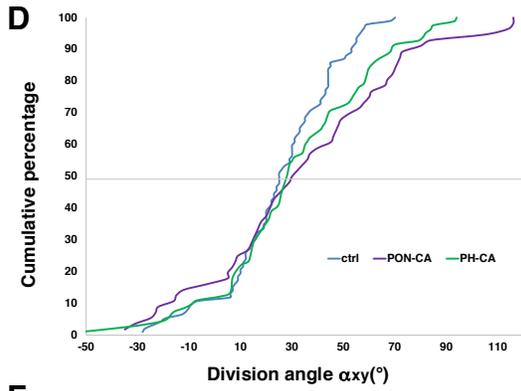
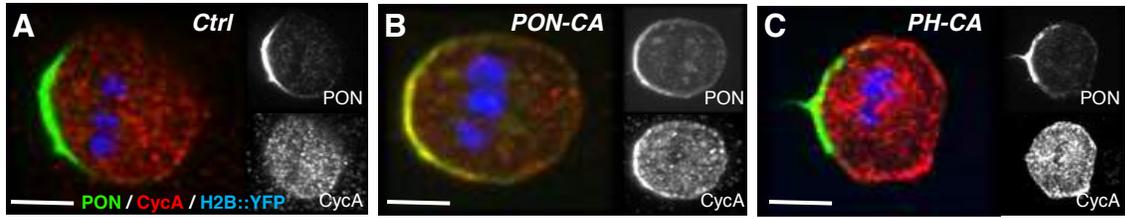


Figure 5: Cortical CycA controls mitotic spindle orientation. **(A-C)** Intracellular localization of CycA (red) during mitosis of pI in control cells **(A)** and where CycA was ectopically localized at the basal-anterior cortex (PON-CA) or the entire cortex (PH-CA) of pupae expressing PON::GFP (green) and Histone H2B::RFP (blue) to reveal the antero-posterior polarity and DNA respectively. Note that cortical CycA is localized at the basal-anterior as PON::GFP in PON-CA, and around the entire cortex in PH-CA. Anterior on the left. **(D-G)** Cumulative plots of pI cells mitotic spindle angles relative to the anterior-posterior axis (axy) in the control (n=91), PON-CA (n=76), PH-CA (n=80) pI cells **(D)** and in CycA^{C81R1/+} (n=80) and PON-CA; CycA^{C81R1/+} pI cells (n=60) **(F)** and to the plan of the epithelium (axz) in control (n=84), PON-CA (n=81) and PH-CA (n=80) pI cells **(E)** and in CycA^{C81R1/+} (n=78) and PON-CA;CycA^{C81R1/+} (n=51) pI cells **(G)**. Note the significant drift in spindle orientation after ectopic expression of CycA in CycA heterozygous context. **(H-J)** Intracellular localization of CycA (red) during pIIb mitosis in control condition **(H)**, as well as in pupae expressing PON-CA **(I)** or PH-CA **(J)** of pupae expressing PON::GFP (green) and Histone H2B::RFP (blue). Posterior on the right. **(K, L)** Cumulative plot of pIIb axz angles of mitotic spindle in control (n=114), PON-CA (n=93), PH-CA (n=77) pupae in **K** and of CycA^{C81R1/+} (n=42) and PON-CA; CycA^{C81R1/+} (n=65) pupae in **L**. Note that CycA modified orientation of the spindle during pIIb mitosis depending of its cortical localization, and that this effect is independent of the total amount of CycA. Scale bars: 5 mm.

These data indicate that ectopic cortical localization of CycA is sufficient to modify the spindle orientation during pIIb mitosis: shifting it orthogonally when ectopically localized at the basal-anterior pole and pulling it into the epithelial plane when tethered all around the cell. Altogether, our results suggest that the cortical pool of CycA orients the spindle; along the antero-posterior axis and into the epithelial plane.

CycA acts via Mud/NuMa pathway to control spindle orientation.

We have next analyzed the mechanism by which CycA controls the spindle orientation. In pI cell, Mushroom body defective (Mud, mammalian NuMA) and Dynein are both involved in spindle positioning. During pI cell division Mud anchor the spindle through its cortical localization at both, anterior and posterior, poles of the cell, which are mediated via its interaction with Pins and Dsh respectively^{22,23}. Using flies lines expressing Mud::GFP under the control of *mud* promoter, the dynamics of Mud was followed *in vivo* in *CycA^{RNAi}* LOF context. In this context, anterior cortical Mud localization was not affected whereas a drastic decrease of Mud enrichment was observed at the posterior cortex of pI cells (**Fig 6A,B**; quantified in **C** and **movie 6**). We observed a two-fold increase of the ratio of Mud crescent intensity at anterior pole over the Mud crescent intensity at posterior pole from 1.4 ± 0.2 (n= 4) in control to 3.1 ± 0.3 (n=6) in *CycA^{RNAi}* ($p=0.038$) that well reflect a decrease in Mud enrichment at the posterior cortex (Fig 6C). We confirmed our data by measuring Mud accumulation in *CycA^{C8LR1/hari}* fixed pI cells (**Fig 6DE**). Here again, quantification reflected a loss of posterior Mud accumulation since the ratio of anterior on posterior Mud crescents intensities was increased compared to the control situation (from 1.6 ± 0.2 (n=11) in control to 2.5 ± 0.3 (n=11) in *CycA^{C8LR1/hari}*, $p=0.050$). These data show that CycA is required to localize Mud at the apical-posterior pole of pI cells.

CycA acts downstream of Dsh to control spindle orientation.

Decrease in Mud enrichment at the posterior pole was observed not only in *CycA* LOF but also in *dsh¹* mutant pI cells (from 1.6 ± 0.2 (n=11) in control to 2.3 ± 0.3 (n=9) in *dsh¹* pupae, $p=0.093$) (**Fig 6F,G**). Thus, the absence of Mud at the apical-posterior pole in *CycA* LOF could be due to a direct action of CycA on Mud recruitment, or alternatively, may be due to a potential alteration of Dsh localization at the apical-posterior pole in *CycA* mutant pI cells. To test these possibilities, we have analyzed whether Dsh cortical localization was impaired in *CycA* LOF. As shown in **Figure 6H-I'**, Dsh was well localized at the apical-posterior pole of *CycA* mutant pI cells, indicating that CycA is not required for its localization. Thus, this indicates that *CycA* acts downstream of *Dsh* to control the position of the posterior spindle pole. We propose that, at the apical posterior cortex of pI cells, the Fz/Dsh complex recruits CycA, that in turn is required to recruit Mud that, via dynein, anchors the posterior pole of the mitotic spindle.

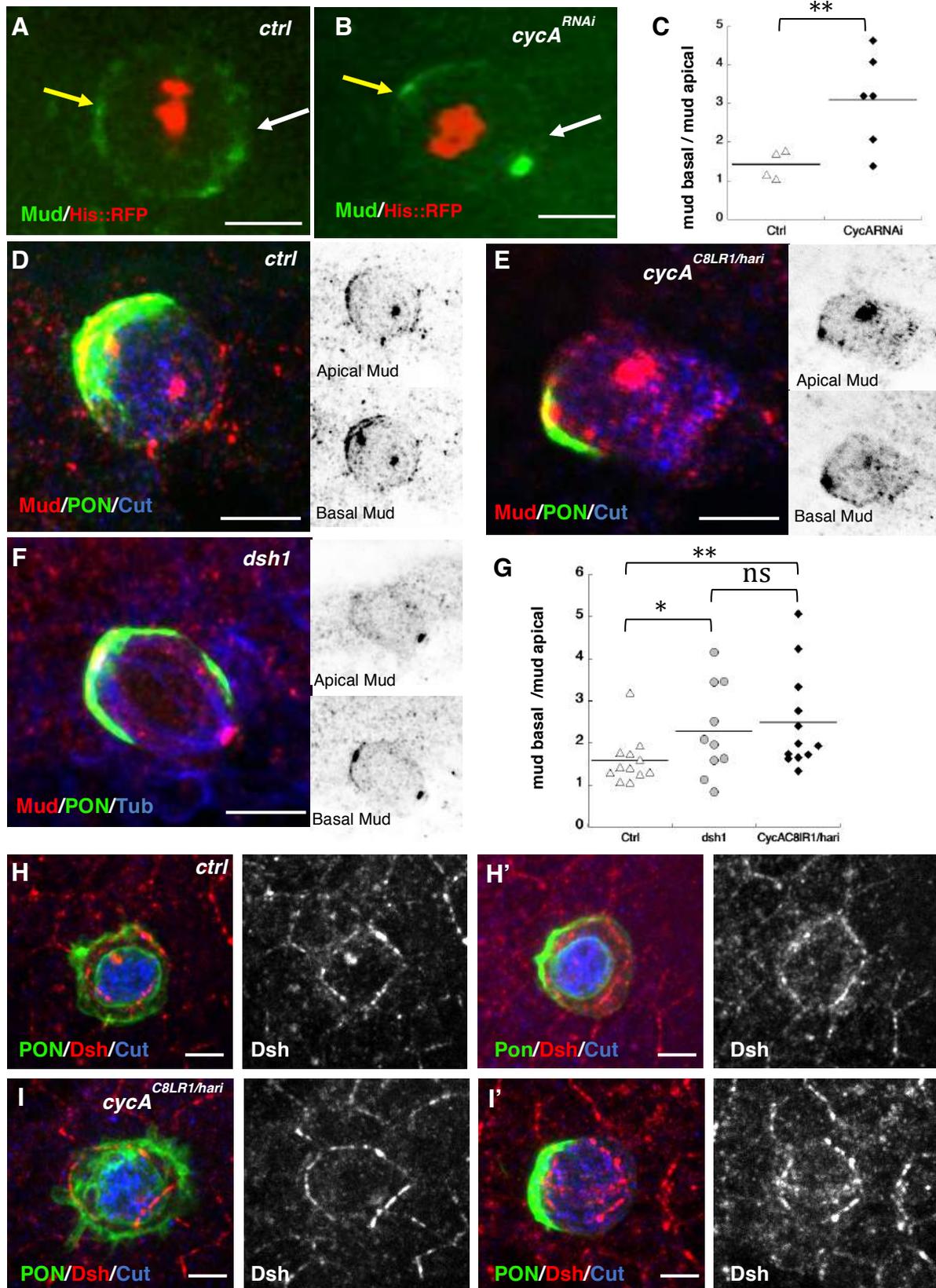


Figure 6: Apical posterior localization of Mud/NuMA is impaired in CycA LOF. (A-C) Apical posterior Mud enrichment in *CycA^{RNAi}* background. Live imaging of Mud::GFP (green) in control **(A)** and *CycA^{RNAi}* **(B)** pupae expressing H2B::RFP (red). Snapshots correspond to pI metaphase. Yellow and white arrows indicate Mud cortical localization at the basal-anterior and apico-posterior pole of the pI cell respectively **(C)** Dot plots showing the quantification of the Mud crescent intensity corresponding to the ratio of the anterior intensity against the posterior one (n=4 and 6 in pI control and *CycA^{RNAi}* cells respectively). Note that Mud enrichment at the apical-posterior pole is decreased under *CycA^{RNAi}*. Note that this ration increased corresponding to a reduction in the apical-posterior Mud enrichment under *CycA^{RNAi}*. **(D-G)** Apical posterior Mud enrichment on fixed nota of control **(D)**, *CycA^{C8r1/hari}* **(E)** and *dsh¹* **(F)** of 17 h APF old pupae. Sensory cells were identified using Cut immunoreactivity (blue in **D, E**) and PON::GFP (green, **D-F**). Mud immunoreactivity is in red. Apical and basal sections of the Mud staining are shown in inverted color in the top and bottom inset respectively. **(G)** Dot plots showing the quantification of the Mud crescent intensity corresponding to the ratio of the anterior intensity against the posterior one (n=12 in control; n=10 in *dsh¹* and n=12 in *CycA^{C8r1/hari}*). Note that decreasing Mud enrichment at the apical-posterior pole is on the same extend for *CycA* and *dsh* LOF. **(H-I')** Dsh localization is not impaired in *CycA* LOF **(I, I')** compared to the control situation **(H, H')** in 17h APF old pupae. Cells at the onset of the mitosis **(H, I)** and during the metaphase **(H' I')**. Cut immunoreactivity (blue); PON::GFP (green) and Dsh immunoreactivity (red). Posterior on the right. * p ≤ 0,1; **p ≤ 0,05 and ns not significant. Scale bars: 5 μm.

Discussion

How cortical polarity is related with asymmetric cell division remains a fundamental question in developmental biology. We report here that a main cell cycle factor, CycA, links PCP cues to spindle orientation during planar ACD. Indeed, we show that a pool of CycA is cortically localized at the apical-posterior cortex of the pI cells in response to the PCP cues. Moreover, this cortical CycA is required to localize Mud at this specific part of the cortex allowing the control of the mitotic spindle orientation. This new CycA function distinct from its function in cell cycle progression highlights a fascinating aspect of biological processes coordination where factors that are hijacked from their main function to assure others in a cell or tissue specific-manner.

The study of the intra-cellular localization of cyclins has centered on their nucleo/cytoplasmic partitioning or their association with spindle components. As such, it has been described that CycA localizes with the centrosomes in late G2 phase in Hela cells⁴⁴ and with the fusome/spectrosome in *Drosophila* germline^{37,45}. Our data reveal a CycA cortical enrichment, dependent on PCP factors, in sensory precursor cells undergoing planar ACD. In the notum, epithelial cells and sensory precursor cells are both submitted to the PCP cues and yet only precursor cells have a cortical CycA, revealing the existence of an unknown mechanism controlling this specificity. We propose that this specificity is required to obtain a normal morphogenesis during sensory organ formation. Indeed, although both cell types divide into the epithelial plane, epithelial daughter cells are maintained in the epithelium while the sensory precursors daughter cells escaped from the epithelium constraints to organize themselves and form an organ. Planar spindle orientation in epithelial cells is driven by the localization of Mud at the tricellular junctions, which acts as landmarks to ensures that epithelial cells divide into the plane of the tissue^{46,47}. In contrast, we propose that the recruitment of Mud at the apical-posterior cortex by the cortical CycA during G2/M transition bypasses the Mud landmarks to orient precursor cell division, releasing sensory precursor daughter cells from epithelial constraints. Further detailed studies of sensory organs cell shape during the formation of these organs are required to study this possibility.

As our data show that CycA, localized at the apical-posterior cortex, acts in concert with Fz/Dsh complexes, more particularly that Fz/Dsh complexes recruit CycA at the cortex, it is expected that CycA LOF would induce a similar phenotype than the one observed in *fz* and/or *dsh* LOF. However, in *fz* or *dsh*¹ mutant pI cells, the spindle manifests a random orientation relative to the antero-posterior axis and is less orthogonally tilted along the apico-basal axis¹⁴ while in *CycA* LOF the spindle orientation is only deflected along antero-posterior axis and is more orthogonally tilted along the apico-basal axis (this work). The phenotype observed in *CycA* LOF is more similar to what obtained in absence of HPG pathway (in *pins*, *gai* or *ric8* mutants), where the antero-posterior orientation is normal but where the spindle is strongly tilted along the apico-basal axis, HGP activity counterbalancing the Fz/Dsh activity to maintain the apico-basal tilt of the spindle within the plane of the epithelium²³. One possibility to explain differences observed between *CycA* and *fz* mutant phenotype is that *CycA* would act only on spindle attachment whereas

Fz/Dsh would have a more global impact on the cell polarization. In agreement with this idea, it has been shown in *dsh¹* mutant pI cells, that the basal-anterior crescent of determinants was extended explaining the more randomized spindle orientation observed in *fz* mutant pI cells⁴⁸. In contrast we observed that *CycA* is downstream of *fz/dsh* and that downregulation did not impact the organization of the basal-anterior crescent (see figure S3). This indicate that *CycA* and *fz* LOF are only partially redundant to control orientation of the pI division, Fz defines and maintains both opposite domains, whereas *CycA* controls only the integrity of the apical-posterior domain.

During pI division, dynein located at each pole of the spindle generates forces to orient the spindle. Dynein is recruited by Mud, that is recruited on the one hand by Pins at the basal-anterior pole²³ and, on the other hand, by *CycA* acting downstream Dsh at the apical-posterior pole (this study). As such, the more orthogonally oriented spindles relative the epithelial plane observed in *CycA* LOF may be due to the unbalanced forces that orient the mitotic spindle since the basal-anterior force is not counterbalanced by the apical-posterior one due to the impairment of Mud recruitment at this location. Two mechanisms may be proposed to explain how *CycA* recruit Mud at the posterior cortex, either *CycA* acts directly on Mud to authorize its cortical localization or it acts by indirectly via another pathway. In the first case, *CycA* may act together with its canonical partner Cdk1 to phosphorylate Mud or alone as a scaffold protein. Mud phosphorylations by mitotic complexes has already been described²⁴. Thus, Cdk1 mediated phosphorylation on threonine 2055, has been shown to regulate negatively Mud cortical localization in Hela cells at the metaphase-anaphase transition⁴⁹. Two other Cdk1 phosphorylation sites, on threonine 168 and 181, have also been shown to be critical to control dynein recruitment by Mud during *C. elegans* mitosis and meiosis⁵⁰. These multiple phosphorylation sites ensure a tight equilibrium to control the MUD cortical accumulation/function and in turn a fine-tuning of spindle positioning. It remains to be known whether *CycA* is a partner of Cdk1 for these phosphorylation events. Another possibility is that *CycA* acts alone on the control of spindle orientation. It has been already shown that *CycA* can act without association with Cdk1. Thus, *CycA* alone negatively regulates fibroblasts cellular motility by enhancing the activation of RhoA, a little G-protein known to regulate several aspects of the actin meshwork dynamics independently of its Cdk1 binding⁵¹. As such, *CycA* could behave as a scaffold protein to organize the apical-posterior complex into a functional unit to control the Mud recruitment. As second mechanism, we cannot exclude the possibility that *CycA* acts through an indirect way. For instance, *CycA* can modulate the cytoskeleton at the apical-anterior pole by modulating the actin microfilaments, which in turn would authorize the cortical Mud recruitment. It is interesting to note that Canoe, a Rho GTPase that activates Diaphanous, which nucleates actin filaments, interact with Dsh⁵². As such, *CycA* could regulate the actin cytoskeleton specifically at the apical-posterior pole of the pI precursor, by modulating the activity of Canoe that in turn will impact on Diaphanous activity. Further studies are now required to determine precisely the molecular mechanism by which *CycA* regulates spindle orientation.

To conclude, our study adds another component to the complex regulatory network of ACD. Even if the basic mechanism of ACD seems to be universal, divergences leading to formation of specific cortical modules, occur in particular tissue-, cell types- contexts, especially to regulate spindle orientation. The one described on our paper allows to link planar cell polarity, cell cycle progression and spindle orientation revealing the fundamental role of *CycA* to coordinate cell proliferation and tissue architecture.

Methods

Genomic engineering

CycA::eGFP is a CRISPR:Cas9 strain made by InDroso functional genomics (Rennes, France). The eGFP sequence was inserted at the C-terminal end of the *CycA* sequence using the gRNA target sequence 5' CGACTTCG/ATCAGCTCTGTGAGG 3'. The selection marker is inserted just before the STOP codon of the eGFP. After its removal, it will leave a scar of 34 nt corresponding to the *LoxP* insertion site. The line is homozygous viable. PON-CA and PH-CA were made using recombinant PCR, which allows to generate chimeric proteins. Constructs were generated from plasmids containing the UAS-HA-*CycA* sequence (pAD 224, gift from Y. M. Yamashita), the PON antero-basal localization domain and the PIP2-specific pleckstrin-homology domain of phospholipase C δ allowing distribution along the plasma membrane (pGEM/PH-RFP called thereafter PH) (both gifts from F. Schweisguth Pasteur Institute, Paris, France). Three straddling PCR using chimeric primers between *CycA* and PON or PH sequences were performed.

The 5' and 3' fragments of the *CycA* gene were amplified using the following primers:

Forward-5'*CycA*: 5'GTCTACGGAGCGACAATTCAATTC3'

Reverse-5'*CycA*-PON : 5'CGCGCGGGTGCCTTCAGCGTAATCTGGAAC3'

Reverse-5'*CycA*-PH: 5'GATGTTCCAGATTACGCTGCAGGATGATGAGG3'

Forward-3'PON-CA: 5'GCAACCGCCAAGTCCCCCATGGCCAGTTTCC3'

Forward-3'PH-CA: 5'CCGGTCGCCACCTCCCC ATGGCCAGTTTCC3'

Reverse-3'*CycA*: 5'CTGAACCACTTCCAGGAACC

The PON and PH fragments were amplified using the following overlapping primers:

Forward *CycA*-PON: 5'GTTCCAGATTACGCTGAAGGCACCCGCGCG3'

Reverse PON-*CycA*: 5'GGAAACTGGCCATGGGGGACTTGGCGGTTGC3'

Forward *CycA*-PH: 5'GATGTTCCAGATTACGCTGCAGGATGATGAGG3'

Reverse PH-*CycA*: GGAAACTGGCCATGGGGGAGGTGGCGACCGG3'

A first round of PCR allowed to amplify each fragment, which then will be used as template two by two to generate the following overlapping fragments: Forward-5'*CycA*-Reverse PON/PH-*CycA*; Forward-5'*CycA*- Reverse PON/PH-*CycA*. Then, both fragments will be amplified using Forward-5'*CycA* and Reverse-3'*CycA* to generate the complete PON/PH-CA sequence. All PCR were performed using the *pfu* DNA polymerase (Promega) and each resulting fragment was sequenced to verify the absence of mutations. Then the fragments *Bgl*II-*Eco*RV of the UAS-HA-*CycA* were replaced by the PON-CA and PH-CA

fragments allowing to obtain a UAS-PON-CA and a UAS-PH-CA sequences into a pCasSpeR 3 vector. Transgenic flies were generated by BestGene Inc. (Chino Hills, CA).

Fly strains

Fly crosses were carried out at 25°C except where otherwise stated. *CycA* mutant condition was obtained by crossing *CycA*^{C8LR1} (Bloomington Drosophila stock center) and *CycA*^{hari 31} alleles. *fz*^{K21} and *fz*^{KD4} are null alleles, whereas *dsh*¹ is a homozygous viable, PCP-specific allele⁴¹. Sensory cells were followed using the *pneurD-H2B::RFP*, in which the histone H2B gene is under the control of a part of the *neuralized* gene (gift from F. Schweisguth). The GAL4/UAS expression system⁵³ was used to express the UAS-constructions. As a GAL4 driver, we used the line *neuralized*^{p72-Gal4} (*neur*) for the mechanosensory bristle cell lineage expression¹⁵ and the line Daughterless-Gal4 (*da-Gal4*) for the embryonic expression (gift from C. Carré). The UAS constructs expressed were the following: *UAS-histone H2B::YFP* (*UAS-H2B::YFP*)¹⁵, *UAS-histone H2B::RFP* (*UAS-H2B::RFP* gift from Jean René Huyng); *UAS-PON::GFP* (Lu et al., 1999), *UAS-fz::myc* (gift from F. Schweisguth), *UAS-CycA::HA* (gift from Y. M. Yamashita). *UAS-CycA*^{RNAi} (VDRC) was expressed at 0 h after pupal formation (APF) using the temperature conditional line *tubulin-GAL80^{ts}* (gift from D. Cohen). The *arm-Fz::GFP* line is described in Strutt et al (2001), the *mud-GFP* (*mud::GFP*[50E1]/*CyO-GFP*; *mud::GFP*[62E1], *mud::GFP*[65B2]/TM6) and *DE-Cadherin::GFP* kindly gift from Y. Bellaïche.

Genotypes for each figure :

- Figure 1:** **A-C)** *neur>UAS-H2B ::YFP*
 D, E) *pneurD-H2B::RFP ; CycA::eGFP*
- Figure 2:** **A-D)** *arm-fz::GFP*
 E) *arm-fz::GFP/dsh-dsh::myc ; UAS-CycA::HA/da-Gal4*
- Figure 3:** **A)** *w¹¹¹⁸*
 B) *fz^{K21}/fz^{KD4}*
 C) *dsh¹/Y*
 D) *pneurD-H2B ::RFP ; CycA::eGFP / +*
 E) *dsh¹/Y ; pneurD-H2B ::RFP ; CycA::eGFP / +*
 F) *neur>UAS-fz ::myc*
- Figure 4:** *neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP/+*
 pneuD-H2B ::RFP/+ ; neur>UAS-PON ::GFP, CycA^{C8LR1}/CycA^{hari}
 tubulin-Gal80^{ts} /+ ; neur> UAS-his::RFP, UAS-pon::GFP/+
 UAS-CycA^{RNAi}, tub-Gal80^{ts}/+ ; neur> UAS-his::RFP, UAS-pon::GFP/+
- Figure 5** *neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP /+*
 UAS-PON-CA /+ ; neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP /+
 neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP /UAS-PHCA
 CycAC8LR1 / neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP
 UAS-PON-CA /+ ; CycAC8LR1 / neur>UAS-H2B ::RFP, UAS-PON ::GFP
- Figure 6** **A)** *mud::GFP*[50E1]/+ ; *mud::GFP*[62E1], *mud::GFP*[65B2] / *neur<UAS-H2B ::RFP*
 B) *mud::GFP*[50E1]/ UAS-CycA^{RNAi}, tub-Gal80^{ts} ; mud::GFP[62E1],
 mud::GFP[65B2] / *neur>UAS-H2B::RFP*
 D,H) *neur>UAS-PON ::GFP*
 E) *neur>UAS-PON ::GFP, CycA^{C8LR1}/CycA^{hari}*

- F)** *dsh¹/Y*
I) *neur>UAS-PON::GFP, CycA^{C8LR1}/CycA^{hari}*
- Figure S1:** **A)** *neur>UAS-PON::GFP/+*
B) *w¹¹¹⁸*
C and D) *pneurD-H2B::RFP; CycA::eGFP/+*
- Figure S2:** **A, C)** *arm-fz::GFP*
B) *arm-fz::GFP;neur>UAS-CycA::HA*
D) *DE-Cadherin::GFP*
- Figure S3** **A)** *w¹¹¹⁸*
B) *CycA^{C8LR1}/CycA^{hari}*
C) *UAS-CycA^{RNAi}, tub-Gal80^{ts}/+; neur> UAS-his::RFP, UAS-PON::GFP/+*

Live imaging and angles measurement

We performed live imaging of sensory cells following protocols described previously^{42,54}. White pupae were collected at 0h APF and aged at 25°C in a humid chamber. At 17h APF old pupa were mounted for imaging on double sided tape stuck to a slide. The living pupa is put on the thermo-stated chamber in which the temperature was carefully controlled ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) using a homemade Peltier device temperature controller fixed to the microscope stage. Live imaging data were collected using a spinning disk coupled to an Olympus BX-41 microscope (Roper Scientific, 40X or 60X, NA 0.75 objective, CoolSnapHQ2 camera). Systems were driven by Metamorph software (Universal Imaging). Z-stacks of images were acquired with a step of 1 μm every 3 min and assembled. All analyses were performed using the fiji software.

To image CycA::eGFP, we used *pneur-H2B::RFP* or the *neur>UAS-H2B::RFP* combination to visualize sensory cells throughout the progression of the bristle lineage.

Measure of pI division angles were performed from animals all expressing under the SOP lineage specific *neur-Gal4: histone* coupled to RFP to visualize the DNA, and PON coupled to GFP to visualize the anterior part of the cell. Angles of division (α_{xy}) are calculated by measuring the angle formed between the midline and the line between the two nuclei. If the PON::GFP crescent is pointed to the anterior, the angle is between 0 and 90 and, if towards the posterior between 90 and 180°. If towards midline, the angles are positive, otherwise negative. Angles of division α_{xz} are calculated using $\tan(\alpha) = b/a$ when (a) is the distance in μm between the two nuclei (a) and (b) the difference between the z-slices between of the nuclei. If the posterior nuclei is above the anterior, the angle is considered positive.

Times of division are recorded from the beginning of DNA condensation to the separation of the two daughters' nuclei.

Immunostaining

Pupal nota were dissected at 17-21 h APF and processed as previously described (Gho et al. 1996). Primary antibodies used were: rabbit anti-aPKC (gift from Y. Bellaïche, 1:500), mouse anti-Cut (DSHB, #2B10, 1:500); rabbit anti-GFP (Santa-Cruz Biotechnology,

#sc- 8334; 1:500); mouse anti-GFP (Roche, No 11 814 460 001, 1:500); rabbit anti-CycA (a gift from P. O'Farrell (UCSF, CA, USA), 1:500); rat anti-Dsh (gift from T. Uemura, 1/500), rabbit anti-Mud (gift from Y. Bellaïche, 1/500), Mouse anti-Myc (roche, 1/500), rabbit anti-Pdm1 (gift from T. Pr eat;  cole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, Paris, France; 1:200), rabbit anti-pTyr (1/500), and rat anti-gtubuline (gift from M.H. Verlhac, 1/500). Alexa 488-conjugated secondary anti- mouse (#A11029), anti-rat (#A11006), anti-rabbit (#A11034), Alexa 568-conjugated secondary anti-mouse (#A11031), anti-rat (#A11077), and anti-rabbit (#A11011) were purchased from Molecular Probes and used at 1:1000. Cy5-conjugated antibodies anti-mouse (#715-175-151), anti-rat (#712-175-153), or anti-rabbit (#711-175-152) were purchased from Jackson Immunoresearch and were used at 1:2000. Proximity Ligation Assays (PLA) were performed to detect *in situ* pairs of CycA::HA (a gift from P. O'Farrell (UCSF, CA, USA), Fz::GFP, DE-Cad::GFP (mouse anti-GFP, Roche, No 11 814 460 001, 1:500) epitopes following the protocol of DuoLink's kit. Epitopes closely located (<40 nm) form a pair that can be detected as a single fluorescent dot. Dots come from the combination of two secondary antibodies, each coupled to a single-strand DNA probe and revealed by fluorescently labelled oligonucleotides. PLA detection was counterstained with the immunodetection of the CycA and His::YFP. Nota were dissected and fixed as previously described. At the end of the staining, nota were incubated in PBS-Glycerol (80%-20%), and then mounted in PBS 16%, Glycerol, 80% and N-PropylGallate 4%.

For immunofluorescence and PLA experiments, images were obtained using a spinning disk coupled to an Olympus BX-41 microscope (Roper Scientific, 40X or 60X, NA 0.75 objective, CoolSnapHQ2 camera) and processed with Fiji software.

Stimulated emission depletion (STED) microscopy were performed on immunostaining performed as described above except that secondary antibodies were raised against Rat and Rabbit (Sigma Aldrich, Anti-Rabbit Abberior® Star 635 and Anti-Rat 580, both at 1/100) and the mounting media was Prolong Gold (ThermoFisher P36930). Images were acquired with a Leica SP8 STED 3D microscope, with the HC PL APO CS2 93 x/1.30 GLYC objective. We tuned the White Light Laser (WLL) at 650 nm for the excitation. The detector was a HyD. The pixel size is 0,087 µm and the z step size is 0,332 µm. Deconvolution was made with the Huygens software.

Co-immunoprecipitation

Embryos over-expressing tagged forms of the FZ::GFP, Dsh::myc and CycA::HA proteins (Arm>frizzled::GFP/ Dsh>Dsh::myc ; daughterlessGAL4/ UAS-CycA::HA) were dechorionated with bleach then lysed in buffer (Tris pH 7,5 200mM, NaCl 150 mM, NP40 0,2%, DTT 1,5mM, EDTA pH8 10mM, PMSF 1mM, b-glycerophosphate 80mM, cocktail of protease inhibitors). The extracts were centrifuged and the supernatant was retrieved. This lysate was then incubated with beads coupled to HA antibodies (Pierce), 3h at 4°C. Then washed three times in TBS-Tween 0,05% 1X (NaCl 50mM, Tris pH7,8 10mM). The elution was performed in glycine pH 2 at 200mM, then neutralized by Tris pH8,5 at 1M after 5 min. Elution were analyzed by western blot, using a ø=0,22 µm cellulose membrane. The membranes were saturated with milk 0,5% with TBS-Tween and incubated overnight

à 4°C with antibodies: anti-HA (rat, Roche, 1/500), anti-Cdk1 (rabbit, gift from Dr A. Glavic, 1/1000), anti-Dsh (rat, 1/500, gift from Dr Uemura) and anti-GFP (rabbit, Abcam 1/500). Then the membranes were washed in TBS-Tween x3 and revealed using HRP conjugated antibodies (rat 1/5000, rabbit 1/10000) and Western Lighting © Plus-ECl (PerkinElmer).

Quantification and statistical analyses

Normalized Mud intensity were determined for figure 6. Intensity of fluorescence for Mud crescent was measured using ImageJ or Fiji. For each crescent, the most brilliant three z-slices (step of 0,5 um) were chosen. Then the Raw-Intensity of the pixels (lassoed by hand, excluding the centrosomes) was measured and then compiled. For the fixed experiments, anterior was defined following the PON::GFP staining. Ratios of the anterior intensity against the posterior were plotted on Kaleidagraph software. Statistical significance is calculated by Wilcoxon test, **: $p < 0,05$, ns: not significant.

For each STED quantification, an extraction of the signal was done along a line passing through the CycA crescent (freehand line tool, 2 mm of width at the apical pole) of the pI cells using plot profile plugging from imageJ software. Then data were normalized, the highest value used as reference 1 and correlation between distances and pixels was done for each image. The data are plotted using excels software.

To test whether angles distribution differed significantly, an unpaired nonparametric t-test (Mann-Whitney test) was performed for the axy angles since all distributions are normal using the shapiro & wilk test and for the axz, a Wilcoxon test was used since angles were not normally distributed (shapiro & wilk test). Tests were performed using the kaleidagraph software. For each curve, the mean \pm the standard deviation is indicated the main text. ***: $p < 0,001$, ns: not significant.

References

1. Dudka, D. & Meraldi, P. Symmetry does not come for free: Cellular mechanisms to achieve a symmetric cell division. in *Results and Problems in Cell Differentiation* **61**, 301–321 (Springer Verlag, 2017).
2. Morin, X. & Bellaï, Y. Review Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. (2011). doi:10.1016/j.devcel.2011.06.012
3. Goodrich, L. V & Strutt, D. Principles of planar polarity in animal development. *Development* **1892**, 1877–1892 (2011).
4. Baena-López, L. A., Baonza, A. & García-Bellido, A. The orientation of cell divisions determines the shape of Drosophila organs. *Curr. Biol.* **15**, 1640–1644 (2005).
5. Quesada-Hernández, E. *et al.* Stereotypical cell division orientation controls neural rod midline formation in zebrafish. *Curr. Biol.* **20**, 1966–1972 (2010).
6. Pease, J. C. & Tirnauer, J. S. Mitotic spindle misorientation in cancer - out of alignment and into the fire. *J. Cell Sci.* **124**, 1007–1016 (2011).
7. Jeffery, C. J. Why study moonlighting proteins? *Front. Genet.* **6**, (2015).
8. Segalen, M. & Bellaïche, Y. Cell division orientation and planar cell polarity pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 972–977 (2009).
9. Carvajal-Gonzalez, J. M. & Mlodzik, M. Mechanisms of planar cell polarity establishment in

- Drosophila. F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
10. Matis, M. & Axelrod, J. D. Regulation of PCP by the fat signaling pathway. *Genes Dev.* **27**, 2207–2220 (2013).
 11. Peng, Y. & Axelrod, J. D. *Asymmetric Protein Localization in Planar Cell Polarity. Planar Cell Polarity During Development* **101**, (Elsevier Inc., 2012).
 12. Yang, Y. & Mlodzik, M. Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 623–646 (2015).
 13. Harrison, C., Shao, H., Strutt, H. & Strutt, D. Molecular mechanisms mediating asymmetric subcellular localisation of the core planar polarity pathway proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **48**, 1297–1308 (2020).
 14. Gho, M. & Schweisguth, F. Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* (1998). doi:10.1038/30265
 15. Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H. & Schweisguth, F. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **3**, 50–7 (2001).
 16. Dewey, E. B., Taylor, D. T. & Johnston, C. A. Cell fate decision making through oriented cell division. *J. Dev. Biol.* **3**, 129–157 (2015).
 17. Inaba, M. & Yamashita, Y. M. Asymmetric stem cell division: Precision for robustness. *Cell Stem Cell* **11**, 461–469 (2012).
 18. Schweisguth, F. Asymmetric cell division in the *Drosophila* bristle lineage: From the polarization of sensory organ precursor cells to Notch-mediated binary fate decision. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 299–309 (2015).
 19. Gho, M., Bellaïche, Y. & Schweisguth, F. Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573–84 (1999).
 20. Fichelson, P. & Gho, M. The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. *Development* **130**, 123–133 (2003).
 21. Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Two types of asymmetric divisions in the *drosophila* sensory organ precursor cell lineage. *Nat. Cell Biol.* **3**, 58–67 (2001).
 22. Ségalen, M. *et al.* The Fz-Dsh Planar Cell Polarity Pathway Induces Oriented Cell Division via Mud/NuMA in *Drosophila* and Zebrafish. *Dev. Cell* **19**, 740–752 (2010).
 23. David, N. B. *et al.* *Drosophila* Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1083–1090 (2005).
 24. Radulescu, A. E. & Cleveland, D. W. NuMA after 30 years: The matrix revisited. *Trends Cell Biol.* **20**, 214–222 (2010).
 25. Lehner, C. F. & O’Farrell, P. H. Expression and function of *Drosophila* cyclin a during embryonic cell cycle progression. *Cell* **56**, 957–968 (1989).
 26. Sprenger, F., Yakubovich, N. & O’Farrell, P. H. S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr. Biol.* **7**, 488–499 (1997).
 27. McClelland, M. L., Farrell, J. A. & O’Farrell, P. H. Influence of cyclin type and dose on mitotic entry and progression in the early *Drosophila* embryo. *J. Cell Biol.* **184**, 639–646 (2009).

28. Vigneron, S. *et al.* Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev. Cell* **45**, 637-650.e7 (2018).
29. Dienemann, A. & Sprenger, F. Requirements of Cyclin A for mitosis are independent of its subcellular localization. *Curr. Biol.* (2004). doi:10.1016/j.cub.2004.06.024
30. Ramachandran, V., Matzkies, M., Dienemann, A. & Sprenger, F. Cyclin A degradation employs preferentially used lysines and a cyclin box function other than Cdk1 binding. *Cell Cycle* **6**, 171-181 (2007).
31. Ueda, R. *et al.* Sensory mother cell division is specifically affected in a Cyclin-A mutant of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **11**, 2935-2939 (1992).
32. Pascreau, G., Eckerdt, F., Churchill, M. E. A. & Maller, J. L. Discovery of a distinct domain in cyclin A sufficient for centrosomal localization independently of Cdk binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2932-2937 (2010).
33. Lu, B., Ackerman, L., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Modes of protein movement that lead to the asymmetric localization of Partner of Numb during *Drosophila* neuroblast division. *Mol. Cell* (1999). doi:10.1016/S1097-2765(00)80218-X
34. Vicidomini, G., Bianchini, P. & Diaspro, A. STED super-resolved microscopy. *Nat. Methods* **15**, 173-182 (2018).
35. Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. & Mlodzik, M. Diego and Prickle regulate frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 691-697 (2005).
36. Söderberg, O. *et al.* Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* **45**, 227-232 (2008).
37. Yuan, H., Chiang, C. Y. A., Cheng, J., Salzman, V. & Yamashita, Y. M. Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells. *Dev. Biol.* **361**, 57-67 (2012).
38. Strutt, D. I. Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol. Cell* **7**, 367-375 (2001).
39. Carron, C. *et al.* Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ β -catenin pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2541-2550 (2003).
40. Yanagawa, S. I., Van Leeuwen, F., Wodarz, A., Klingensmith, J. & Nusse, R. The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.* **9**, 1087-1095 (1995).
41. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-118 (1998).
42. Salle, J., Campbell, S. D., Gho, M. & Audibert, a. CycA is involved in the control of endoreplication dynamics in the *Drosophila* bristle lineage. *Development* **139**, 547-557 (2012).
43. Gervais, L., Claret, S., Januschke, J., Roth, S. & Guichet, A. PIP5K-dependent production of PIP2 sustains microtubule organization to establish polarized transport in the *Drosophila* oocyte. *Development* **135**, 3829-3838 (2008).
44. De Boer, L. *et al.* Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* **27**, 4261-4268 (2008).

45. Lilly, M. A., De Cuevas, M. & Spradling, A. C. Cyclin A associates with the fusome during germline cyst formation in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol.* **218**, 53–63 (2000).
46. Bosveld, F. *et al.* Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature* **530**, 495–498 (2016).
47. Bosveld, F., Wang, Z. & Bellaïche, Y. Tricellular junctions: a hot corner of epithelial biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **54**, 80–88 (2018).
48. Bellaïche, Y., Beaudoin-massiani, O., Stüttem, I. & Schweisguth, F. The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. (2004). doi:10.1242/dev.00928
49. Seldin, L., Poulson, N. D., Foote, H. P. & Lechler, T. NuMA localization, stability, and function in spindle orientation involve 4.1 and Cdk1 interactions. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3651–3662 (2013).
50. Portegijs, V. *et al.* Multisite Phosphorylation of NuMA-Related LIN-5 Controls Mitotic Spindle Positioning in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **12**, 1–32 (2016).
51. Arsic, N. *et al.* A novel function for Cyclin A2: Control of cell invasion via rhoa signaling. *J. Cell Biol.* **196**, 147–162 (2012).
52. Johnston, C. A. *et al.* Formin-mediated actin polymerization cooperates with Mushroom body defect (Mud)– Dynein during Frizzled – Dishevelled spindle orientation. 4436–4444 (2013). doi:10.1242/jcs.129544
53. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
54. Simon, F., Fichelson, P., Gho, M. & Audibert, A. Notch and Prospero repress proliferation following cyclin E overexpression in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS Genet.* **5**, (2009)

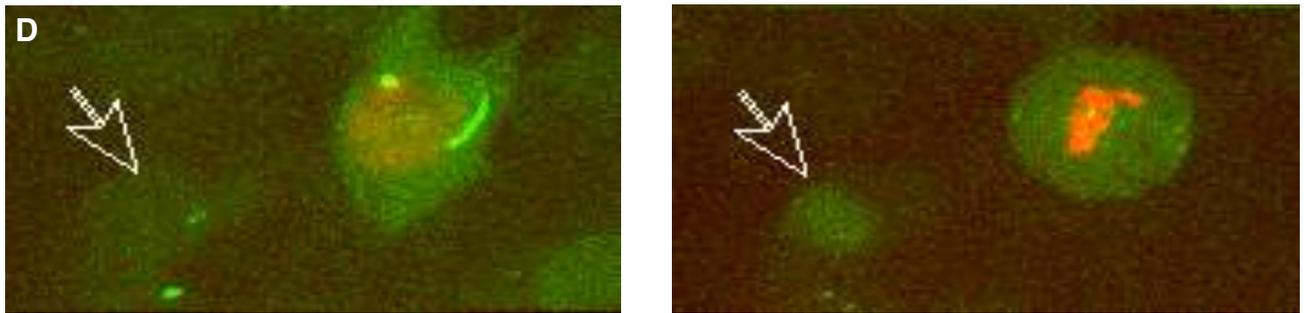
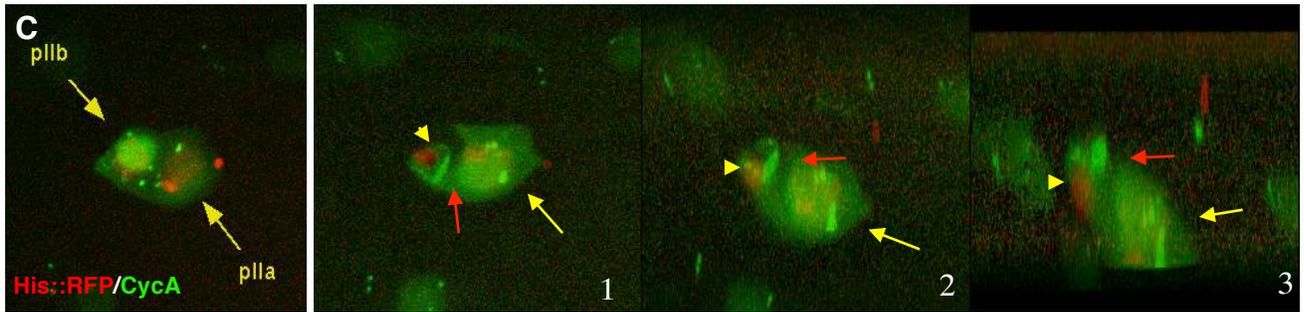
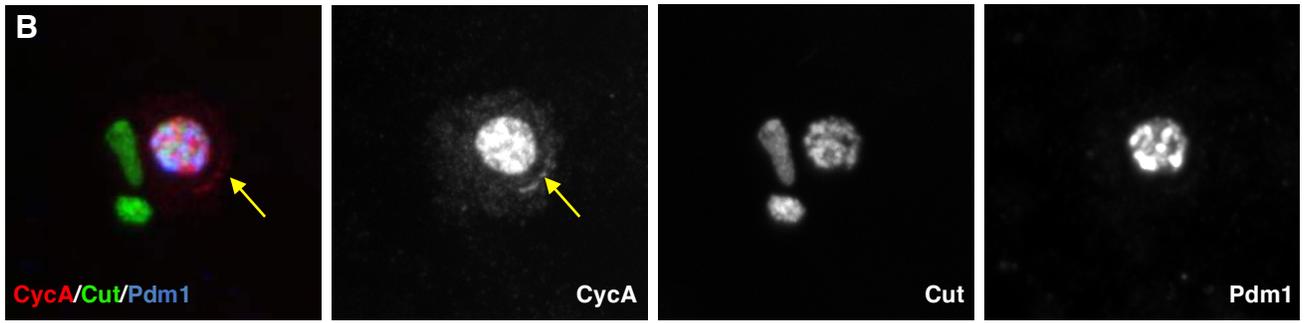
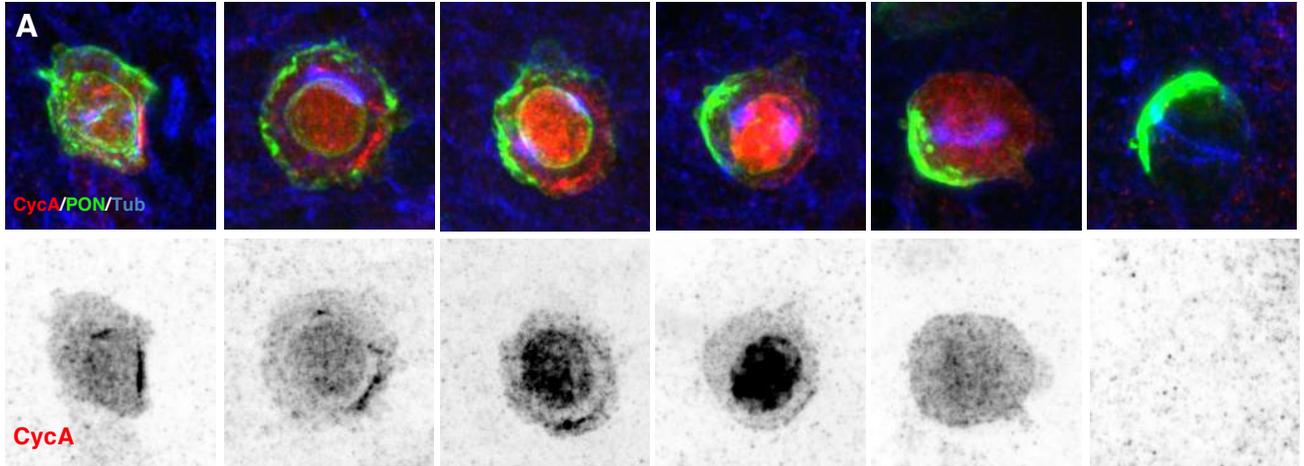


Figure S1: CycA localization in bristle cells lineage and in epithelial cells. (A) Comparison of the PON::GFP and CycA crescent dynamics during pI mitosis in 17 h APF old pupae. Top panel: PON::GFP is in green, CycA and Tubulin immunoreactivities are in red and blue respectively. Bottom panel: CycA alone in inverted color. Note that CycA crescent is formed before the PON::GFP crescent and does not last as long. **(B)** CycA crescent is present during pIIa cell division. Sensory cells are revealed by Cut immunoreactivity (green) and among them pIIa cell is identified by Pdm1 immunoreactivity (blue). Cyc(A) immunoreactivity is in red and the cortical posterior enrichment of CycA in pIIa prophase is pointed by a yellow arrow. **(C)** Snapshot of 4D live imaging of CycA::eGFP movie 2 during pIIb and pIIa mitosis. CycA::eGFP is in green and H2B::RFP to reveal sensory cells in red. pIIb and pIIa are identified by their antero-posterior position and size. Left panel: pIIb prophase and pIIa G2 phase. In pIIb, CycA is nuclear and cytoplasmic a landmark of prophase and no cortical CycA accumulation is detected. Right panel: pIIb anaphase and pIIa prophase. 1- Dorsal view; 2 and 3 - 45° and 90° of lateral view. pIIb anaphase is shown by the condensed DNA and the absence of CycA is pointed by an arrowhead. CycA is detected in nucleus and cytoplasm of the pIIa cell (yellow arrow) and enrichment of cortical cycA (red arrow) is posterior and apical as shown on the panel 2 and 3. **(D)** Snapshot of 4D live imaging of CycA::eGFP movie 4 in epithelial cells. Epithelial cells are identified by the lack of H2B::YFP (red) and CycA is in green (white arrow). Note that no crescent is visualized in epithelial cell prophase identified by the nuclear CycA localization. Posterior on the right. Scale bars: 5 mm for **A** and **D** and 10 mm for **B** and **C**.

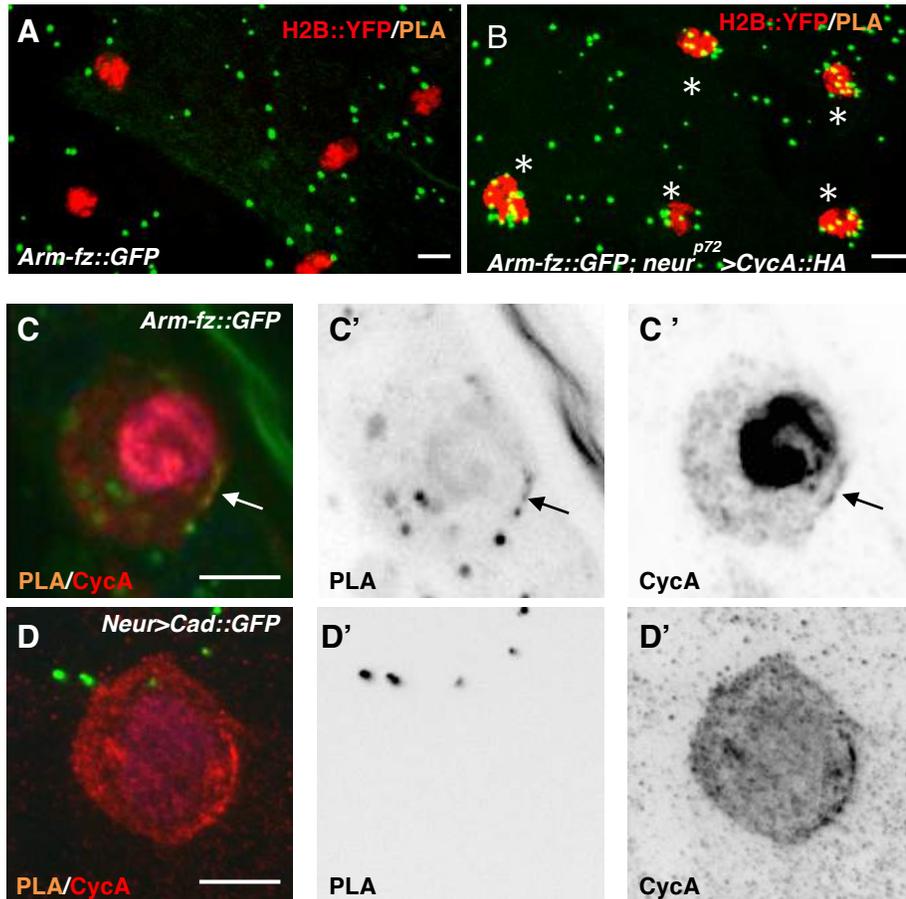


Figure S2: PLA analysis between CycA and Fz. HA-GFP experiments to reveal epitope pairs (green, PLA dots) between CycA and Fz in **A**, **B** and **C** and CycA and Cadherin in **D**. Many CycA-Fz epitope pairs (green dots, stars) were observed on pI cells identified by the presence of H2B::YFP (red) after pI specific CycA overexpression in 17 h APF old pupae expressing *arm-fz* (**B**) whereas no such number of dots are visible in absence of CycA overexpression (**A**). In higher magnification of mitotic pI cells, colocalization of CycA-Fz epitope pairs (green) and CycA immunoreactivity (red) are detected in 17 h APF old *arm-fz* pupae (arrow in **C**). Coincident CycA-Cadherin epitope pairs (green dots) with CycA crescent (red) were never observed (**D**). Separate channels on the right in inverse fluorescence. Posterior is to the right. Scale bars: 10 mm in **A** and **B** and 5 mm in **C** and **D**.

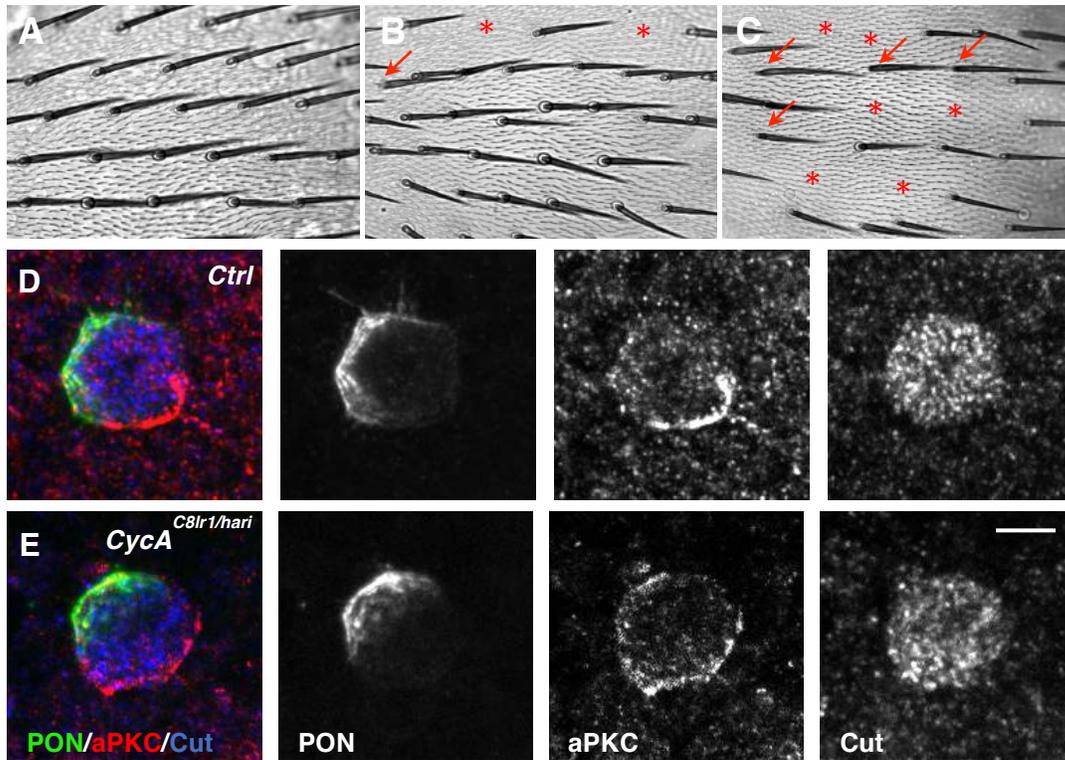


Figure S3: *Cyca* LOF induced a cell cycle arrest without affecting localization of cell fate determinants (A-C) Micrograph of sensory organs at the external level of control (A), *Cyca^{C8r1/hari}* (B) and *Cyca^{RNAi}* (C) adult nota. Missing sensory organs are indicated by red stars and sensory organs without socket cells by red arrows. (D, E) Asymmetry of the pI cell is not impaired in *Cyca* LOF. *Cyca^{C8r1/hari}* (D) compared to the control (E) in 17 h APF old pupae, PON::GFP is in green, and aPKC, a posterior fate determinant in red. Note that, in *Cyca^{C8r1/hari}*, their asymmetric localizations were similar to the one observed in the control. Posterior on the right. Scale bars: 5 mm.

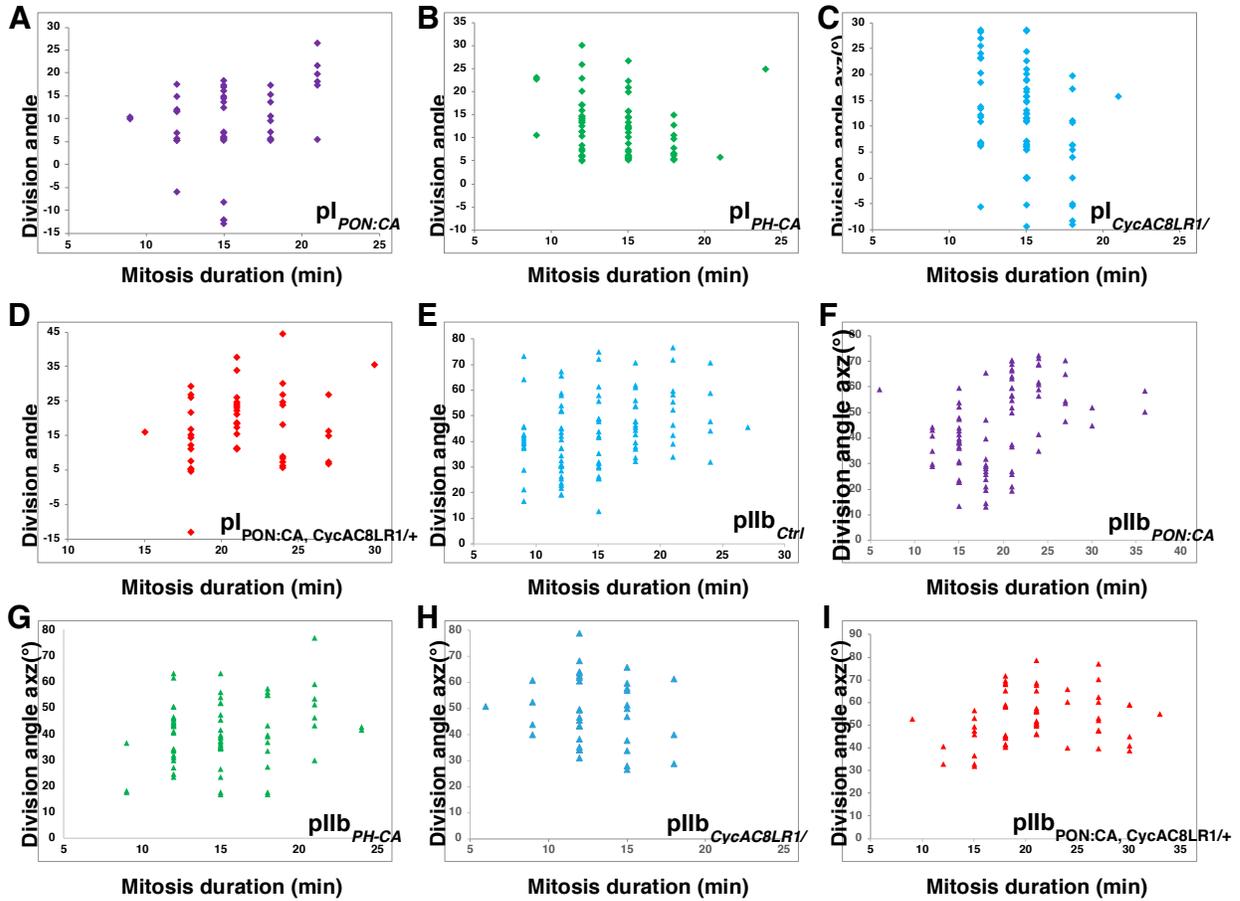


Figure S4: Spindle orientation during pI and pIIb mitosis is independent of the mitosis duration. (A-D) Correlative analyses between the mitosis duration and the axz angles of pI cells in PON-CA (A, n=48), PH-CA (B, n=71), CycA^{C81R1/+} (C, n=77) and PON-CA; CycA^{C81R1/+} (D, n=48). **(E-I)** Correlative analyses between the mitosis duration and the axz angles in pIIb cells in control (E, n=97), PON-CA (F, n=81), PH-CA (G, n=70), CycA^{C81R1/+} (H, n=37) and PON-CA; CycA^{C81R1/+} (I, n=60). Note that for each condition, no correlation is observed between the mitosis duration and the angle measured.

Movie 1: In vivo imaging of a control sensory cell during pI division at 16-17 h APF to follow the intracellular localization of CycA::eGFP. Sensory cells identified by the expression of H2B-RFP (blue). Movies was segmented to separate apical and basal CycA in green and red respectively. Posterior is to the right and the view is dorsal. Each frame was obtained by combining a z-stack (composed of optical sections separated by 1µm) acquired every 2 minutes.

Movies 2: In vivo imaging of a control sensory cells of pIIb and pIIa division at 18-20 h after pupal formation (APF) to follow the intracellular localization of CycA::eGFP. CycA crescent is formed during the pIIa division, and is never observed during pIIb division. Posterior is to the right and the view is dorsal. Each frame was obtained by combining a z-stack (composed of optical sections separated by 1µm) acquired every 3 minutes.

Movie 3: In vivo imaging of a control sensory cells of pIIIb division started at 16 h after pupal formation (APF) to follow the intracellular localization of CycA::eGFP. CycA crescent is formed during the pI and pIIa division, and is never observed during pIIb and pIIIb division. Posterior is to the right and the view is dorsal. Each frame was obtained by combining a z-stack (composed of optical sections separated by 1µm) acquired every 3 minutes.

Movie 4: In vivo imaging of a pI cells and surrounding epithelial cell at 16-17 h after pupal formation (APF) to follow the intracellular localization of CycA::eGFP. Epithelial cells are identified by the lack of H2B::YFP (red) and CycA is in green (white arrow). Note that no cortical apical enrichment of CycA is observed during epithelial cells.

Movie 5: In vivo imaging of a pI cells at 16-17 h after pupal formation (APF) to follow the intracellular localization of CycA::eGFP in heterozygous control context (left) and in *dsh*¹ (right) mutant. Sensory cells identified by the expression of H2B-RFP (red). Note the no CycA crescent are visible in *dsh*¹ mutant pI cells.

Movie 6: In vivo imaging of a pI cells at 16-17 h after pupal formation (APF) to follow the intracellular localization of Mud::eGFP in control context (left) and in *CycA*^{RNAi} (right) mutant. Sensory cells identified by the expression of H2B-RFP (red). Note the no posterior Mud crescent are visible in *CycA*^{RNAi} mutant pI cells.

Résultats supplémentaires

Cycline A dans la division de pIIa

Comme montré dans le manuscrit, Cycline A joue un rôle, par sa localisation corticale, dans l'orientation des divisions asymétriques du lignage cellulaire aboutissant aux soies. La présence de Cycline A au cortex apico-postérieur permet de maintenir la cellule précurseur pI dans le plan de l'épithélium avec une légère inclinaison le long de l'axe A/B appelé tilt. En parallèle de mon étude sur pI, j'ai donc aussi analysé la localisation de Cycline A dans pIIa ainsi que son impact sur l'orientation de sa division.

1. Cycline A corticale est requise pour l'orientation de pIIa

Il a été montré que la division de pIIa se fait aussi dans le plan de l'épithélium avec la même orientation que sa cellule mère (Le Borgne et al, 2002). Par ailleurs, à sa formation, pIIa est intrinsèquement liée à sa cellule soeur pIIb par son pied apical. J'ai montré qu'une fraction de Cycline A se localise aussi au pôle apical postérieur de pIIa (**Figure S1 de l'article**). De plus, on retrouve aussi dans cette cellule une co-localisation avec Frizzled (**Figure 25A**). J'ai donc ensuite analysé si Cycline A était aussi impliquée dans le contrôle de l'orientation de la division de pIIa.

Mes données montrent que, chez le contrôle, les divisions de pIIa sont orientées selon l'axe A/P avec des angles dont la moyenne est de $25,22^\circ \pm 2,00$, $n=96$ (courbe bleue de la **Figure 25C**). Selon l'axe A/B, pIIa se divise aussi avec un léger tilt avec une moyenne de $12,49^\circ \pm 0,73$, $n=84$ (courbe bleue de la **Figure 25D**). Ces données indiquent que la division de pIIa se fait comme celle de pI (moyenne_{ctrl} = $12,71^\circ \pm 1,02$, $n=84$). Afin de définir si l'orientation de pIIa est contrôlée par Cycline A de la même façon que celle de pI, j'ai analysé les phénotypes induits par sa perte de fonction ainsi que par sa relocalisation ectopique.

En perte de fonction *cycline A* (*cycA^{hari/C8LR1}*), selon l'axe A/P pIIa tend à se diviser avec une distribution des angles beaucoup plus étendue que celle obtenue en contexte contrôle avec des angles allant de -125° à $+175^\circ$ contre -75 à 100° ($p_{\text{CTR-CycAC8LR1/hari}}=0,000357$) et une moyenne de ces angles de $0,51^\circ \pm 8,32$, $n=58$. Ce résultat montre une tendance randomisée de l'orientation de la division de pIIa (courbe rouge pleine de la **Figure 25C**). Selon l'axe A/B, pIIa se divise avec un angle plus grand de moyenne $30,10^\circ \pm 2,45$, $n=36$ ($p_{\text{CTR-CycAC8LR1/hari}} < 0,0001$, courbe rouge pleine de la **Figure 25C**), donc une division plus orthogonale au plan de l'épithélium.

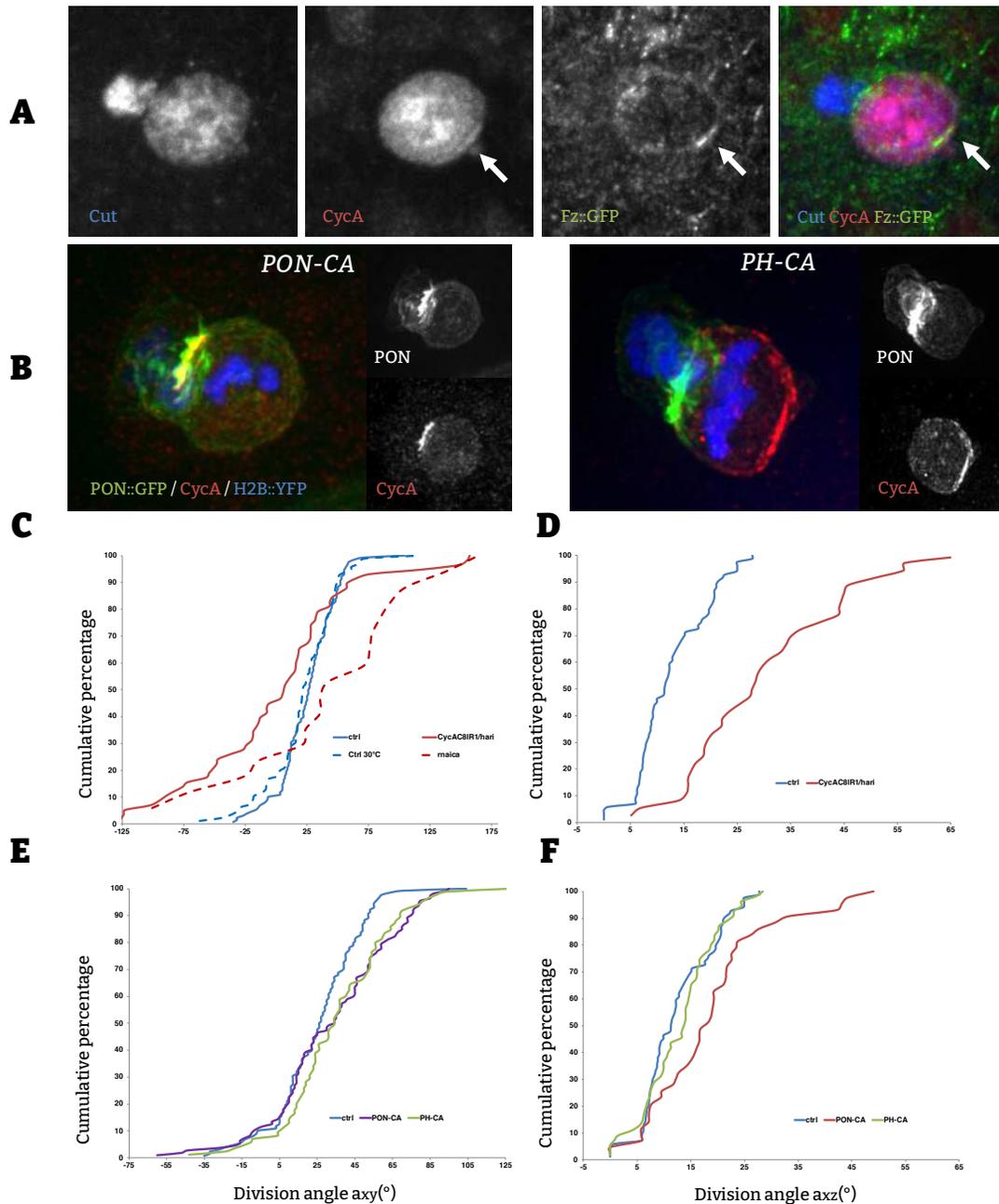


Figure 25: Cycline A corticale dans la division de pIIa **A)** Cycline A se localise au cortex de pIIa avec le facteur de la PCP, Frizzled. CycA rouge, Cut bleu (lignage), Frizzled vert (arm-Fz::GFP). Postérieur à droite. **B)** localisation corticale ectopique de Cyclines A en pIIa: PON::CA à gauche et PH::CA à droite. L'antérieur est identifié par la présence corticale de PON::GFP en vert. Cycline A en rouge: à gauche, le signal de Cycline A::PON coïncide avec celui de PON::GFP et à droite le signal de Cycline A::PH est uniforme au cortex. ADN en bleu. **C, D, E et F)** Orientation de la division de pIIa. Graphes représentant les angles ($^{\circ}$) du fuseau mitotique par rapport à l'axe A/P (xy, **C et E**) et l'axe A/B (xz **D et F**) en abscisse et le pourcentage cumulatif en ordonné, **C et D)** la courbe correspondant au contrôle est en bleu alors que celle correspondant à la perte de fonction *cycline A* en transhétérozygote est en marron. La courbe du contrôle pour les expériences de perte de fonction de Cycline A par RNAi est en bleu pointillé (réalisé à 30 $^{\circ}$ C) et celle de la perte de fonction par RNAi Cycline A en marron pointillé. **E et F)** Le courbe contrôle est en bleu, celle correspondant à PON::CycA en violet et en vert pour PH::CycA.

La même chose est observée lors de l'expression d'un RNAi contre Cycline A, où l'amplitude des angles selon l'axe A/P est beaucoup plus grande que celle du contrôle, avec des angles extrêmes allant de -180° à $+180^\circ$ avec une moyenne de $22,17^\circ \pm 2,79$, $n=96$ contre $44,43^\circ \pm 16,83$, $n=17$ en RNAi Cycline A ($p_{\text{ctr-RnaiCycA}}=0,023$, courbe pointillée de **Figure 25C**). Les données sont donc similaires à celles obtenues pour la division de pI (moyenne $pI_{\text{CycAc81r1/hari}}=21,08^\circ \pm 3,36$, $n=64$). Dans un contexte d'expression de Cycline A ectopique au cortex, nous avons pu observer qu'il y avait des réorientations des divisions de pI et de pIIb donc nous avons aussi analysé pIIa dans ce contexte de gain de fonction de Cycline A au cortex. Selon l'axe A/P, une augmentation des angles supérieurs à 25° montre que les divisions s'orientent dans une direction opposée à la ligne médiane en contexte PH::Cycline A et PON::Cycline A (moyenne $\text{PON::CycA}=32,7^\circ \pm 2,97$, $n=112$, $p_{\text{CTR-PON::CycA}}=0,033$, moyenne $\text{PH::CycA}=35,08^\circ \pm 3,04$, $n=85$, $p_{\text{CTR-PH::CycA}}=0,0027$, **Figure 25E**). Selon l'axe A/B, une perte de l'orientation de la division est observée avec PON::Cycline A avec une augmentation significative des angles de divisions et une moyenne de $18,67^\circ \pm 1,73$, $n=43$, ($p_{\text{CTR-PON::CycA}}=0,0027$) indiquant que la division est plus orthogonale au plan de l'épithélium (courbe marron **Figure 25F**). En revanche, en condition PH::Cycline A, la relocalisation sur tout le cortex de Cycline A n'induit pas de phénotype majeur moyenne $\text{PH::CycA}=12,99^\circ \pm 0,94$, $n=55$, $p_{\text{CTR-PH::CycA}}=0,51$ (courbe verte). Dans toutes les conditions testées, il n'y a pas de corrélation entre les temps de division et les angles de divisions (**Figure 26**). Ceci indique que les effets de Cycline A sur l'orientation de la division de pIIa passe par son recrutement cortical.

L'ensemble de ces données montre que l'orientation des divisions de pIIa se produit comme celle observée lors de la division de pI. Néanmoins, le phénotype observé lors de la perte de fonction de *cycline A* peut correspondre à une addition des effets de pI sur pIIa en plus des effets directs sur pIIa. En effet, la perte de fonction de *cycline A* en contexte transhétérozygote est globale dans tous les tissus et durant tout le développement. Il en est de même pour les phénotypes observés en RNAi, puisque la perte de fonction a été réalisée dès le début et tout au long du lignage (changement de température à 30°C qui provoque la levée de l'inhibition de Gal80 thermosensible sur Gal4 qui contrôle l'expression du RNAi seulement dans les cellules du lignage grâce à un promoteur spécifique et ceci, dès l'entrée de l'animal en stade pupal à 0h APF). Pour avoir les effets seuls de la perte de fonction de *cycline A* sur pIIa, il faudrait donc induire l'expression du RNAi juste après la division de pI à 18h APF et observer ensuite l'orientation des divisions de pIIa.

Ainsi, l'expression de Cycline A corticale ectopique ou sa perte de fonction corticale endogène, encore une fois, influe sur l'orientation du fuseau d'une division asymétrique du lignage, soulignant l'importance de ce pool particulier de Cycline A au cortex.

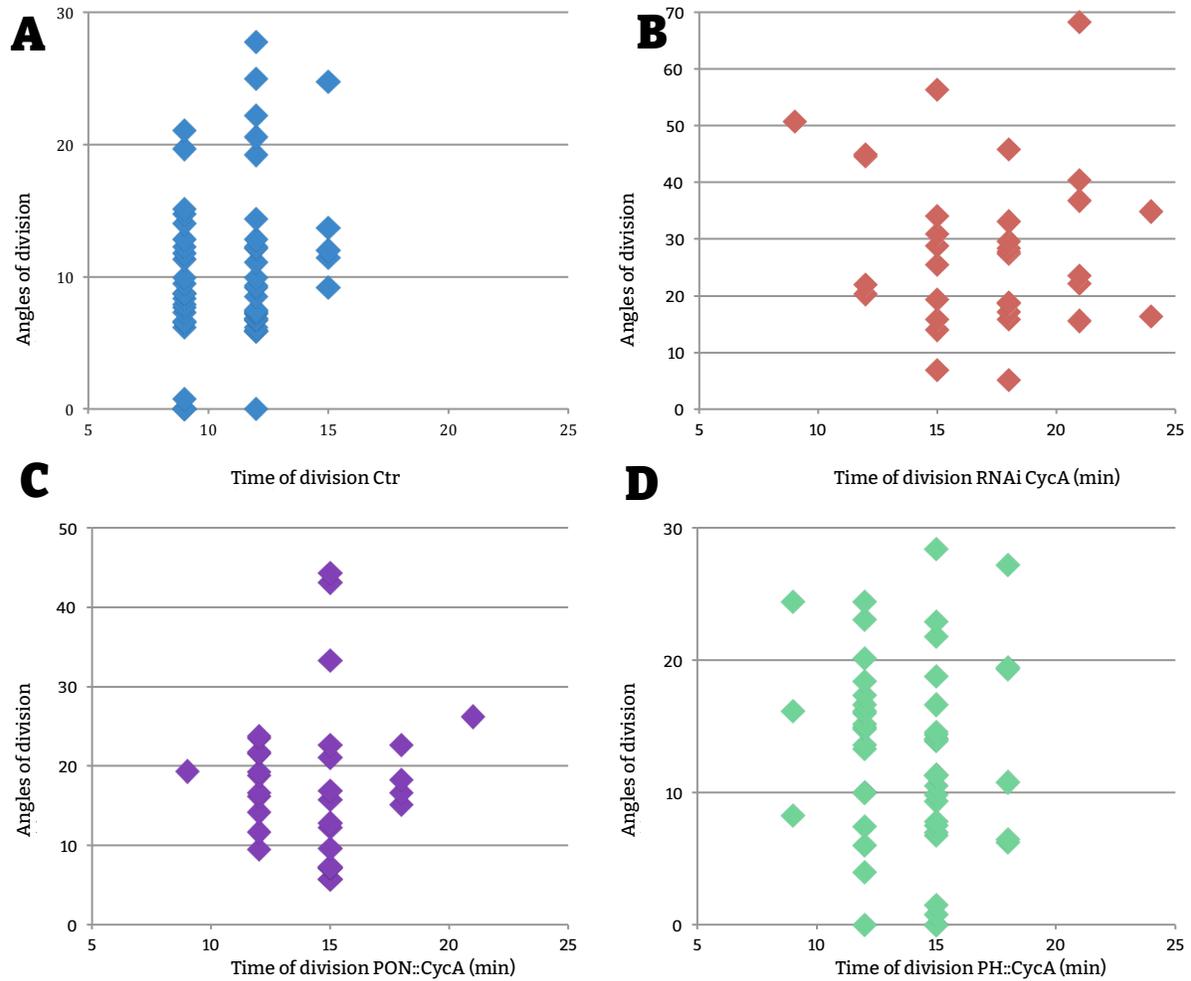


Figure 26: Temps de divisions de pIIa Durée de divisions (min, abscisse) de pIIa en fonction de l'angle de division selon l'axe A/B (°, ordonnée). **A)** Contrôle à 25°C. **B)** RNAi Cycline A à 30°C. **C)** PON::Cycline A à 25°C. **D)** PH::Cycline A à 25°C. La durée de la mitose est défini par le niveau de condensation de l'ADN révélé par l'histone::YFP. Noter que pour chaque durée de mitose la dispersion des angles est similaire pour chaque contexte génétique étudié.

2. Lien entre l'orientation des divisions de pI et pIIa

Afin de rechercher si les désorientations des divisions de pIIa résultent uniquement de la désorientation de pI, j'ai analysé si le lien entre ces deux divisions est conservé. En effet, la division de pIIa est contrainte par celle de pI: la division de pIIa se faisant dans la même orientation que celle de sa cellule mère. Pour ce faire, j'ai analysé la différence entre l'angle de division de pIIa et celle de pI ($\alpha^{pIIa} - \alpha^{pI}$). Ainsi, chez le contrôle, la moyenne de la différence entre l'angle de division de pIIa et de pI selon l'axe A/P est de $-3,07^\circ \pm 1,73$ (n=84, **Figure 27A**) et de $1,03^\circ \pm 1,18$ selon l'axe A/B (n=69, **Figure 27B**), montrant que pIIa se divise selon la même orientation que sa cellule mère. Cependant en perte de fonction de *cycline A* (*cycA^{hari/C8LR1}*), selon l'axe A/P pIIa perd son jumelage avec pI et la différence entre les angles de pIIa et pI est plus grande avec une moyenne $= -34,12^\circ \pm 10,47$ (n=38, $p_{CTR-CycAC8LR1/hari} < 0,0001$). Le lien entre les deux angles est aussi perdu en A/B (moyenne_{CycAC8LR1/hari} $= 17,72^\circ \pm 3,70$, n=23, $p_{CTR-CycAC8LR1/hari} < 0,0001$, **Figure 27 A et B**).

Il a été décrit que l'orientation de la division de pIIb dépend de son ancrage apical via la présence d'un pied de E-Cadhérine, protéine membranaire, au cortex apical antérieur qui conditionne l'orientation orthogonale de sa division (**Figure 28B**). Ce pied de E-Cadhérine est aussi important pour l'orientation de la division de pIIa. En effet, l'expression d'une forme dominante négative de Cadhérine (dont le domaine intracellulaire est remplacé par la GFP, dCpC3-GFP) induit une perte du lien de l'orientation entre la division de pI et de sa cellule fille pIIa (Le Borgne et al, 2002). J'ai donc analysé le comportement de l'E-Cadhérine dans la division de pIIa (**Figure 28A**) en contexte de perte de fonction *cycline A* par RNAi. Dans ce contexte, la formation du pied apical de E-Cadhérine ne semble pas affectée, pour autant, contrairement à ce qui se produit en condition contrôle le pied de E-Cadhérine::GFP n'est pas aligné avec le fuseau mitotique de pIIa (**Figure 28C**). Ainsi, ces données suggèrent que le découplage de l'orientation de pI et de sa cellule fille est indépendant de la E-Cadhérine et ne semble dépendre que de la perte au cortex apical postérieur de Cycline A.

Afin d'analyser si le gain de fonction de Cycline A au cortex influence sur le lien entre pI et pIIa j'ai aussi analysé la différence des angles. Seulement cette analyse n'a pas tiré que des tendances et nous n'avons pas pu mettre en exergue de différence statistique. Selon l'axe A/P, le lien entre pIIa et pI n'est globalement pas perdu en PH::Cycline A et en PON::Cycline A avec respectivement une moyenne de $2,10^\circ \pm 1,69$ (n= 79) et de $2,09^\circ \pm 2,62$ (n= 86) (**Figure 27C**). Cependant l'analyse des courbes montre qu'une proportion des divisions de pIIa ne suit pas celle de pI avec 25% des cas où la différence est supérieure à 10° en PON::Cycline A et de façon surprenante en PH::Cycline A un renforcement du lien semble se produire puisque dans 80% des cas la différence est comprise entre -20° et 10° contre seulement 60% des cas chez le contrôle. Selon l'axe A/B, la perte du lien entre pIIa et pI est observable en contexte PON::Cycline A (moyenne_{PON::CycA} $= 11,6^\circ \pm 2,83$, n=29, $p_{CTR-PON::CycA} = 0,00073$) et aucun effet n'est observé en contexte PH::Cycline A (moyenne_{PH::CycA} $= 0,99^\circ \pm 1,2$, n=50, $p_{CTR-PH::CycA} = 0,83$ **Figure 27D**).

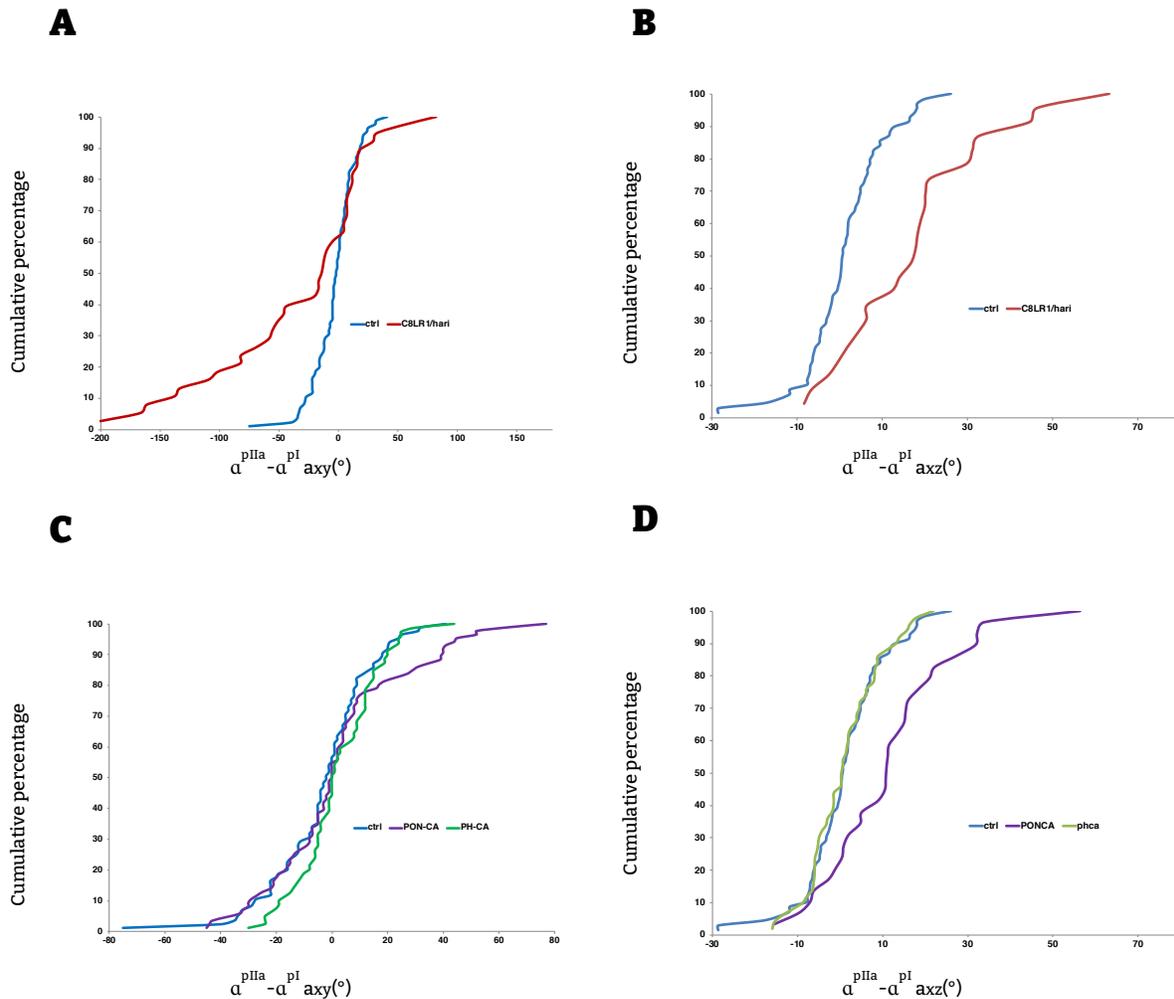


Figure 27: Lien entre les angles de divisions de pI et pIIa Graphes représentant la différences entre l'angles (°) du fuseau mitotique de pIIa moins celui de sa cellule mère ($\alpha_{pIIa} - \alpha_{pI}$) par rapport à l'axe A/P (α_{xy} , **A et C**) et l'axe A/B (α_{xz} **B et D**) en abscisse et le pourcentage cumulatif en ordonné **A et B**) courbe correspondant au contrôle en bleu et au contexte trans hétérozygote *cycline A* en rouge. **C et D**) courbe correspondant au contrôle en bleu, au contexte PON::CycA en violet et PH::CycA en vert. La conservation de l'orientation des divisions entre pI et pIIa est visualisé par le fait que la majorité des différences entre les angles correspondent à zéro.

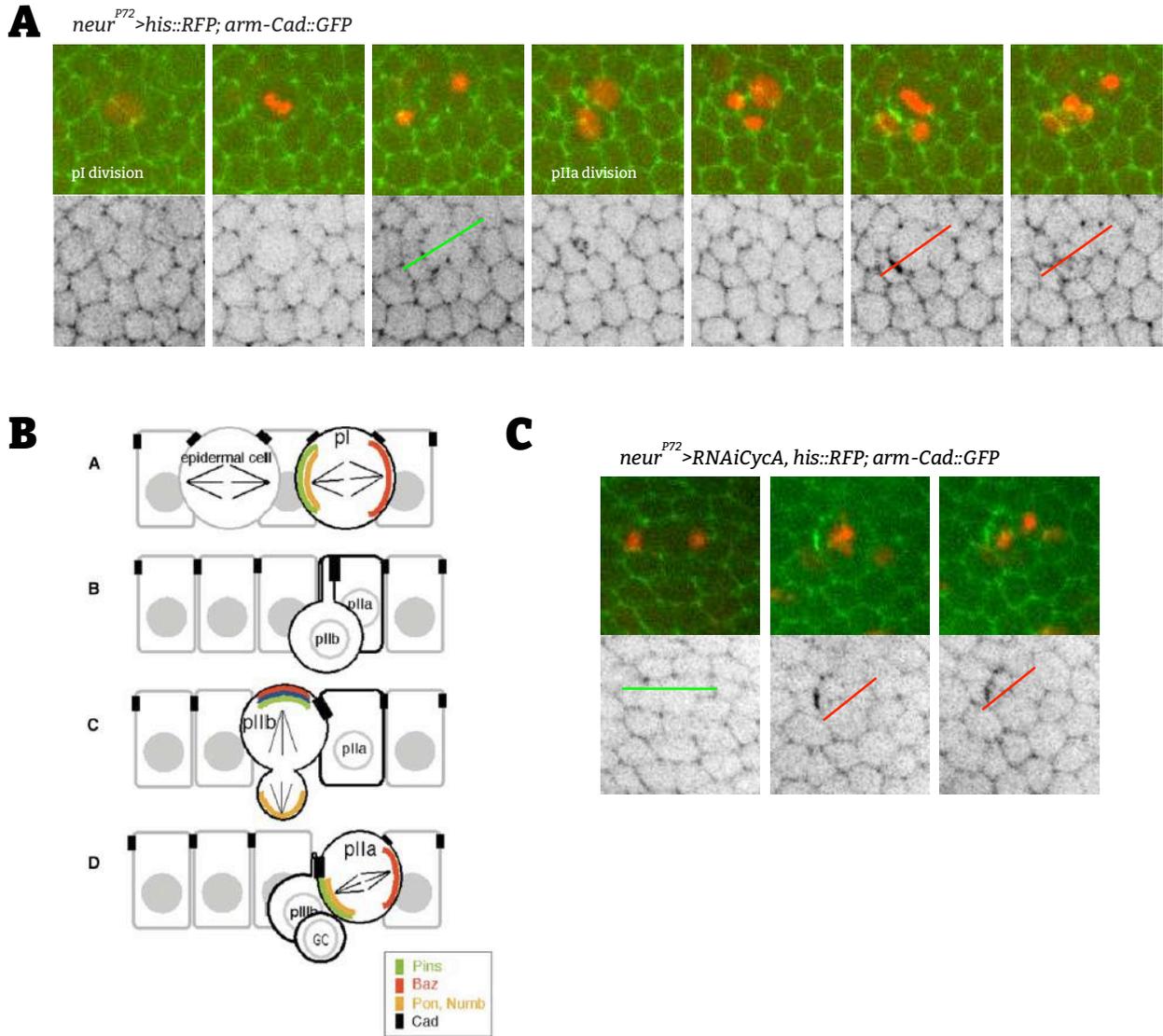


Figure 28: Analyse du pied de Cadhérine dans la division de pI **A et B**) Image d'un film réalisé sur des pupes *E-Cad::GFP; neur^{P72}>His::RFP*. E-Cadhérine (vert) lors de la division de pI et de pIIa visualisé par le comportement de l'ADN (His::RFP, rouge). Haut superposition, bas E-Cad::GFP en couleur inversée. **A**) En contexte contrôlé, l'orientation de la division de pI se fait selon l'axe A/P (les trois premières images, trait vert), pIIa se divise avec la même orientation (les trois dernières images, trait rouge) Une accumulation de E-Cadherine (pied de E-Cad) est observée dans l'axe de la division de pIIa. **B**) Schéma de la division de pI, pIIb et pIIa selon l'axe A/B. pI se divise selon un tilt différent des cellules épithéliales, pIIb grâce au pied de cadhérine (carré noir) oriente sa division orthogonalement alors que pIIa suit la même orientation de pI mais avec le pied de Cadhérine. **C**) Après la division de pI (première image, trait vert), celle de pIIa (deux autres images) ne suit pas la même orientation (trait rouge) et l'axe de division n'est plus aligné avec le pied de E-Cadhérine. Adapté de LeBorgne et al 2010 Adapté de LeBorgne et al 2002

Ces données suggèrent que la perte du lien serait consécutive aux déséquilibres des forces entre le pôle apical-postérieur et basal-extérieur de pIIa induits dans les différents contextes génétiques.

L'ensemble des données montre que l'orientation des deux divisions planaires des précurseurs du lignage dépend de la localisation au cortex apical postérieur de Cycline A, même si des expériences supplémentaires sont requises pour analyser l'impact de la perte de fonction *cycline A* ou de sa localisation ectopique uniquement dans pIIa. De plus, il apparaît que le couplage de l'orientation de la division de pI avec celui de sa cellule fille dépend de cette localisation apicale de Cycline A puisqu'il est perdu quand on déstabilise l'équilibre de force entre le pôle apical et basal en contexte de perte de fonction *cycline A* ou de localisation ectopique de Cycline A au cortex. Les données bibliographiques indiquent que ce lien se fait via la présence de la E-Cadhérine. Néanmoins une forte perte d'activité de celle-ci ne suffit pas à randomiser l'orientation de la division de pIIa (Le Borgne et al, 2002), indiquant qu'il existe un autre signal cortical qui contrôle l'orientation de pIIa en absence de la E-Cadhérine. Etant donné qu'en perte de fonction *cycline A* la E-Cadhérine ne présente pas de modification de sa localisation corticale et que les expériences de PLA entre Cycline A et Cadhérine::GFP ne montrent pas d'interaction entre ces deux protéines (**Figure S4 du papier**), ce signal additionnel pourrait être médié par la localisation corticale de Cycline A. Celle-ci co-localisée avec Frizzled au cortex postérieur-apical de pI et pIIa (**Figure 25A**) servirait de « landmark » pour fixer l'orientation des divisions. Ainsi, la Cycline A corticale permettrait que la cellule mère et fille retiennent la même position au sein de l'épithélium et se divisent selon la même orientation suite au recrutement de Mud. Cependant, il est aussi possible que Cycline A puisse moduler une autre protéine encore non identifiée au cortex apical postérieur qui serait héritée par pIIa pour retenir cette orientation.

Redondance partielle avec Frizzled

Mes données montrent que Cycline A contrôle le maintien des divisions asymétriques planaires des cellules précurseurs dans le plan épithélial comme le complexe Frizzled/Dishevelled. Cependant, la perte de fonction totale de *frizzled* et *dsh* induit une orientation randomisée selon l'axe A/P, ce que nous n'avons pas retrouvé en contexte de perte de fonction *cycline A*. Pourtant, la localisation de Cycline A au cortex est dépendante de Frizzled et Dishevelled puisqu'en perte de fonction de l'un ou de l'autre, il n'y a plus de recrutement cortical de Cycline A. Ainsi, il était attendu que les pertes de fonction *frizzled* et *dsh* induisent le même phénotype que celle de *cycline A*, ce qui n'est pas tout à fait le cas. Ceci peut être expliqué par le fait que nous avons dû travailler dans un contexte hypomorphe pour Cycline A car la perte de fonction totale empêche tout bonnement la division et donc que nos conditions n'étaient pas assez drastiques pour Cycline A. Aussi tant que le domaine de localisation cortical de Cycline A n'est pas caractérisé, il est impossible de se placer dans un contexte de perte de fonction totale de *cycline A* corticale. Pour essayer, de contourner cette difficulté, j'ai comparé des pertes de fonction partielles *frizzled* et *cycline A* et, analysé l'impact de la localisation corticale ectopique au pôle basal antérieur (PON-CA) de Cycline A en contexte hétérozygote mutant *frizzled*.

Comme attendu, le phénotype observé en contexte de perte de fonction partielle *frizzled* est similaire à celui obtenu dans le trans-hétérozygote *cycline A* selon l'axe A/P. Bien que l'on puisse observer une certaine tendance, celle-ci n'est pas statistiquement significative. On observe une déviation similaire des courbes reflétant un biais dans l'orientation des divisions de pI dans une direction opposé à la ligne médiane: le contrôle est de moyenne=25.42°±2.22 (n=91) contre *cycline A*^{C8LR1/hari} moyenne=21.08°±3.36, (n=64) $p_{ctrl/cycAC8LR1/hari} = 0.26$. Et en *frizzled*^{+/-} la moyenne=19,63°±4.4, (n= 62) , $p_{ctrl/FZK21/+} = 0.10$ and $p_{cycAC8LR1/hari/fzK21} = 0.79$ (**Figure 29A**). Aussi, la courbe de la répartition des angles obtenues par la localisation ectopique de Cycline A au cortex antérieur-basal induite en contexte de perte de fonction de *frizzled*, est biphasique avec la partie correspondante aux angles inférieurs à 20° similaire à celle obtenue en contexte PON-CA et la partie correspondant aux angles supérieurs à 20° similaire à celle obtenues en contexte *frizzled* hétérozygote. La perte de fonction *frizzled* sauve uniquement le phénotype PON-CA en diminuant le nombre de cellules se divisant avec des angles supérieurs à 20° ce qui est aussi observé en perte de fonction *cycline A* (**Figure 29C et Figure 5 de l'article**).

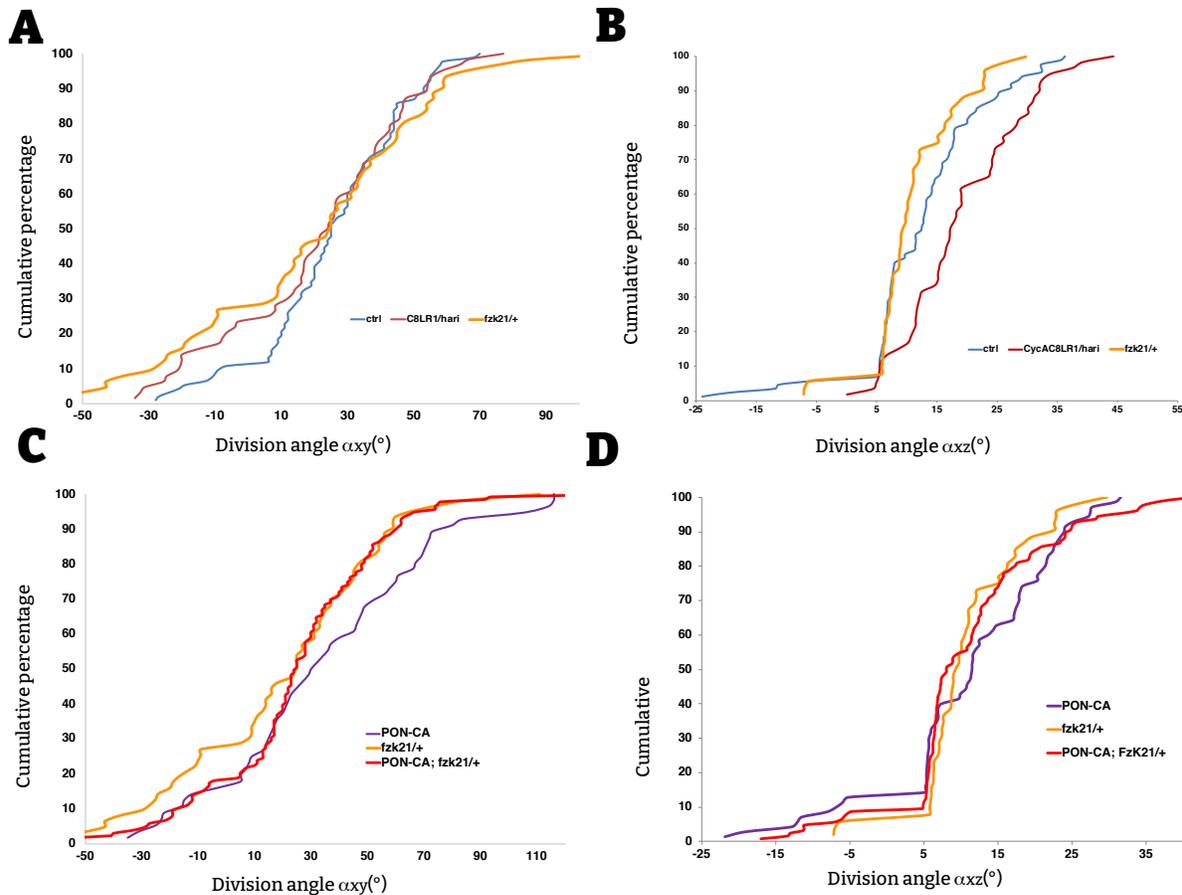


Figure 29: Redondance partielle des phénotypes de *fz* et *cycline A* Graphes représentant les angles de division (abscisse) en pourcentage cumulé (ordonné) des cellules pI par rapport à l'axe A/P (α_{xy} , **A** et **C**) et l'axe A/B (α_{xz} **B** et **D**). Contexte génétique : perte de fonction *cycline A* (*CycA*^{C8LR1/hari}) et *frizzled* (*fz*^{K21/+}) **A** et **B** ; perte de fonction *frizzled* et gain de fonction corticale pour *Cycline A* (Pon::*CycA* et PON::*CycA*, *fzk21/+*, **C** et **D**). La courbe correspondant au contrôle est en bleu, celle du transhétérozygote *CycA*^{C8LR1/hari} en marron, l'hétérozygote *frizzled*^{K21/+} est en jaune, PON::*CycA* en violet et PON::*CycA*, *fzk21* en rouge vif. Films réalisés à 25°C. Remarquez qu'en contexte de perte de fonction *fz* et *cycline A*, l'allure des courbes est similaire selon l'axe A/P et est complètement différente selon l'axe A/B.

Mais, les phénotypes d'orientation de la division de pI sont différents selon l'axe A/B avec une absence de tilt, donc une division parallèle au plan de l'épithélium en perte de fonction partielle *frizzled* contre un redressement de l'orientation de la division en perte de fonction *cycline A* (moyenne_{fz^{K21/+}}=9.78°±1.03, n=50, moyenne_{cycA^{C8LR1/hari}} = 19.04°±1.26, n=60; p_{fzK21+/cycAC8LR1/hari} <0.0001, **Figure 29B**). Aussi, la localisation ectopique de PON::CycA dans un fond hétérozygote *fz^{K21/+}* conduit à une division pI moins inclinée par rapport au plan épithélial ce qui est l'inverse de ce qui est observé après diminution de Cycline A (moyenne_{PON::CycA;fzK21/+} = 18,79 ± 0,87, n=123, **Figure 29D**). Ainsi, la présence de Cycline A du côté basal antérieur renforce le maintien dans le plan de l'épithélium. Ceci indique que malgré le fait que ces deux protéines participent toutes les deux au maintien de l'orientation de la division de pI dans le plan épithélial, elles ne sont que partiellement redondante (voir **Discussion**). Ce que l'on peut conclure c'est que les facteurs de la PCP ainsi que Cycline A participent tous à l'orientation du fuseau mais chacun de manière différentes.

Pour compléter cette étude et vraiment étudier les relations d'épistasie entre *frizzled* et *cycline A*, il faudrait analyser le phénotype d'orientation des divisions dans un contexte de double perte de fonction. Seulement, les deux gènes sont très proches et nos nombreuses tentatives pour obtenir un recombinant entre le mutant *frizzled* et *cycline A* ont été infructueuses. Pour contourner ce problème il est envisagé de construire des lignées de drosophiles qui permettront de combiner une perte de fonction Cycline A par RNAi en contexte *frizzled* mutant hétérozygote ou l'inverse.

Ces données suggèrent que Cycline A et Frizzled agissent dans une même voie pour contrôler l'orientation des divisions selon l'axe A/P.

Recherche de gènes candidats

Nous avons cherché à décortiquer le mode d'action de Cycline A au cortex pour réguler l'orientation de la division asymétrique du précurseur pI. En plus de l'analyse de Mud, qui s'avère être une cible confirmée, j'ai aussi testé si Meru, un nouvel acteur de la PCP décrit dans l'ACD de pI (Banerjee et al, 2017), Canoë qui participe à l'orientation de plusieurs ACD via Dishevelled et Pins (Johnston et al, 2013) ainsi que le cytosquelette d'actine qui participe à l'accrochage du fuseau aux parois de la cellule sont des cibles potentielles de CyclineA.

J'ai mis en évidence que la perte de fonction de *cycline A* impactait sur le recrutement au cortex apical postérieur de Mud (voir **Figure 6 papier**). Mais pour que l'analyse soit complète, j'ai aussi regardé en contexte de perte de fonction *mud*, avec le mutant *mudf0*, si le recrutement au cortex apical postérieur de Cycline A était impactée. L'analyse *in vivo* du comportement de Cycline A::eGFP en contexte mutant *mudf0*, montre que Cycline A est toujours recruté au pôle apical postérieur du précurseur pI (**Figure 30A**). Ceci indique que Cycline A n'est pas recrutée par Mud au cortex apical postérieur et confirme bien que Mud est en aval de Cycline A.

Meru et Canoë sont deux protéines décrites pour réguler l'orientation de la division, la première via son recrutement au cortex par Frizzled au cortex de pI et la deuxième via son interaction par Dishevelled montrée en cellules en culture. J'ai donc fait des expériences d'épistasie, en analysant les orientations des divisions des cellules pI en contexte de perte de fonction simple pour *meru* ou *canoë* et en contexte de double perte de fonction avec *cycline A*. Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de lignées RNAi dont l'expression est dirigée spécifiquement dans les cellules du lignage grâce à la lignée *neur>Gal4, Tub-Gal80^{ts}*.

Sur la **Figure 30B**, la courbe reflétant la répartition des angles de divisions selon l'axe A/P montrent que la perte de fonction *meru* dévie les orientations des divisions vers la ligne médiane donnant des angles plus grands en moyenne comme *cycline A* (moyenne_{ctr-30°}=19,11°±2,38, n=67, moyenne_{meru}=27,91°±3,2, n=61, p_{ctr/meru}=0,0004, moyenne_{CycARNAi}=30,78°± 2,91, n=74, p_{meru/cycA}=0,55). En double perte de fonction, les orientations des divisions ne sont pas plus déviées qu'en simple perte de fonction *meru* ou *cycline A* (moyenne_{merucycA}=21,63°±4,32, n=45, p_{merucycameru}=0,24, p_{cycacycameru}=0,08). Ce phénotype a été obtenu grâce au RNAi et est légèrement différent dans l'amplitude de la courbe que la perte de fonction par le mutant *meru1* dans la publication sur Meru de Banerjee 2017.

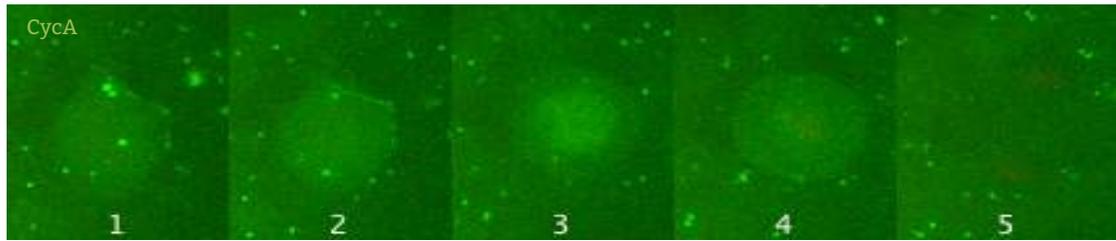
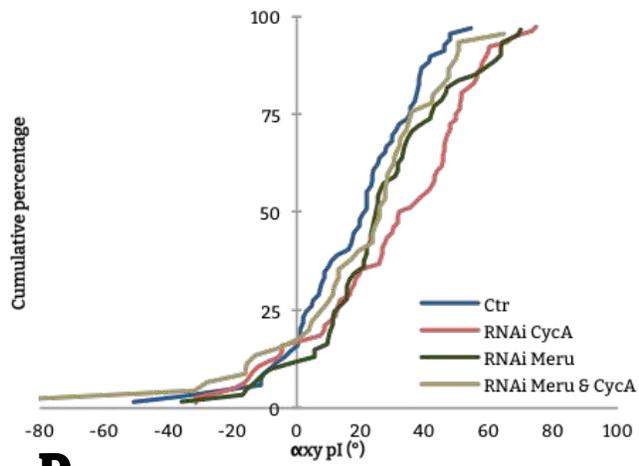
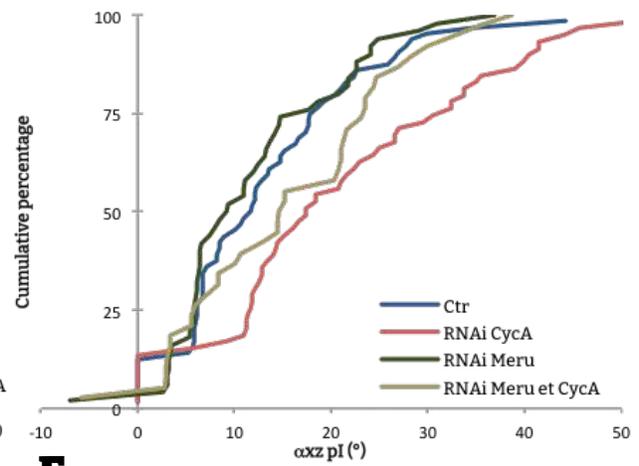
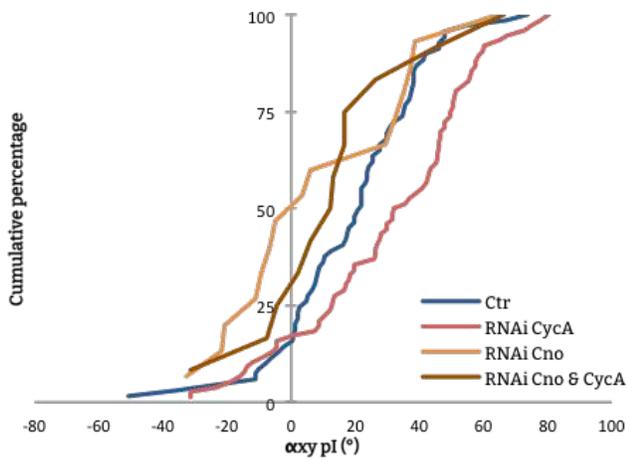
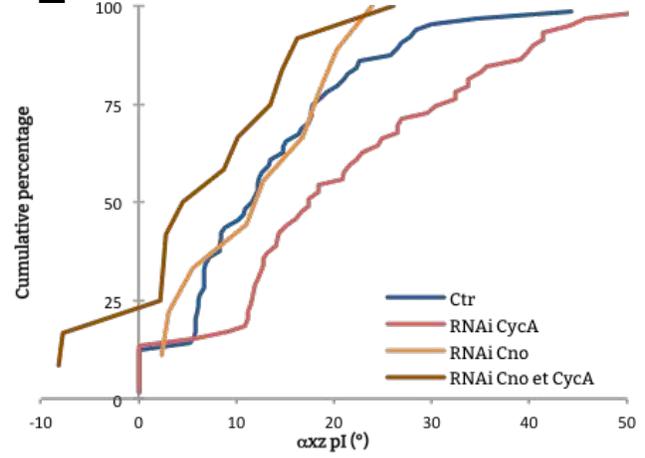
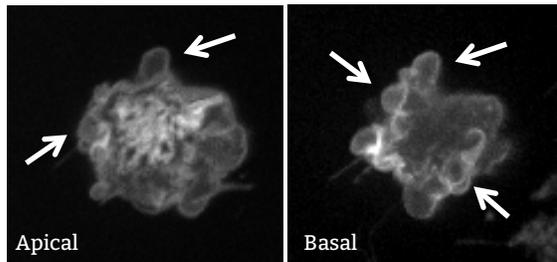
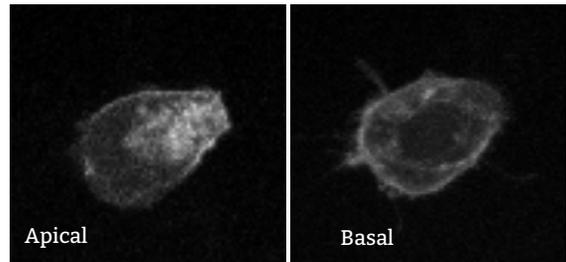
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 30: Recherches de candidats: Mud, Meru et Canoë **A)** Cellule pI en division. Chaque image a été prise toutes les six minutes. Cycline A::eGFP (vert) se localise en prophase (panel 1 et 2) en contexte perte de fonction *mud* (*mud⁰*). Postérieur à droite. **B, C, D et E)** Graphes représentant les angles de division (abscisse) en pourcentage cumulatif (ordonné) des cellules pI en contexte simple perte de fonction *Cycline A* (**B - D**) *meru* (**B et C**) et *canoë* (**D et E**) ou en contexte de double perte de fonction *cycline A*, *meru* (**B et C**) et *Cycline A*, *canoë* (**D et E**). **B et D)** selon l'axe A/P et **C et E)** selon l'axe A/B. La courbe contrôle est représentée en bleu, celle en perte de fonction *Cycline A* en rouge, *meru* en vert foncé, de *canoë* en orange de la double perte de fonction *meru* & *Cycline A* en vert clair, et de *canoë* & *Cycline A* en marron. Toutes les pertes de fonction ont été réalisées par RNAi en utilisant *neur⁷⁷²>UAS-RNAi*; *tub-Gal80^{ts}* sur des pupes transférées à 30° à 3h APF ; les films ont été réalisés à 30°C **F et G)** Dynamique de la membrane plasmique lors de la division des cellules pI Images de film montrant la cellule pI avant sa division (à 3 et 15 min). La membrane plasmique est visualisée grâce au marqueur PH::RFP dans le contrôle (**F**) and en contexte de perte de fonction *Cycline A* (**G**). La flèche en F indique le "blebbing" de la membrane qui n'est pas observé en contexte de perte de fonction *Cycline*.

Dans la publication initiale, il n'y a pas d'analyse des angles selon l'axe A/B pour Meru. Nos analyses ont montré que les orientations des divisions en mutant *meru* sont similaires au contrôle (moyenne_{ctrl} =12,71°±1,02, n=84, moyenne_{meru}=12,59°±8,75 n=50, p_{ctrlmeru}=0,63). Ce qui fait que le RNAi *meru* n'impacte pas l'orientation de la division comme le RNAi *cycline A* (p_{cycA/meru}=0,55). En double perte de fonction *meru* et *cycline A*, il y a une différence où les divisions sont moins redressées qu'en simple perte de fonction *cycline A* (moyenne_{CycA^{RNAi}}=20.61°±1.8, n=59, moyenne_{merucycA}=12.58°±10.61 n=38, p_{cycameru/meru}=0,11 , **Figure 30C**). Malgré le fait qu'ils le décrivent pour lier polarité apicale et planaire, la perte de fonction *meru* n'impacte que les orientations de la division selon le plan épithélial. La perte de fonction *meru* ne permet pas de sauver le phénotype *cycline A* selon l'axe A/B et ne permet pas de réaligner l'orientation des divisions selon l'axe A/P non plus quand combinée à celle de Cycline A. Nos données préliminaires montrent qu'il n'y a pas d'interactions génétiques entre ces deux protéines.

L'orientation des divisions des pI selon l'axe A/P reste très parallèles à la ligne médiane en perte de fonction *canoë* simple (moyenne_{ctr-30°}=19,11°±2.38, n=67, moyenne_{cno}=9.03°±7,29, n=15, p_{ctr/cno}=0,15, **Figure 30D**). Ce phénotype est à l'opposé de celui observé en perte de fonction *cycline A* où les divisions dévient fortement vers la ligne médiane (plus grande proportion d'angles positifs). En contexte de double perte de fonction *canoë* et *cycline A* par contre, nous pouvons observer que les divisions tendent à rester parallèles à la ligne médiane ce qui atténue les effets de la perte de fonction *cycline A* (moyenne_{CycARNAi}= 30.78°±2.91, n=74, moyenne_{cnocycA}=13.35°±7,26, n=12, p_{cycA/cnoCycA}=0,045).

Selon l'axe A/B, la perte de fonction de *canoë* n'induit pas de phénotype sur l'orientation des divisions, puisque la courbe est similaire à celle obtenues en contexte contrôle (moyenne_{cno}=12.35°±7.44, n=9, p_{ctr/cno}=0,83). Par contre, il est intéressant de voir que la double perte de fonction *cycline A* et *canoë* sauve le phénotype Cycline A voire même conduit à un aplatissement plus drastique de la division qu'en situation contrôle. Ce phénotype rappelle le phénotype *frizzled* mais surtout est encore une fois à l'opposé du phénotype induit par la perte de fonction *cycline A* (moyenne_{cnoCycA}=7.50°±2,85, n=12, moyenne_{CycA^{RNAi}}=20.61°±1.8, n=59, p_{cycA/cnocycA}=0,03, **Figure 30E**). Nos données nous montrent qu'il y a une possible interaction entre *Canoë* et *Cycline A* dans le contrôle de l'orientation de division de la cellule pI selon les deux axes de polarités.

Ces données, encore préliminaires, sont très intéressantes pour la suite. En effet, le rôle de Cycline A sur l'orientation du fuseau pourrait donc passer par *Canoë* plus que par *Meru*. Il est intéressant de noter que *Canoë* intervient aussi dans les mécanismes d'ancrage du fuseau mitotique en le reliant au cytosquelette d'actine. L'actine corticale permet l'ancrage des microtubules aux parois de la cellule et il a, en plus, été montré que la protéine Actin Capping ZB, connue pour être impliquée dans le contrôle de la polymérisation de l'actine, participent aussi à l'orientation du fuseau (Di Pietro 2014). Ainsi, une régulation du cytosquelette d'actine par la Cycline A pourrait aussi expliquer les phénotypes observés. Ceci d'autant plus, qu'une étude préliminaire faite au laboratoire

montre que la forme des cellules pI est affectée en contexte mutant *cycline A*. En effet, grâce à une lignée exprimant spécifiquement dans les cellules précurseurs une forme membranaire de la RFP (PH::RFP), nous avons observé que la perte de fonction Cycline A entraîne une rigidification de la membrane plasmique (**Figure 30F**). Dans les cellules contrôle, la division cellulaire est précédée par une fluidification de la membrane qui se traduit par l'apparition de protrusions en forme de blebs localisées principalement du côté basal. Ces protrusions sont quasi-inexistantes dans les cellules en contexte de perte de fonction *cycline A* et la cellule acquiert une forme plus régulière en accord avec une rigidification de sa membrane plasmique (**Figure 30G**). Cette étude doit être poursuivie en faisant une analyse morphométrique plus rigoureuse et surtout en analysant directement le réseau cortical d'actine grâce à des rapporteurs fluorescents (Actin-life, myosin,...).

L'ensemble de mes données montre que le contrôle de l'orientation du fuseau lors de la division des précurseurs pI pourrait ne pas être aussi simple qu'un rôle direct de Cycline A sur Mud. En effet, au regard des résultats obtenus, ce contrôle pourrait passer par l'intermédiaire de la régulation de Canoë et/ou du cytosquelette d'actine cortical qui à leur tour contrôleraient le recrutement de Mud au cortex. Afin de répondre à cette question on pourrait envisager d'analyser directement le cytosquelette grâce des lignées exprimant des formes taguées de l'actine ou les interactions entre Cycline A et les acteurs du cytosquelette d'actine comme Rho A ou la Myosine.

Cycline A2 au cortex des cellules vertébrés

Nos données ont été obtenues sur des cellules de *Drosophila melanogaster* qui se divisent au sein d'un épithélium et dont les divisions se font selon le plan de l'épithélium. J'ai ensuite cherché à extrapoler nos données chez les vertébrés sur un modèle cellulaire où les divisions se font aussi dans le plan de l'épithélium.

1. Cellules Caco-2

Nous avons pris comme modèle des cellules intestinales de la lignée Caco-2. En effet, dans l'épithélium intestinal, la régulation de l'orientation des divisions est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organe. Ces cellules dérivent d'un adénocarcinome qui est un type de cancer gastrique et surtout, sont cultivables sur filtre et possèdent la capacité de former spontanément un épithélium avec une polarité apico-basale en culture au cours de leurs divisions.

En collaboration avec Sophie Tenet et Dorianne Aguanno de l'Institut St Antoine à Paris, nous avons réalisé des immunomarquages sur les cellules Caco-2 à différents temps. Il faut environ 15 jours pour que la couche épithéliale se forme, nous avons d'abord regardé le pourcentage mitotique à plusieurs temps (J+3, J+7, J+11) ainsi que la hauteur de la couche épithéliale qui reflète l'avancement de la formation de l'épithélium en culture. Nous avons choisi le stade J+7 après ensemencement avec des cellules hautes de 10um ce qui correspond à un stade où 25% de cellules sont en division ce qui permet de pouvoir analyser le comportement de Cycline A2. Pour cette expérience nous avons utilisé des anticorps anti-PH3 en tant que marqueur de la mitose et l'Ezrine ou la phalloïdine en tant que marqueur de la polarité A/B.

Nos expériences ont été réalisées avec un anticorps anti-Cycline A2 puisque celle-ci est l'homologue le plus proche de la Cycline A de la drosophile (voir **Figure 4** de l'introduction). Ces expériences nous ont permis de voir des marquages de Cycline A2 dans le cytoplasme, le noyau mais aussi au cortex des cellules. Ce marquage cortical n'est pas très uniforme au pôle basal (**Figure 31A**) mais devient distinct et uniforme au cortex pôle apical (**Figure 31B**). Cette Cycline A2 corticale est observée au moment où la Cycline A2 se localise aussi dans le noyau mais seulement dans les cellules où le signal est le plus fort, sous entendant quand Cycline A2 atteint son pic de quantité en prophase. Au moment où l'ADN se condense, il n'y a presque plus de signal de Cycline A2 dans toute la cellule (prométaphase).

Nos données ont montré que la Cycline A2 se localise au cortex dès la formation de l'épithélium (J+3) jusqu'à la fin de l'épithélialisation (J+11). Nous pouvons imaginer un possible rôle pour Cycline A2 avec cette localisation au cortex dans l'orientation de ces divisions. Il faudrait à ce niveau, préciser cette localisation corticale de Cycline A2 en utilisant des marqueurs permettant de définir précisément les jonctions cellulaires ainsi que le pôle apical des cellules (comme l'Ezrine). Il nous faudrait aussi définir plus précisément le stade des cellules où cette Cycline A2 corticale se trouve.

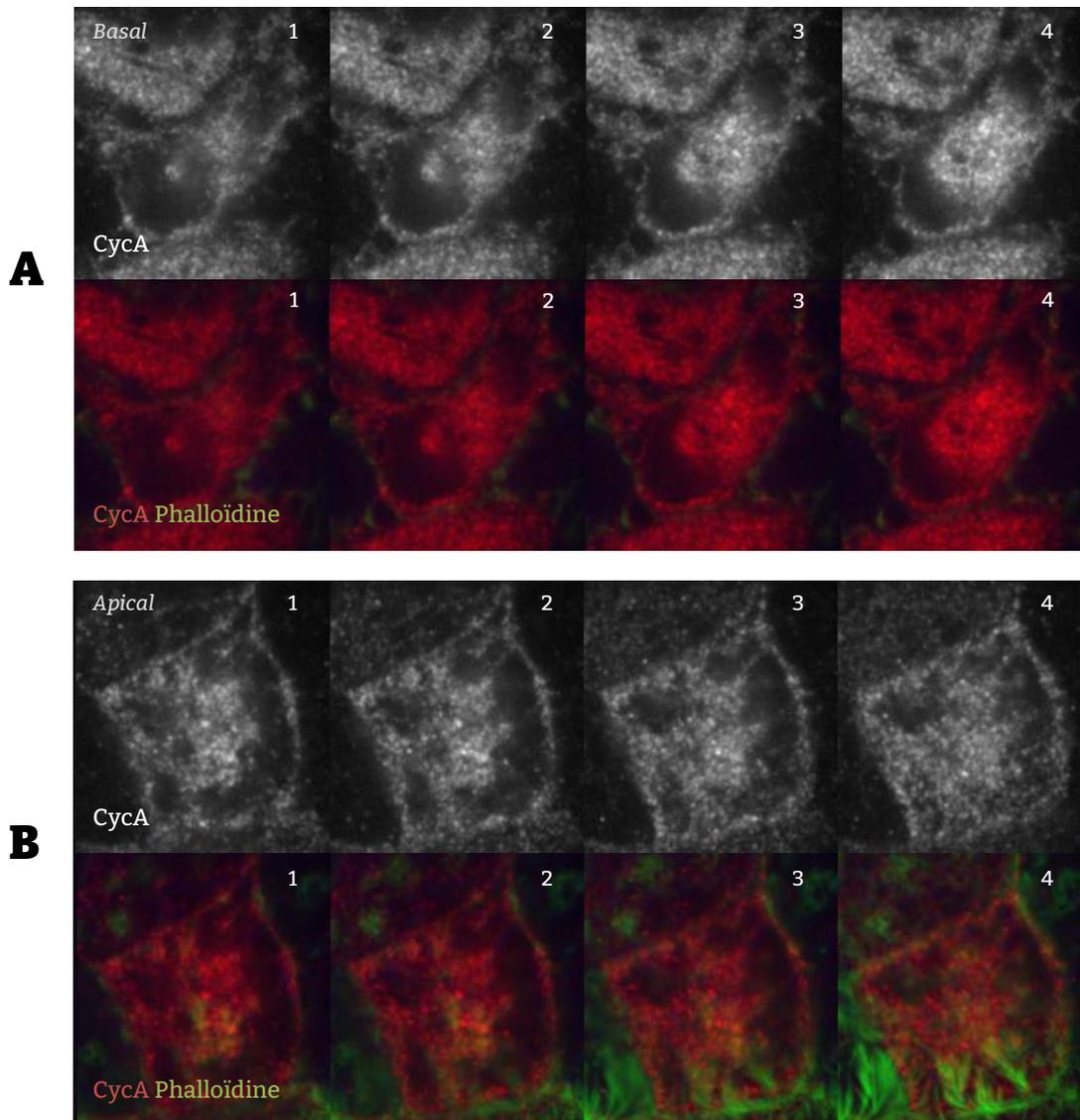


Figure 31: *Cycline A2 au cortex des cellules mammifères* Coupes optiques de cellules Caco 2 après 7 jours de culture, marquées pour Cycline A2 (rouge), Phalloïdine/actine (vert). **A)** Coupes de 1 μ m correspondant à la région basale des cellules. Cycline A2 se localise au cortex basal des cellules **B)** Coupes optiques de la région apicale de la même cellule (1mm). La région apicale est définie grâce au marquage de l'actine (vert) qui permet de visualiser les microvillosités. La Cycline A2 est localisée au cortex apical. Le marquage cortical semble être uniforme sur toute la cellule. Sur les 3 et 4èmes images en **A** et en **B** l'accumulation nucléaire de *Cycline A* indique que la cellule est en prophase.

Cependant, comme nos données chez la drosophile indiquent que la localisation corticale de Cycline A est dépendante de la PCP, nous avons cherché à voir si celle-ci était effective lors de la formation de cet épithélium en culture. Nous avons donc testé plusieurs anticorps dirigés contre les formes mammifères de la protéine de la PCP, Dishevelled. Malheureusement, nos outils ne nous ont pas permis d'avoir une vision précise du comportement de Dishevelled dans ces cellules. Quelques patches de cellules présentaient une polarité canonique de Dishevelled, mais ce sont des observations très locales et la visualisation était difficile faute d'outils adaptés (nos conditions pour ces anticorps n'étaient pas optimales). A la vue de ce résultat, il est donc impossible de dire si la Cycline A2 de mammifère peut se localiser asymétriquement au cortex des cellules. Comme il ne semble pas exister de système cellulaire de vertébré dans lequel la PCP est active, il faudrait faire des marquages sur des cellules dans lesquelles la transfection de constructions permettant l'expression de protéine de la PCP pour induire leur polarité.

2. Zebrafish

Nous nous sommes ensuite tournées vers un autre modèle vertébré afin d'étudier les divisions des cellules du plancher du poisson zèbre en collaboration avec Christine Vesque de l'IBPS. Ces divisions sont dépendantes de la PCP mais symétriques. Dans un premier temps nous avons réalisé des marquages croisés pour voir s'il est possible de détecter la Cycline A du poisson zèbre avec des anticorps reconnaissant spécifiquement la Cycline A de drosophile et la Cycline A2 humaine. Malheureusement aucun marquage de Cycline A (deux anticorps testés) n'a permis de détecter la Cycline A du poisson zèbre. Etant donné qu'il n'existe pas d'anticorps anti Cycline A spécifique du zebrafish, il faut donc procéder de façons différentes, en injectant une construction codant pour une protéine chimère Cycline A::GFP.

Discussion & Perspectives

Discussion & Perspectives

Toutes les bonnes choses ont une fin et ce manuscrit en fait partie. Durant ces longues pages et ces schémas, je vous ai parlé de deux processus essentiels pour le développement qui sont la prolifération et la polarité cellulaire ainsi que des passerelles qui les relient au sein des ACD. Mais ce qu'il faut retenir de ce travail c'est qu'il y a encore beaucoup à faire en général en science et, à commencer sur ce sujet.

0. Résumé des recherches acquises

Nous avons décrit ce nouveau rôle de Cycline A dans le maintien de l'orientation stéréotypée des ACD dans le lignage des soies mécanosensorielles de *Drosophila melanogaster*. Ce rôle de Cycline A se traduit par une localisation particulière de Cycline A au cortex de la cellule, corticale et asymétrique dans la cellule précurseur pI. Mais cette localisation corticale de Cycline A ne se trouve que dans les ACD planaires du lignage des soies mécanosensorielles. Et nous avons pu mettre en avant qu'elle coïncidait avec celles des acteurs de la Polarité Cellulaire Planaire, Frizzled et Dishevelled. Ses trois protéines sont susceptibles d'interagir ensemble, ce que nous avons démontré par plusieurs techniques: des expériences d'immunofluorescences ont montré qu'elles étaient très proches (STED et PLA). Puis des expériences de délocalisation de Frizzled montrent qu'il entraîne Cycline A et Dsh ce qui nous indique, combinées à des Co-IP, que Cycline A fait bien partie du complexe de la PCP en apical postérieur des pI. Nos expériences ont en plus révélé que comme ces facteurs de la PCP, Cycline A jouait un rôle dans l'orientation des divisions dans les deux axes de polarités A/B et A/P. Sa perte de fonction entraîne une déviation de l'orientation des divisions par rapport à son axe stéréotypé. De plus, une localisation ectopique au cortex de Cycline A réoriente non seulement une division présentant déjà de la Cycline A au cortex mais aussi la division d'une cellule qui n'en présentait pas. Ces phénotypes peuvent s'expliquer par un effet de Cycline A sur le recrutement d'une protéine impliquée dans l'ancrage cortical du fuseau mitotique et/ou dans les mécanismes qui modulent la tension exercée au niveau du fuseau. J'ai identifié une protéine dont sa localisation au cortex apical postérieur est affectée en perte de fonction *cycline A*: il s'agit de la protéine Mud (NuMA/LIN-5). Cette absence de recrutement de la protéine Mud au cortex est aussi observée en perte de fonction *dsh* ce qui renforce l'idée que Cycline A fait partie du complexe de la PCP qui recrute et oriente le fuseau au cortex apical postérieur. C'est un nouveau rôle pour Cycline A mais néanmoins des zones d'ombres subsistent encore.

Les grandes questions qui émergent de ce travail sont:

- Comment expliquer que Cycline A ne se localise qu'au cortex d'ACD et pas des cellules épithéliales qui les entourent, les deux se divisant dans le plan de l'épithélium? Aussi qu'elle ne soit localisée corticalement que dans les ACD planaires du lignage et non pas lors des ACD orthogonales au plan épithélial?

- Quel est son rôle dans le complexe apical sur l'orientation des divisions ?
- Quel est le domaine protéique qui permet de recruter Cycline A au cortex?
- Quid de ses partenaires de cycle, CDK1 et CDK2? Sont-ils impliqués dans ce processus ?
- Existe-t-il d'autres partenaires encore non identifiés qui lui permettent de réguler l'orientation du fuseau?
- Quel modèle pouvons-nous tirer de nos données?
- La robustesse de l'ACD peut-elle être mise à mal par la Cycline A corticale?
- Est-ce que Cycline A se localise au cortex d'autres systèmes? Et est elle le seul acteur du cycle à avoir un rôle dans la polarité?

1. Différence entre les cellules du lignage et les cellules épithéliales

Le rôle de Cycline A dans le contrôle de l'orientation des divisions dépend de sa localisation au cortex. Cycline A a déjà été montrée pour avoir des localisations intracellulaires particulières : dans les cellules souches germinales mâles au spectrosome de façon dépendante de PAR-1 et dans les cellules HeLa aux centrosomes (Yamashita et al 2011, Boer et al 2008). Mais cette localisation corticale ainsi que son interaction avec les facteurs de la PCP sont nouvelles. D'ailleurs cela est observé seulement dans les cellules précurseurs du lignage alors que les cellules épithéliales soumises elles aussi à la PCP ne présentent pas de Cycline A corticale. Comme discuté dans l'article, les cellules épithéliales se divisent dans la plan épithélial grâce aux jonctions tricellulaires. Les cellules du lignage elles, se soustraient de cette contrainte grâce à la voie Frizzled pour pouvoir s'organiser entre elles en 3D. Comme la perte de *cycline A* induit un redressement de cette division, elle permet donc de moduler l'action de Frizzled sur ce redressement. Ainsi, les cellules filles de pI se disposent selon le plan A/B en gardant un pied apical et peuvent s'organiser en 3D pour former l'organe final.

Ainsi, la présence d'une Cycline A corticale au pôle apical postérieur uniquement lors des divisions planaire (pI et pIIa), permettrait de moduler le signal de polarité planaire donné par Frizzled et Dishevelled et de maintenir les précurseurs des cellules externes de l'organe au niveau de la cuticule. Les cellules pIIb et pIIIb qui ne présentent pas de Cycline A corticale, donnent les futures cellules internes de l'organe qui vont perdre leur attache apicale, le neurone projetant sa dendrite jusqu'au ganglion thoracique en ventral de l'animal. L'absence de Cycline A corticale dans ces cellules-là pourrait se justifier par leur orientation. D'ailleurs, au pôle apical des cellules pIIb, se trouve spécifiquement la protéine Inscuteable, partenaire de Pins et Bazooka dans les neuroblastes, qui régule l'orientation de la division en plus de l'E-Cadhérine (Rogiers et al, 2001 et Fichelson et al, 2001). Elle permet un point d'ancrage à la cuticule et oriente le fuseau mitotique de pIIb orthogonalement au plan épithélial. Si Cycline A ne se localise pas au cortex apical de ces cellules, nous proposons que cela pourrait être en partie dû à Inscuteable qui fait que les pIIb se divisent à l'instar des neuroblastes. Des expériences d'épistasie entre *insc* et *cycline A* en pIIb permettront de tester cette possibilité.

2. Ressemblances et dissonances entre Cycline A et les facteurs PCP/Pins

Dans la division planaire de pI, deux forces opposées orientent le fuseau. Au pôle apical, Frizzled, Dishevelled, et maintenant Cycline A, recrutent Mud ainsi que la machinerie nécessaire pour orienter et générer la tension sur le fuseau. Au pôle basal, Pins, Gai et Dlg recrute Mud et la même machinerie le reliant au fuseau. La perte de fonction des facteurs de la PCP induit des changements d'orientation différents selon les axes comme expliqués dans l'introduction (**Figure 18**). Dans les résultats supplémentaires, j'ai évoqué la partielle redondance de phénotypes entre les pertes de fonction *frizzled* et *cycline A* (**Figure 29**). Où selon l'axe A/P, il y a une randomisation dans les deux cas, alors qu'en A/B les effets observés sont opposés avec une division de pI encore plus parallèle au plan de l'épithélium en perte de fonction *frizzled*^{+/-} et une division plus orthogonale à l'épithélium avec un tilt plus important en perte de fonction *cycline A*. Pour étudier le lien entre les facteurs de la PCP et Cycline A, une expérience possible est l'analyse de double mutant mais comme expliqué avant, à cause de la proximité des gènes, il est difficile de générer une lignée recombinée. Nous sommes en train de construire des lignées exprimant un RNAi contre Cycline A combinée à une mutation de *frizzled* ou *dsh*. Cette lignée nous permettra de calculer les angles de division de pI en double perte de fonction *cycline A* et *frizzled*. Si le phénotype observé ressemble à celui de *cycline A* cela suggérerait que l'orientation du fuseau par une voie parallèle à celle de Cycline A. Si le phénotype ressemble plus à *frizzled* nous pourrions suggérer que l'orientation du fuseau en pI passe exclusivement par Cycline A.

En fonction des données obtenues, pour vérifier que l'orientation du fuseau ne passerait que par l'action de Cycline A via le recrutement de Mud et que les facteurs de la PCP ne seraient requis que pour localiser Cycline A, nous pouvons proposer une expérience de sauvetage afin d'étudier si la localisation apicale de Mud pourrait sauver le phénotype de perte de fonction de *cycline A*. L'utilisation de nanobodies couplés à un domaine de localisation apicale (au hasard celui de Bazooka/PAR-3), dirigé contre la GFP, pourrait permettre de localiser une forme taguée de Mud à la GFP au cortex apical en contexte de perte de fonction partielle *cycline A*. La mesure des angles de divisions de pI dans ce contexte nous indiquerait si le Mud apical serait capable de sauver le phénotype *cycline A*. Si cette expérience est bien possible dans un contexte de perte de fonction *cycline A*, cette expérience n'est pas vraiment envisageable en contexte perte de fonction pour la PCP car en contexte mutant *frizzled*, Bazooka est relocalisé uniformément au cortex (Bellaïche et al, 2001b) et en contexte mutant *dsh1*, c'est Frizzled (qui recrute Bazooka) qui est uniformément réparti à la membrane et donc entraînerait probablement Bazooka.

Ainsi, nos données montrent que les facteurs de la PCP et Cycline A sont tous impliqués dans le contrôle de l'orientation des divisions. Pour autant, la variabilité des phénotypes obtenus montre que ce processus est complexe et suggère qu'il n'engage pas toujours les mêmes partenaires en fonction des axes de polarité. Ainsi, ce qui est le plus surprenant, c'est qu'en perte de fonction *cycline A*, le phénotype d'orientation des divisions selon l'axe A/B ressemble particulièrement à celui de la perte de fonction *pins* et non à

celui de *frizzled*. Cette donnée suggère que Cycline A réprime la voie PCP en atténuant la force du côté apical postérieur. En effet, en perte de fonction *cycline A*, la force apicale est renforcée (induisant une augmentation du tilt), comme ce qui est observé en absence de la contrepartie basale en contexte mutant *pins*. Pour orienter le fuseau, il a été proposé dans Ségalen et al 2010, que la force basale est juste un point d'ancrage du fuseau avec peu de tension alors que la force apicale génère la tension nécessaire à l'orientation du fuseau mitotique. Pour autant, les deux pôles recrutent la protéine Mud, via Pins du côté basal et via Cycline A du côté apical. Cependant, l'analyse des phénotypes de la perte de fonction *mud* et *dsh* dans les divisions de pI montre qu'ils sont similaires avec une amplitude des courbes pas très différente (**Figure 18 B**, extraits de Ségalen et al 2010). Pourtant, *dsh1* entraîne uniquement une absence de localisation de Mud au pôle apical postérieur (par celle de Cycline A) alors que celle de *mud* impacte les deux pools corticaux de Mud. Ceci indique que si la perte de la localisation basale et apicale de Mud a le même effet que la perte du pool l'apical seul, la contribution basale de Mud serait accessoire. Ainsi, il était suggéré dans le papier la contribution de Pins et Mud au pôle basal ne se révèle que si il y a altération de la voie PCP, pour permettre d'éviter une trop forte randomisation de l'orientation des divisions. D'ailleurs pour renforcer cette idée, en contexte mutant *dsh1*, le croissant de Pins & Mud est plus étalé ce qui suggère la possibilité d'avoir une région contenant la protéine Mud plus étendue ce qui permettrait de renforcer le maintien de la division dans le plan de l'épithélium (Ségalen et al, 2010).

Qu'en est-il de l'implication de Cycline A dans cette histoire? Comme énoncé avant, Cycline A régule la force générée au pôle apical du fuseau. Pour autant sa perte de fonction induit une augmentation du tilt et donc un accroissement de la force apicale. Ainsi, un modèle possible est que Cycline A recruterait Mud mais en le maintenant sous une forme moins active ce qui atténuerait la force générée au pôle apical postérieur du fuseau. Une fois la Cycline A dégradée en métaphase, cette répression serait levée, et Mud activé pourrait s'associer à Dynéine pour tirer sur le fuseau et séparer les lots de chromosomes. Ceci semble difficile à réconcilier avec l'absence de localisation apicale de Mud observée en perte de fonction *cycline A*. Une explication possible serait que la force exercée dans ce contexte reflèterait uniquement la contribution basale de Mud. Notre modèle propose que Cycline A inhibe Mud. Néanmoins, la localisation ectopique de Cycline A au pôle basal devrait induire le même phénotype que celui observé en perte de fonction *pins* (**Figure 5 du papier**), ce qui n'est pas le cas. Une explication qui peut réconcilier le modèle aux données est que comme la fonction de Mud à ce pôle ne serait que d'ancrer le fuseau sans exercer de force, la présence de Cycline A ne peut l'imputer. Si ce modèle est exact, comme la force la plus dominante est celle générée par le pôle apical, alors en double mutant *pins* et *cycline A* un redressement très orthogonal de la division est attendu.

Comment expliquer que Mud ait d'un côté une fonction d'ancrage et de l'autre en plus une force de tension. Une hypothèse serait que Mud localisé au pôle basal ne serait pas couplé à son partenaire et moteur moléculaire, la Dynéine. Et dans ce cas qu'en est-il au pôle apical quel est la nature de la relation entre Mud et Cycline A : une rétention? Une

inhibition? Quid du recrutement de la Dynéine ou de son activité? Pour répondre à ces questions, il faudrait analyser la localisation de la Dynéine dans les cellules pI pour confirmer notre hypothèse de son absence au pôle basal en contexte sauvage et aussi observer sa localisation en absence de Cycline A au pôle apical. Il faudrait aussi analyser le recrutement du fuseau aux pôles de la cellule en situation contrôle pour voir s'il y a une asymétrie comme suggéré dans Rogiers et al 2001, et observer si la perte de fonction *cycline A* impacte aussi cette asymétrie de fuseau

Pour conclure, les facteurs canoniques de la PCP régulent l'orientation générale de la cellule et du tissu. Alors que la Cycline A qui n'est exprimée que transitoirement au cortex n'aurait un effet que sur la tension du fuseau au moment de la métaphase.

3. Par quel bout faut il la prendre?

Maintenant faudrait il se demander si un domaine de localisation particulier existe dans Cycline A et dans les facteurs de PCP pour permettre le recrutement de cycline A au cortex apical.

Du côté de Cycline A, plusieurs pistes s'ouvrent à nous pour l'identifier. La première serait d'étudier le domaine de localisation aux centrosomes de Cycline A caractérisé dans les cellules S3 de xénope. L'étude révèle que le premier 1er domaine CBD de Cycline A (acides aminés 201 à 301) permet la localisation aux centrosomes (Pascreau et al, 2001). Une seconde, serait l'analyse de localisation intracellulaire de la Cycline A délétée de son domaine de localisation au spectrosome identifié par Yamashita (2012). Seulement dans nos études préliminaires au laboratoire, une telle construction n'a pas pu être détectée dans nos cellules. Ainsi la délétion (codon stop introduit à la M⁴⁸⁸ et E⁴⁸⁹, délétion de 44aa) doit démasquer un domaine qui serait impliqué dans la dégradation de la protéine. De plus, la délétion d'un ou des deux CBD est peu envisageable à cause d'un risque évident d'arrêt de cycle cellulaire. Si le domaine de localisation se trouve dans ces régions, la construction d'une Cycline A sans ce domaine serait problématique : l'analyse de cette Cycline A même en contexte transhétérozygote pour *cycline A* sera toujours sous le doute que le reste de la Cycline A endogène soit suffisant pour remplir les fonctions de Cycline A. Il faudrait alors construire des formes chimères contenant des portions de Cycline A::eGFP par la technique CRISPR (ou par fragments tagués) et observer *in vivo* leur localisation intracellulaire et leur capacité à se localiser au cortex en espérant qu'elle puisse agir au cortex. Une fois le domaine le plus restreint identifié pour analyser l'impact de Cycline A dépourvue de ce domaine, il faudrait générer une Cycline A::eGFP délétée de ce domaine et analyser l'orientation des divisions. L'analyse de la localisation intracellulaire des formes chimériques de Cycline A pourrait se faire dans les cellules pI ou dans des expériences de Cell Polarity Assay (CPA) avec des cellules S2 (Segalen et al, 2010).

La technique du CPA peut être aussi envisagée pour chercher les sites de liaison des facteurs de la PCP à Cycline A. Plusieurs constructions existent d'ailleurs permettant de localiser uniquement des parties de Dishevelled au cortex des cellules S2 (Segalen et al, 2010). Ainsi, la transfection de ces constructions avec une construction codant Cycline A pourrait permettre de déterminer en premier lieu qui vraiment de Frizzled et de

Dishevelled recrute Cycline A à la membrane. Dans un second lieu, en utilisant des constructions codantes des parties de Cycline A, nous pourrions identifier quel domaine de l'un et/ou de l'autre permettrait ce recrutement. Surtout que l'on peut s'attendre à ce que les deux protéines soient requises. La CoIP présentée en **Figure 2** du papier nous montre que l'immunoprécipitation de Cycline A::HA par un anticorps anti-HA permet de co-immunoprécipiter aussi bien CDK1 que Frizzled::GFP mais aussi la forme surexprimée de Dishevelled::Myc dans nos lignées. Pour Frizzled, le domaine cytoplasmique et la troisième boucle intracellulaire pourraient être les cibles les plus probables car elles permettent le recrutement de Dishevelled. Concernant ce dernier, le domaine DEP qui permet l'interaction avec Mud est aussi le plus probable pour recruter Cycline A car il est directement impliqué dans la voie PCP ou bien la partie C-terminale qui permet de recruter la voie annexe d'orientation du fuseau via Canoë (Wee et al, 2011).

4. Et CDK1 dans cette histoire?

Dans son rôle canonique dans le cycle cellulaire, Cycline A s'associe avec différentes CDK, avec CDK2 en phase S/G2 et avec CDK1 en fin de phase G2 et en phase M. Les cellules pI sont bloquées en G2/M jusqu'à la reprise de leur division à 17h APF. Lors de la formation du croissant de Cycline A, la cellule est en fin de phase G2 et en prophase ainsi Cycline A est plus susceptible d'interagir avec CDK1 qu'avec CDK2. Et ceci d'autant plus que la protéine chimère CDK2::Myc spécifiquement exprimée dans les cellules pI ne présente pas de localisation corticale (données du laboratoire). Par contre, nous n'excluons pas l'idée que ce rôle de Cycline A non canonique dans l'orientation des divisions pourrait passer par son association avec CDK1. Surtout que la localisation intracellulaire de Mud/NuMA/LIN-5 et sa capacité à recruter Dynéine sont régulés par des phosphorylations et donc CDK1 serait une bonne piste. Déjà deux sites de phosphorylation sont reconnus par CDK1, localisés en thréonines 168 et 185 de l'homologue LIN5 de Mud, et ont été montrés comme étant critiques pour faciliter le recrutement cortical de la Dynéine (Portegijs et al, 2016).

Des premières observations au laboratoire pourraient aller dans ce sens. En effet, elles ont montré qu'en contexte de surexpression sous l'action du promoteur spécifique du lignage (*neuralized*), une forme de CDK1 couplée à la protéine Venus formait un croissant apical postérieur. De plus des expériences préliminaires de perte de fonction de *cdk1*, obtenu par RNAi, indiquent que CDK1 influencerait l'orientation des divisions de pI selon l'axe A/P dans le même sens que la perte de fonction *cycline A*. Par contre, de façon surprenante, CDK1 ne semble pas avoir d'effet sur le couplage de l'orientation des divisions entre pI et pIIa. Cette étude est donc à approfondir. Effectivement, la perte de fonction *cdk1* induit la transformation de pI en pIIb (Fichelson et Ghosh, 2004), ceci pourrait donc aussi avoir une répercussion sur l'orientation des divisions. Nous allons donc tester différentes combinaisons alléliques mutantes de CDK1 afin de se placer dans des conditions suffisantes pour altérer son activité sans affecter l'identité de la cellule. Aussi pour préciser l'implication de CDK1, grâce à Jad Awad, un étudiant de Master 2 du laboratoire a entamé l'étude pour analyser si l'activité de CDK1 est nécessaire pour permettre l'ancrage

de Cycline A au cortex. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de culture de nota afin de bloquer l'activité CDK1 avec des drogues (type roscovitine) seulement au moment de la division de pI. Dans ce système, nous allons observer la présence ou non du croissant de Cycline A. Grâce à lui et à une collaboration avec Shelagh Campbell (Université d'Alberta, Edmonton, Canada), la dynamique endogène de la localisation de CDK1 pourra être étudiée, grâce à l'utilisation d'une lignée CRISPR dans laquelle CDK1 sera fusionnée à la RFP au locus. Ceci nous permettra de l'associer à la Cycline A::GFP pour observer la présence ou non d'une colocalisation au cortex apical postérieur de pI. De plus si CDK1 forme un croissant cortical, cette lignée pourra nous servir pour analyser l'implication de Cycline A ou des facteurs de la PCP pour cette localisation. Si CDK1 est requis pour médier le rôle de Cycline A dans l'orientation de la division, nous supposons que sa fonction passerait par la régulation par phosphorylations du recrutement et/ou de l'activité de la protéine Mud qui présente des sites consensus de CDK1 et non pas des facteurs de la PCP, Frizzled possédant un site putatif de CDK1 mais localisé dans sa partie extracellulaire et Dishevelled bien qu'il puisse être phosphorylé par beaucoup de protéines, ne présente aucun site putatif de CDK1 dans sa séquence.

Alternativement, nous ne pouvons pas exclure que le rôle de Cycline A dans l'orientation des fuseaux de pI ne passerait pas par son association avec CDK1 mais par une interaction autre de Cycline A avec d'autres partenaires. Par ailleurs, comme chez les mammifères, Cycline A2 a été montré ayant un rôle dans la mobilité du cytosquelette en mobilisant RhoA sans l'intervention de CDK1.

5. Cycline A et la recherche de candidats

La perspective la plus pressante de ce projet est donc de déterminer la (ou les) cible(s) de Cycline A, que son action passe par CDK1 au non. Cycline A influe sur le fuseau de façon endogène en apical postérieur mais est aussi capable d'influencer sur cette orientation quand exprimée ectopiquement en basal antérieur, nous recherchons plutôt donc un partenaire présent aux deux pôles de la cellule. En parallèle de l'étude sur Mud et Dynéine, j'ai testé d'autres cibles potentielles. Dans la pêche aux candidats, nous avons été intéressés par la protéine Meru, spécifique aux pI. Néanmoins, nous avons relâché Meru car dans nos expériences préliminaires, il n'a pas montré d'interactions géniques avec Cycline A, malgré le fait que n'ayant été décrite que dans les cellules pI et régulant aussi l'orientation du fuseau via Frizzled, il était un candidat idéal. Mais pas le nôtre.

J'ai donc ensuite testé si la protéine Canoë pouvait être la cible de Cycline A. En effet Canoë est suggéré pour agir sur l'orientation du fuseau suite à son interaction avec Dishevelled en recrutant RhoA (St Johnston et al, 2013) et via Pins au pôle basal où elle favoriserait le recrutement de Mud (Wee et al, 2011). Elle semble donc être un candidat idéal pour médier le signal de Cycline A sur le fuseau (**Figure 30**). Nos données préliminaires montrent qu'il y a une interaction génétique entre *canoë* et *cycline A*. Plus précisément, le phénotype d'orientation des divisions obtenu en contexte de perte de fonction *cycline A* est partiellement sauvé voir même inversé par la perte de fonction *canoë*. L'action de Canoë via Dsh, a été montrée grâce à des expériences de CPA suggérant

que Canoë serait impliqué dans l'accrochage du fuseau au cytosquelette. Ce rôle passerait par le recrutement de RhoA via Dsh, en activant Diaphanous de la famille des formines, activateur de la nucléation de l'actine.

Ces données peuvent être mise en parallèle avec le rôle de Cycline A2 de mammifère sur l'activation de RhoA, qui elle-même participe à la nucléation des fibres d'actines en cellules en culture. Pour compléter nos données, il serait intéressant de faire des expériences nous permettant de voir si la perte de fonction canoë impacte sur la localisation corticale de Cycline A. Si c'est le cas, des expériences complémentaires comme un PLA ou une analyse STED seraient envisagées. Alors une étude plus complète sera envisagée pour analyser les interactions entre Cycline A et RhoA dans nos cellules. Ainsi l'analyse de l'orientation des divisions de pI pourrait être réalisée en contexte de perte de fonction *rhoA* seule et couplée à celle de *cycline A*. L'analyse entre Cycline A et les sous parties de la Myosine drosophile (Zipper & Spaghetti squash) en double mutant est aussi envisagée. Pour faire une analyse complète de l'impact du cytosquelette d'actine dans le contrôle de l'orientation des divisions, il faudrait aussi poursuivre l'analyse que nous avons débutée sur le comportement de la forme de la cellule en *cycline A* mutant. Nous nous proposons d'étudier dans les pI le comportement in vivo de l'actine grâce à des lignées exprimant des formes taguées RFP de l'actine dans les pI ainsi que celui de la myosine.

Malheureusement, si jamais Cycline A n'adhère pas à l'adage que les choses les plus simples sont souvent les plus applicables, une recherche à plus large échelle des partenaires de Cycline A peut-être envisagée. Pour réaliser ce crible, nous allons nous servir des conditions expérimentales que j'ai mis au point pour purifier par co-immunoprécipitation et identifier les partenaires de Cycline A par spectrophotométrie de masse. La surexpression de Frizzled, Dishevelled et Cycline A dans l'embryon nous a permis d'immuno-précipiter des complexes constitués de ces trois protéines ainsi que CDK1, mimant le processus observé dans les cellules pI. L'identification de ces nouveaux partenaires devrait permettre d'une part de confirmer les données obtenues et d'autre part de révéler tous les mécanismes dans lesquels Cycline A serait impliquée, dans le contrôle de l'orientation. Dans ce cas là nous pouvons proposer un modèle présenté sur la **Figure 32**.

6. Robustesse des ACD

Le lignage cellulaire aboutissant à la formation des soies mécanosensorielles est un système cellulaire extrêmement robuste dans lequel il est difficile d'induire des changements d'identité. Ainsi, la perte de fonction *frizzled* impacte l'orientation des divisions des précurseurs ainsi que l'orientation de la soie adulte, mais n'induit pas de défaut d'identité cellulaire. Pour observer un effet de la perte de fonction *frizzled* sur la détermination, il faut se placer dans un contexte sensibilisé pour la voie Notch, dont l'activation différentielle génère les identités cellulaires du lignage (Schweisguth 2015). Le phénotype mutant induit par un RNAi dirigé contre *cycline A* révèle une absence de structures externes des organes.

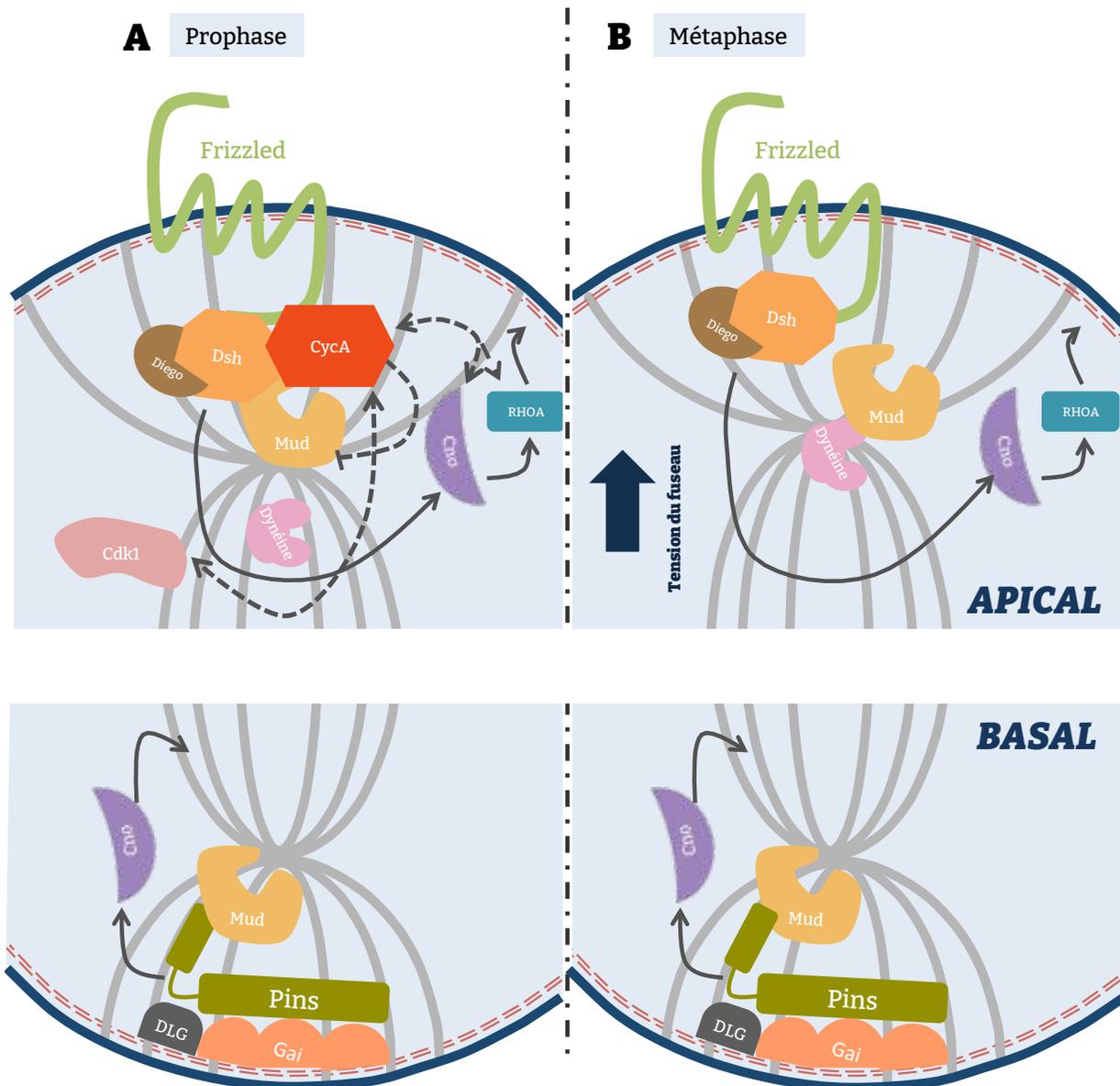


Figure 32: Modèle proposé du mécanisme d'action de Cycline A sur l'orientation de la division de pI Cortex apical (haut) et basal (bas) d'une cellule pI en division en **A**) Prophase et **B**) Métaphase. **A**) En prophase, Cycline A est recrutée au cortex apical par Frizzled (vert) et Dishvelled (orange). Cycline A recrute et séquestre Mud (jaune) au pôle apical de la cellule et empêche putativement le recrutement du moteur moléculaire Dynéine (rose). Cette action pourrait passer par CDK1 (rose foncé, flèche pointillée) et/ou par Canoë (violet, flèche pointillée). Canoë est supposé interagir avec Dsh et RhoA (bleu canard) pour l'ancrage du fuseau au cytosquelette d'actine (pointillés rouges). **B**) en métaphase, la Cycline A est dégradée et Mud peut recruter Dynéine ce qui induirait la tension du fuseau au pôle apical. **A et B**) en basal que ce soit en prophase ou métaphase, Mud est recruté par Pins (vert), Disc large (Dlg en gris) et Gai (orange) mais ne recruterait pas Dynéine. Il servirait juste à ancrer le fuseau. Canoë via Pins régule aussi l'attachement du fuseau.

Nous avons en effet pu observer qu'en condition de perte de fonction *cycline A* certaines pI et pIIa ne parvenaient pas à se diviser (en moyenne 30% de pIIa en RNAi Cycline A) alors que les pIIb, résultant de la division d'une pI, se divisent dans la grande majorité des cas. Ceci sous-entend qu'il y a une différence de seuil pour la quantité de Cycline A requise pour l'entrée en mitose des deux cellules filles de pI. Cette observation peut en plus expliquer la temporalité des divisions où les cellules pIIb se divisent plus tôt que les cellules pIIa. L'absence de division de pIIa conduit à des mouches chauves où seules les cellules internes sont formées. Pour autant ce phénotype ne peut pas être considéré comme un phénotype de Cycline A sur la mise en place de la détermination cellulaire en elle même puisque la cellule pIIa à l'origine des cellules externes se forme mais meurt. C'est le seul cas dans nos expériences où Cycline A impacte sur l'intégrité cellulaire finale du lignage des soies.

Ainsi dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de changement d'identité sur les organes finaux. D'abord, parce que Cycline A est dégradée avant la ségrégation de déterminants et de deux, parce que les phénotypes de changements d'orientation du fuseau mitotique lors de la division de pI en perte ou gain de fonction corticale de Cycline A, ne s'accompagne pas d'un mauvais adressage des facteurs d'identités entre les cellules filles (aPKC n'est pas affecté en perte de fonction Cycline A, **Figure S3** du papier). Seule la cellule fille antérieure reçoit PON::GFP qui mime le domaine de localisation de PON et, cette cellule prends toujours l'identité pIIb. Ce résultat est surprenant puisqu'en perte de fonction Mud des changements d'identité cellulaire ont été observés (Ségalen et al, 2010) et reflète ainsi une perte de polarité interne de la cellule. Deux raisons peuvent expliquer cette différence: d'une part la perte de fonction Cycline A n'est pas suffisante pour induire une désorientation suffisante du fuseau avec pour répercussion, une perte de son alignement avec les domaines corticaux de la cellule. D'autre part, les phénotypes de mauvaise ségrégation de PON observés en contexte *mud* mutant sont plus forts car la perte de fonction *mud*^{-/-} est globale et donc impacte les deux pools (Ségalen et al, 2010). Seule l'analyse de l'orientation du fuseau mitotique dans un contexte de perte de fonction totale de la Cycline A corticale permettrait de répondre à cette question.

En perte de fonction *frizzled* contrairement à celle de *mud*, les déterminants cellulaires restent alignés avec le fuseau, la polarité interne de la cellule n'est pas ou peu affectée. Seul un état sensibilisé de la cellule en contexte mutant hétérozygote pour les facteurs impliqués dans la régulation de la voie de signalisation Notch permet d'induire des changements d'identité cellulaire. Afin de voir si le même effet se produit en contexte de perte de fonction *cycline A*, il faudrait donc sensibiliser la voie de signalisation Notch et analyser les effets de la perte de fonction *cycline A* dans ce contexte sur la détermination des cellules. Néanmoins ces constatations posent la question de savoir si la perte de fonction *cycline A* influence la polarité interne de la cellule pI. Ou alors si elle impacte la polarité générale de la cellule par rapport à la polarité générale du notum. Si on observe le même phénotype que *frizzled*, cela sous entendrait que Cycline A joue sur l'attachement de la cellule pI dans l'épithélium en plus de jouer sur l'orientation de sa division. Cette action

serait locale et très temporelle. Serait-ce par Mud? Dans les TCJ il est supposé s'associer avec des protéines qui forment ces jonctions. Il faudrait donc que Cycline A régule aussi le Mud au TCJ des pI, une localisation que n'avons pas vu altérée dans nos études. Alors serait-ce par le cytosquelette cortical d'actine? La perte de fonction *cycline A* impacte la forme des cellules rendant leur membrane plus rigide. Cette rigidification de la membrane, pourrait influencer la cohésion épithéliale? Les cellules épithéliales l'entourant ne pouvant pas garder tous les liens moléculaires intacts avec la cellule pI, ce qui expliquerait que la cellule pI puisse tourner dans l'épithélium. Dans le cas de la perte de fonction *frizzled*, il est proposé que l'interaction avec Flamingo serait affectée ce qui pourrait expliquer le phénotype. Ainsi, nous pourrions le tester en interaction génétique avec Cycline A ainsi que Furrowed qui stabilise aussi la position de Frizzled à la membrane.

7. Il n'y a pas que la mouche dans la vie. Ni Cycline A.

Nos données préliminaires sur les cellules Caco-2 sont assez encourageantes car même si nous avons pas pu visualiser correctement la présence d'une polarité planaire dans nos cellules, la présence de cette Cycline A2 corticale, bien que uniforme au cortex nous laisse imaginer que la Cycline A pourrait aussi réguler l'orientation d'autres divisions. Avant de rentrer dans ces détails, il nous faudrait étudier de plus près cette Cycline A2 en définissant avec plus de précision le stade auquel elle se localise.

Notre Cycline A, bien que ce soit la meilleure des cyclines, n'est pas le seul facteur de cycle à avoir un rôle dans la polarité. Par exemple, il a été montré que le complexe de dégradation APC/C associé à sa sous-unité régulatrice Fizzy-related (Cdh1 chez les mammifères), promouvait la voie PCP par la répression de la kinase Nek2, un inhibiteur de Dishevelled (Weber et Mlodzik 2016) Aussi lors des divisions symétriques de cellules mammifères, les facteurs de la PCP à la mitose sont endocytés et ré-adressés aux membranes des cellules filles sous le contrôle de la kinase mitotique Plk1 (Shrestha et al, 2015).

Le fait qu'il n'y a pas que Cycline A qui interagit avec la PCP ne retire en rien à l'importance du rôle de Cycline A dans la régulation de l'orientation des divisions. Ceci souligne d'autant plus l'importance d'une coordination fine entre cycle et polarité cellulaires au niveau spatial et temporel aussi bien pour le déroulement d'une division symétrique comme asymétrique.

REFERENCES

1. Adler, P. N. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2, 525–535 (2002).
2. Adler, P. N., Charlton, J. & Liu, J. Mutations in the cadherin superfamily member gene *dachsous* cause a tissue polarity phenotype by altering *frizzled* signaling. *Development* 125, 959–968 (1998).
3. Adler, P. N. & Wallingford, J. B. From Planar Cell Polarity to Ciliogenesis and Back: The Curious Tale of the PPE and CPLANE proteins. *Trends Cell Biol.* 27, 379–390 (2017).
4. Afonso, D. J. S. et al. TARANIS Functions with Cyclin A and Cdk1 in a Novel Arousal Center to Control Sleep in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 25, 1717–1726 (2015).
5. Afonso, D. J. S., Machado, D. R. & Koh, K. Control of sleep by a network of cell cycle genes. *Fly (Austin)*. 9, 165–172 (2015).
6. Ajioka, I. Coordination of proliferation and neuronal differentiation by the retinoblastoma protein family. *Dev. Growth Differ.* 56, 324–334 (2014).
7. Albertson, R. & Doe, C. Q. Dlg, Scrib and Lgl regulate neuroblast cell size and mitotic spindle asymmetry. *Nat. Cell Biol.* 5, 166–170 (2003).
8. Ali, F. et al. Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138, 4267–4277 (2011).
9. Alves, M. J. et al. CCNA2 Ablation in Aged Mice Results in Abnormal rRNA Granule Accumulation in Hippocampus. *Am. J. Pathol.* 189, 426–439 (2019).
10. Angers, S. & Moon, R. T. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 468–477 (2009).
11. Arsic, N. et al. A novel function for Cyclin A2: Control of cell invasion via rhoa signaling. *J. Cell Biol.* 196, 147–162 (2012).
12. Audibert, A., Simon, F. & Ghob, M. Cell cycle diversity involves differential regulation of cyclin E activity in the *Drosophila* bristle cell lineage. *Development* 132, 2287–2297 (2005).
13. Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T. & Perrimon, N. Differential recruitment of dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 12, 2610–2622 (1998).
14. Axelrod, J. D. Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev.* 15, 1182–1187 (2001).
15. Ayukawa, T. et al. *Dachsous*-Dependent Asymmetric Localization of Spiny-Legs Determines Planar Cell Polarity Orientation in *Drosophila*. *Cell Rep.* 8, 610–621 (2014).
16. Banerjee, J. J. et al. Meru couples planar cell polarity with apical-basal polarity during asymmetric cell division. *Elife* 6, 1–21 (2017).
17. Basto, R. et al. Flies without Centrioles. *Cell* 125, 1375–1386 (2006).
18. Bellache, Y. et al. The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* 106, 355–366 (2001).
19. Bellaïche, Y., Beaudoin-Massiani, O., Stüttem, I. & Schweisguth, F. The planar cell polarity protein strabismus promotes pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. *Development* 131, 469–478 (2004).
20. Bennett, V. & Chen, L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 61–67 (2001).
21. Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M. & Knoblich, J. A. The endocytic protein α -adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3, 221–231 (2002).
22. Berger, C. et al. Cell cycle independent role of Cyclin E during neural cell fate specification in *Drosophila* is mediated by its regulation of Prospero function. *Dev. Biol.* 337, 415–424 (2010).

23. Bergstralh, D. T., Haack, T. & St Johnston, D. Epithelial polarity and spindle orientation: intersecting pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20130291 (2013).
24. Bergstralh, D. T., Lovegrove, H. E. & Johnston, D. S. Lateral adhesion drives reintegration of misplaced cells into epithelial monolayers. *Nat. Cell Biol.* (2015). doi:10.1038/ncb3248
25. Bergstralh, D. T., Dawney, N. S. & St Johnston, D. Spindle orientation: A question of complex positioning. *Development (Cambridge)* 144, 1137–1145 (2017).
26. Bergstralh, D. T. et al. Pins is not required for spindle orientation in the *Drosophila* wing disc. *Development dev.* 135475 (2016). doi:10.1242/dev.135475
27. Bergstralh, D. T., Lovegrove, H. E. & St Johnston, D. Discs large links spindle orientation to apical-basal polarity in *drosophila* epithelia. *Curr. Biol.* 23, 1707–1712 (2013).
28. Betschinger, J., Mechtler, K. & Knoblich, J. A. Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell* 124, 1241–1253 (2006).
29. Bhalerao, S., Berdnik, D., Török, T. & Knoblich, J. A. Localization-dependent and -independent roles of numb contribute to cell-fate specification in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1583–1590 (2005).
30. Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 207–217 (2009).
31. Boettner, B. et al. The AF-6 homolog canoe acts as a Rap1 effector during dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Genetics* 165, 159–169 (2003).
32. Bonnet, F. et al. Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase. *Elife* 7, (2018).
33. Bornens, M. Polarité cellulaire : sens et signification. *Médecine/Sciences* 35, 452–461 (2019).
34. Bosveld, F., Ainslie, A. & Bellaïche, Y. Sequential activities of Dynein, Mud and Asp in centrosome-spindle coupling maintain centrosome number upon mitosis. *J. Cell Sci.* 130, 3557–3567 (2017).
35. Bosveld, F. et al. Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature16970
36. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109–118 (1998).
37. Bowman, S. K., Neumüller, R. A., Novatchkova, M., Du, Q. & Knoblich, J. A. The *Drosophila* NuMA Homolog Mud Regulates Spindle Orientation in Asymmetric Cell Division. *Dev. Cell* 10, 731–742 (2006).
38. Brittle, A., Thomas, C. & Strutt, D. Planar polarity specification through asymmetric subcellular localization of fat and dachsous. *Curr. Biol.* 22, 907–914 (2012).
39. Brown, N. R. et al. CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nat. Commun.* 6, 1–12 (2015).
40. Cabernard, C. & Doe, C. Q. Apical/Basal Spindle Orientation Is Required for Neuroblast Homeostasis and Neuronal Differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* 17, 134–141 (2009).
41. Caddy, J. et al. Epidermal Wound Repair is Regulated by the Planar Cell Polarity Signaling Pathway. *Dev. Cell* 19, 138–147 (2010).
42. Cai, Y., Chia, W. & Yang, X. A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J.* 20, 1704–1714 (2001).
43. Cao, F., Miao, Y., Xu, K. & Liu, P. Lethal (2) giant larvae: An indispensable regulator of cell polarity and cancer development. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 380–389 (2015).
44. Carmena, A., Speicher, S. & Baylies, M. The PDZ Protein Canoe/AF-6 links ras-MAPK, Notch and Wingless/Wnt signaling pathways by directly interacting with Ras, Notch and Dishevelled. *PLoS One* 1, (2006).

45. Carvajal-Gonzalez, J. M. & Mlodzik, M. Mechanisms of planar cell polarity establishment in *Drosophila*. *F1000Prime Rep.* 6, 98 (2014).
46. Chae, J. et al. The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* 126, 5421–5429 (1999).
47. Chen, J., Sayadian, A. C., Lowe, N., Lovegrove, H. E. & St Johnston, D. An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLoS Biol.* 16, e3000041 (2018).
48. Chin, M. L. & Mlodzik, M. The *drosophila* selectin *furrowed* mediates intercellular planar cell polarity interactions via *frizzled* stabilization. *Dev. Cell* 26, 455–468 (2013).
49. Corda, G. & Sala, A. Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: *Fzd6* takes centre stage. *Oncogenesis* 6, e364 (2017).
50. Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S. & Laskey, R. A. Chromatin-bound *Cdc6* persists in S and G2 phases in human cells, while soluble *Cdc6* is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J. Cell Sci.* 113, 1929–1938 (2000).
51. Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. *Bazooka* and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14475–14480 (2001).
52. Crichton, M. *Jurassic Park*. (Random House, 1990).
53. David, N. B. et al. *Drosophila Ric-8* regulates *Gai* cortical localization to promote *Gai*-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 7, 1083–1090 (2005).
54. Devenport, D., Oristian, D., Heller, E. & Fuchs, E. Mitotic internalization of planar cell polarity proteins preserves tissue polarity. *Nat. Cell Biol.* 13, 893–902 (2011).
55. Dharod, J. *Mitotic Spindle*. (2017).
56. di Pietro, F. et al. An RNAi Screen in a Novel Model of Oriented Divisions Identifies the Actin-Capping Protein β as an Essential Regulator of Spindle Orientation. *Curr. Biol.* 27, (2017).
57. Dienemann, A. & Sprenger, F. Requirements of Cyclin A for Mitosis Are Independent of Its Subcellular Localization. *Curr. Biol.* 128, 189–190 (2004).
58. Ding, M. & Wang, X. Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity. *Oncol. Lett.* 14, 6327–6333 (2017).
59. Djiane, A., Yogev, S. & Mlodzik, M. The apical determinants *aPKC* and *dPatj* regulate *frizzled*-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell* 121, 621–631 (2005).
60. Dong, X. et al. Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: *rca1* regulates Cyclin A. *Genes Dev.* 6, 94–105 (1997).
61. Donoughe, S. & di Nardo, S. *Dachsous* and *frizzled* contribute separately to planar polarity in the *Drosophila* ventral epidermis. *Development* 138, 2751–2759 (2011).
62. Du, Q. & Macara, I. G. Mammalian *Pins* is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503–516 (2004).
63. Dumitru, A. M. G., Rusin, S. F., Clark, A. E. M., Kettenbach, A. N. & Compton, D. A. Cyclin A/Cdk1 modulates *Plk1* activity in prometaphase to regulate kinetochore-microtubule attachment stability. *Elife* 6, 1–23 (2017).
64. Echard, A. & O'Farrell, P. H. The Degradation of Two Mitotic Cyclins Contributes to the Timing of Cytokinesis. *Bone* 23, 1–7 (2008).
65. Elsum, I., Yates, L., Humbert, P. O. & Richardson, H. E. The *Scribble-Dlg-Lgl* polarity module in development and cancer: From flies to man. *Essays Biochem.* 53, 141–168 (2012).
66. Ezan, J. & Montcouquiol, M. Les liens multiples entre les cils et la polarité planaire cellulaire. *Medecine/Sciences* 30, 1004–1010 (2014).
67. Fahmy, O. G. & Fahmy, M. [New mutants report.]. *Drosoph. Inf. Serv.* 33, 82–94 (1959).

68. Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. & Eaton, S. The Ankyrin Repeat Protein Diego Mediates Frizzled-Dependent Planar Polarization. *Dev. Cell* 1, 93–101 (2001).
69. Fernández-Miñán, A., Martín-Bermudo, M. D. & González-Reyes, A. Integrin Signaling Regulates Spindle Orientation in *Drosophila* to Preserve the Follicular-Epithelium Monolayer. *Curr. Biol.* 17, 683–688 (2007).
70. Fichelson, P. & Gho, M. Mother-daughter precursor cell fate transformation after Cdc2 down-regulation in the *Drosophila* bristle lineage. *Dev. Biol.* 276, 367–377 (2004).
71. Fichelson, P. & Gho, M. The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. *Development* 130, 123–133 (2003).
72. Fu Ng, B. et al. α -Spectrin and integrins act together to regulate actomyosin and columnarization, and to maintain a monolayered follicular epithelium. *Development* 143, 1388–99 (2016).
73. Fu, M. et al. Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 280, 29728–29742 (2005).
74. Fulford, A. D. & McNeill, H. Fat/Dachsous family cadherins in cell and tissue organisation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 62, 96–103 (2020).
75. Fuller, M. T. & Spradling, A. C. Male and female *Drosophila* germline stem cells: Two versions of immortality. *Science* (80-). 316, 402–404 (2007).
76. Fung, T. K., tang ma, H. & Poon, R. Y. C. Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells: Cyclin A as an Activator of M Phase-promoting Factor. *Mol. Biol. Cell* 18, 986–994 (2007).
77. Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T. & Iwamoto, N. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* 2, e28960 (2014).
78. Gao, B. et al. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Development* 140, 163–176 (2012).
79. Gho, M., Bellaïche, Y. & Schweisguth, F. Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573–84 (1999).
80. Gönczy, P. & Rose, L. S. Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook* 1–20 (2005). doi:10.1895/wormbook.1.30.1
81. Gray, R. S., Roszko, I. & Solnica-Krezel, L. Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity. *Dev. Cell* 21, 120–133 (2011).
82. Guan, Z. et al. Mushroom body defect, a gene involved in the control of neuroblast proliferation in *Drosophila*, encodes a coiled-coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8122–8127 (2000).
83. Gubb, D. & Garcia-Bellido. A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* Vol. 68, 37–57 (1982).
84. Gubb, D. et al. The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev.* 13, 2315–2327 (1999).
85. Guo, M., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Control of daughter cell fates during asymmetric division: Interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27–41 (1996).
86. Hale, R. & Strutt, D. Conservation of Planar Polarity Pathway Function Across the Animal Kingdom. *Annu. Rev. Genet.* 49, 529–551 (2015).
87. Hanáková, K. et al. Comparative phosphorylation map of Dishevelled 3 links phospho-signatures to biological outputs. *Cell Commun. Signal.* 17, 1–21 (2019).
88. Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P. & Kukasawa, K. Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Bone* 23, 1–7 (2008).
89. Hartenstein, V. & Posakony, J. W. A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev. Biol.* 142, 13–30 (1990).
90. Hauf, S. et al. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3, 0419–0432 (2005).

91. Heck, B. W. & Devenport, D. Trans-endocytosis of Planar Cell Polarity Complexes during Cell Division. *Curr. Biol.* 27, 3725-3733.e4 (2017).
92. Heck, B. W. & Devenport, D. Trans-endocytosis of Planar Cell Polarity Complexes during Cell Division. *Curr. Biol.* 27, 3725-3733.e4 (2017).
93. Hegarat, N. et al. Cyclin A triggers Mitosis either via the Greatwall kinase pathway or Cyclin B. *EMBO J.* 39, 1–23 (2020).
94. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479 (1998).
95. Hinnant, T. D., Merkle, J. A. & Ables, E. T. Coordinating Proliferation, Polarity, and Cell Fate in the Drosophila Female Germline. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–22 (2020).
96. Homem, C. C. F. & Knoblich, J. A. Drosophila neuroblasts: A model for stem cell biology. *Dev.* 139, 4297–4310 (2012).
97. Hu, D. J. K. & Jasper, H. Control of Intestinal Cell Fate by Dynamic Mitotic Spindle Repositioning Influences Epithelial Homeostasis and Longevity. *Cell Rep.* 28, 2807-2823.e5 (2019).
98. Humbert, P. O. et al. Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* 27, 6888–6907 (2008).
99. Hydbring, P., Malumbres, M. & Sicinski, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 280–292 (2016).
100. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 1, 609–632 (2002).
101. Inaba, M., Venkei, Z. G. & Yamashita, Y. M. The polarity protein baz forms a platform for the centrosome orientation during asymmetric stem cell division in the Drosophila male germline. *Elife* 2015, 1–27 (2015).
102. Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N. & Matsuzaki, F. Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in Drosophila neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.* 164, 729–738 (2004).
103. Jacobs, H. W., Knoblich, J. A. & Lehner, C. F. Drosophila Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. *Genes Dev.* 12, 3741–3751 (1998).
104. Jauffred, B. et al. Regulation of centrosome movements by Numb and the collapsin response mediator protein during Drosophila sensory progenitor asymmetric division. *Dev.* 140, 2657–2668 (2013).
105. Jeffrey, P. D. et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313–320 (1995).
106. Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. & Mlodzik, M. Diego and Prickle regulate frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* 7, 691–697 (2005).
107. Jin Park, W., Liu, J. & Adler, P. N. frizzled Gene Expression and Development of Tissue Polarity in the Drosophila Wing. *DEVELOPMENTAL GENETICS* 15, (1994).
108. Johnston, C. a et al. Formin-mediated actin polymerization cooperates with Mushroom body defect (Mud)-Dynein during Frizzled-Dishevelled spindle orientation. *J. Cell Sci.* 126, 4436–44 (2013).
109. Jones, K. H., Liu, J. & Adler, P. N. Molecular analysis of EMS-induced frizzled mutations in Drosophila melanogaster. *Genetics* 142, 205–215 (1996).
110. Jossin, Y. Molecular mechanisms of cell polarity in a range of model systems and in migrating neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 106, 103503 (2020).
111. Kanakkanthara, A. et al. Cyclin A2 is an RNA binding protein that controls Mre11 mRNA translation. *Science* (80-.). 353, 1549–1552 (2016).
112. Katanaev, V. L., Ponzielli, R., Sémériva, M. & Tomlinson, A. Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell* 120, 111–122 (2005).

113. Kempthues, K. J., Priess, J., Cheng, N. S. & Morton, D. Identification of Genes Required for Cytoplasmic Localization in *C-Elegans*. *J. Cell. Biochem.* 52, 20 (1988).
114. Kern, D. M., Nicholls, P. K., Page, D. C. & Cheeseman, I. M. A mitotic SKAP isoform regulates spindle positioning at astral microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 213, 315–328 (2016).
115. Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A. & Ueno, N. PKC δ is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev.* 17, 1663–1676 (2003).
116. Knoblich, J. A., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Asymmetric segregation of numb and prospero during cell division. *Nature* 377, 624–627 (1995).
117. Kotak, S., Afshar, K., Busso, C. & Gönczy, P. Aurora A kinase regulates proper spindle positioning in *C. elegans* and in human cells. *J. Cell Sci.* 129, 3015–3025 (2016).
118. Kotak, S., Busso, C. & Gönczy, P. NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function. *EMBO J.* 32, 2517–2529 (2013).
119. Kotak, S., Busso, C. & Gönczy, P. NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function. *EMBO J.* 32, 2517–29 (2013).
120. Kozak, E. L. et al. Epithelial Planar Bipolarity Emerges from Notch-Mediated Asymmetric Inhibition of Emx2. *Curr. Biol.* 30, 1142–1151.e6 (2020).
121. LA, S. K., DA, O. & SB, H. Transcription networks and cyclin/CDKs: the yin and yang of cell cycle oscillators. *Cell Cycle* 7, 2626–2629 (2008).
122. Lang, C. F. & Munro, E. The PAR proteins: From molecular circuits to dynamic self-stabilizing cell polarity. *Dev.* 144, 3405–3416 (2017).
123. Langevin, J. et al. Lethal giant larvae controls the localization of Notch-signaling regulators Numb, neuralized, and Sanpodo in *Drosophila* sensory-organ precursor cells. *Curr. Biol.* 15, 955–962 (2005).
124. Lawrence, P. A. & Casal, J. Planar cell polarity: Two genetic systems use one mechanism to read gradients. *Dev.* 145, (2018).
125. Lawrence, P. A., Casal, J. & Struhl, G. Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of *Drosophila*. *Development* 131, 4651–4664 (2004).
126. Le Borgne, R., Bardin, A. & Schweisguth, F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751–1762 (2005).
127. Le Borgne, R., Bellaïche, Y. & Schweisguth, F. *Drosophila* E-Cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr. Biol.* 12, 95–104 (2002).
128. Le Borgne, R. & Schweisguth, F. Unequal segregation of neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell* 5, 139–148 (2003).
129. Lechler, T. & Fuchs, E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, (2005).
130. Lee, C. Y., Wilkinson, B. D., Siegrist, S. E., Wharton, R. P. & Doe, C. Q. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev. Cell* 10, 441–449 (2006).
131. Lee, H. & Adler, P. N. The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mech. Dev.* 121, 37–49 (2004).
132. Lehner, C. F. & O’Farrell, P. H. The Roles of *Drosophila* Cyclins A and B in Mitotic Control. *Bone* 23, 1–7 (2008).
133. Lehner, C. F. & O’Farrell, P. H. Expression and function of *Drosophila* cyclin a during embryonic cell cycle progression. *Cell* 56, 957–968 (1989).
134. Lilly, M. A., De Cuevas, M. & Spradling, A. C. Cyclin A associates with the fusome during germline cyst formation in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol.* 218, 53–63 (2000).

135. Lim, S. & Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Dev.* 140, 3079–3093 (2013).
136. Lin, H. & Spradling, A. C. Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Developmental Genetics* 16, 6–12 (1995).
137. Lorson, M. A., Horvitz, H. R. & Van Den Heuvel, S. LIN-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 148, 73–86 (2000).
138. Lough, K. J. et al. Telophase correction refines division orientation in stratified epithelia. *Elife* 8, 1–32 (2019).
139. Loukil, A. et al. Foci of cyclin A2 interact with actin and RhoA in mitosis. *Sci. Rep.* 6, (2016).
140. Lovegrove, H. E., Bergstralh, D. T. & Johnston, D. S. The role of integrins in *Drosophila* egg chamber morphogenesis. *Dev.* 146, (2019).
141. Lu, B., Ackerman, L., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Modes of protein movement that lead to the asymmetric localization of partner of Numb during *Drosophila* neuroblast division. *Mol. Cell* 4, 883–91 (1999).
142. Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* 409, 522–525 (2001).
143. Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Partner of Numb colocalizes with numb during mitosis and directs numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* 95, 225–235 (1998).
144. Lydersen, B. K. & Pettijohn, D. E. Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus: Distribution in a human/hamster hybrid cell. *Cell* 22, 489–499 (1980).
145. Ma, D., Yang, C. hui, McNeill, H., Simon, M. A. & Axelrod, J. D. Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* 421, 543–547 (2003).
146. Malumbres, M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol. Rev.* 91, 973–1007 (2011).
147. Mandai, K., Rikitake, Y., Shimono, Y. & Takai, Y. Afadin/AF-6 and canoe: Roles in cell adhesion and beyond. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116, (Elsevier Inc., 2013).
148. Mandai, K., Rikitake, Y., Shimono, Y. & Takai, Y. Afadin/AF-6 and canoe: Roles in cell adhesion and beyond. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116, (Elsevier Inc., 2013).
149. Mao, Y. et al. Characterization of a *Dchs1* mutant mouse reveals requirements for *Dchs1*-*Fat4* signaling during mammalian development. *Development* 138, 947–957 (2011).
150. Mao, Y. et al. Planar polarization of the atypical myosin *Dachs* orients cell divisions in *Drosophila*. *Genes Dev.* 25, 131–136 (2011).
151. Matis, M. & Axelrod, J. D. Regulation of PCP by the fat signaling pathway. *Genes Dev.* 27, 2207–2220 (2013).
152. Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C. & Benz, E. J. Inhibition of Protein 4.1 R and NuMA interaction by mutagenization of their binding-sites abrogates nuclear localization of 4.1 R. *Clin. Transl. Sci.* 2, 102–111 (2009).
153. Moeller, H. et al. *Diversin* regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15900–15905 (2006).
154. Morgan, D. O. *The Cell Cycle, Principles of Control*. David O. Morgan. *Integr. Comp. Biol.* 47, 794–795 (2007).
155. Morin, X. & Bellaïche, Y. Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Dev. Cell* 21, 102–119 (2011).
156. Morin, X., Jaouen, F. & Durbec, P. Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* 10, 1440–1448 (2007).

157. Morrow, A., Underwood, J., Seldin, L., Hinnant, T. & Lechler, T. Regulated spindle orientation buffers tissue growth in the epidermis. *Elife* 8, 1–9 (2019).
158. Munoz-Soriano, V., Belacortu, Y. & Paricio, N. Planar Cell Polarity Signaling in Collective Cell Movements During Morphogenesis and Disease. *Curr. Genomics* 13, 609–622 (2012).
159. Munro, E. M. PAR proteins and the cytoskeleton: A marriage of equals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 86–94 (2006).
160. Nakajima, Y.-I., Meyer, E. J., Kroesen, A., McKinney, S. a. & Gibson, M. C. Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. *Nature* 500, 1–5 (2013).
161. Nano, M. & Basto, R. Consequences of centrosome dysfunction during brain development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1002, (Springer New York LLC, 2017).
162. Navajas Acedo, J. et al. PCP and Wnt pathway components act in parallel during zebrafish mechanosensory hair cell orientation. *Nat. Commun.* 10, (2019).
163. Neuman, E. et al. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5338–5347 (1997).
164. Nipper, R. W., Siller, K. H., Smith, N. R., Doe, C. Q. & Prehoda, K. E. Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14306–11 (2007).
165. Noatynska, A., Tavernier, N., Gotta, M. & Pintard, L. Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open Biol.* 3, 130083 (2013).
166. Olofsson, J., Sharp, K. A., Matis, M., Cho, B. & Axelrod, J. D. Prickle/spiny-legs isoforms control the polarity of the apical microtubule network in planar cell polarity. *Dev.* 141, 2866–2874 (2014).
167. Otto, T. & Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 93–115 (2017).
168. Pan, G. et al. Signal transduction by the Fat cytoplasmic domain. *Dev.* 140, 831–842 (2013).
169. Park, D. H. & Rose, L. S. Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev. Biol.* 315, 42–54 (2008).
170. Park, W. J., Liu, J. & Adler, P. N. The frizzled gene of *Drosophila* encodes a membrane protein with an odd number of transmembrane domains. *Mech. Dev.* 45, 127–137 (1994).
171. Pascreau, G., Eckerdt, F., Churchill, M. E. A. & Maller, J. L. Discovery of a distinct domain in cyclin A sufficient for centrosomal localization independently of Cdk binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2932–2937 (2010).
172. Pauklin, S. & Vallier, L. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* 155, 135 (2013).
173. Peco, E. et al. The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development* 139, 1095–1104 (2012).
174. Peng, C. Y., Manning, L., Albertson, R. & Doe, C. Q. The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 408, 596–600 (2000).
175. Peters, J. M. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931–943 (2002).
176. Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* 18, 396–410 (1999).
177. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503–533 (2001).
178. Pietro, F., Echard, A. & Morin, X. Regulation of mitotic spindle orientation : an integrated view. *EMBO Rep.* 1–25 (2016).
179. Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Theme and variations. *Adv. Cancer Res.* 66, 181–212 (1995).
180. Pipparelli, A. Contribution à l'étude du cycle de la cellule endothéliale cornéenne humaine. (2010).

181. Pitt, J. N., Schisa, J. A. & Priess, J. R. P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Dev. Biol.* 219, 315–333 (2000).
182. Portegijs, V. et al. Multisite Phosphorylation of NuMA-Related LIN-5 Controls Mitotic Spindle Positioning in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 12, 1–32 (2016).
183. Potapova, T. A., Sivakumar, S., Flynn, J. N., Li, R. & Gorbsky, G. J. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Mol. Biol. Cell* 22, 1191–1206 (2011).
184. Radulescu, A. E. & Cleveland, D. W. NuMA after 30 years: The matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 20, 214–222 (2010).
185. Ramat, A. et al. Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity in *Drosophila* sensory organs. *Dev.* 143, 3024–3034 (2016).
186. Rauskolb, C., Pan, G., Reddy, B. V. V. G., Oh, H. & Irvine, K. D. Zyxin links fat signaling to the hippo pathway. *PLoS Biol.* 9, (2011).
187. Reddy, B. V. V. G. & Irvine, K. D. The fat and warts signaling pathways: New insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development* 135, 2827–2838 (2008).
188. Resnitzky, D., Hengst, L. & Reed, S. I. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4347–4352 (1995).
189. Reutens, A. T. et al. Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol. Endocrinol.* 15, 797–811 (2001).
190. Rhind, N. & Russell, P. Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–15 (2012).
191. Ridley, A. J. et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* (80-.). 302, 1704–1709 (2003).
192. Rieder, C. L. & Khodjakov, A. Mitosis Through the Microscope: Advances in Seeing Inside Live Dividing Cells. *Science* (80-.). 300, 91 LP – 96 (2003).
193. Roegiers, F., Younger-shepherd, S., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Bazooka is required for localization of determinants and controlling proliferation in the sensory organ precursor cell lineage in *Drosophila*. *PNAS* 98, 14469–14474 (2001).
194. Rogulja, D. & Young, M. W. Control of sleep by cyclin A and its regulator. *Science* 335, 1617–1621 (2012).
195. Rogulja, D. & Young, M. W. Control of Sleep by Cyclin A and its Regulator Dragana. *Bone* 23, 1–7 (2008).
196. Rosenberg, A. R. et al. Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* 10, 1501–1509 (1995).
197. Ross, A. J. et al. Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* 37, 1135–1140 (2005).
198. Ross, M. E., Carter, M. L. & Lee, J. H. MN20, a D2 cyclin, is transiently expressed in selected neural populations during embryogenesis. *J. Neurosci.* 16, 210 LP – 219 (1996).
199. Saburi, S. et al. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat. Genet.* 40, 1010–1015 (2008).
200. Sagner, A. et al. Establishment of global patterns of planar polarity during growth of the *drosophila* wing epithelium. *Curr. Biol.* 22, 1296–1301 (2012).
201. Sallé, J., Campbell, S. D., Gho, M. & Audibert, A. CycA is involved in the control of endoreplication dynamics in the *Drosophila* bristle lineage. *Development* 557, 547–557 (2012).
202. Salzmann, V. et al. Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in *Drosophila* germline stem cell division. *Mol. Biol. Cell* 25, 267–275 (2014).

203. Sana, S., Keshri, R., Rajeevan, A., Kapoor, S. & Kotak, S. Plk1 regulates spindle orientation by phosphorylating NuMA in human cells. *Life Sci. Alliance* 1, 1–14 (2018).
204. Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Knoblich, J. A. A protein complex containing inscuteable and the $G\alpha$ -binding protein pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 353–362 (2000).
205. Schober, M., Schaefer, M. & Knoblich, J. A. Bazooka recruits inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548–551 (1999).
206. Schweisguth, F. Regulation of Notch Signaling Activity. *Curr. Biol.* 14, R129–R138 (2004).
207. Schweisguth, F. Asymmetric cell division in the *Drosophila* bristle lineage: From the polarization of sensory organ precursor cells to Notch-mediated binary fate decision. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 299–309 (2015).
208. Segalen, M. Orientation des Divisions Symétriques et Asymétriques en Aval de la voie Frizzled. (2009).
209. Segalen, M. & Bellaïche, Y. Cell division orientation and planar cell polarity pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 972–977 (2009).
210. Ségalen, M. et al. The Fz-Dsh Planar Cell Polarity Pathway Induces Oriented Cell Division via Mud/NuMA in *Drosophila* and Zebrafish. *Dev. Cell* 19, 740–752 (2010).
211. Sei, Y., Feng, J., Chow, C. C. & Wank, S. A. Asymmetric cell division-dominant neutral drift model for normal intestinal stem cell homeostasis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 316, G64–G74 (2019).
212. Seifert, J. R. K. & Mlodzik, M. Frizzled/PCP signalling: A conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 126–138 (2007).
213. Shard, C., Luna-Escalante, J. & Schweisguth, F. Neuralized regulates a travelling wave of Epithelium-to-Neural Stem Cell morphogenesis in. (2020).
214. Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D. & Uemura, T. Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Dev. Cell* 10, 209–222 (2006).
215. Shrestha, R. et al. Mitotic Control of Planar Cell Polarity by Polo-like Kinase 1. *Dev. Cell* 33, 522–534 (2015).
216. Siderovski, D. P. & Willard, F. S. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 51–66 (2005).
217. Siller, K. H., Cabernard, C. & Doe, C. Q. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* 8, 594–600 (2006).
218. Siller, K. H., Cabernard, C. & Doe, C. Q. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* 8, 594–600 (2006).
219. Simons, M. & Mlodzik, M. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu. Rev. Genet.* 42, 517–540 (2008).
220. Singh, J., Yanfeng, W. A., Grumolato, L., Aaronson, S. A. & Mlodzik, M. Abelson family kinases regulate Frizzled planar cell polarity signaling via Dsh phosphorylation. *Genes Dev.* 24, 2157–2168 (2010).
221. Smith, C. A. et al. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 26, 468–480 (2007).
222. Smith, C. A. et al. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 26, 468–480 (2007).
223. Sonoda, J. & Wharton, R. P. *Drosophila* brain tumor is a translational repressor. *Genes Dev.* 15, 762–773 (2001).

224. Spana, E. P., Kopczynski, C., Goodman, C. S. & Doe, C. Q. Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* 121, 3489–3494 (1995).
225. Sprenger, F., Yakubovich, N. & O'Farrell, P. H. S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr. Biol.* 7, 488–499 (1997).
226. Strausfeld, U. P. et al. Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in xenopus egg extracts. *J. Cell Sci.* 109, 1555–1563 (1996).
227. Strutt, D. Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol. Cell* 7, 367–375 (2001).
228. Strutt, D., Madder, D., Chaudhary, V. & Artymiuk, P. J. Structure-function dissection of the Frizzled receptor in *Drosophila melanogaster* suggests different mechanisms of action in planar polarity and canonical Wnt signaling. *Genetics* 192, 1295–1313 (2012).
229. Strutt, D. & Warrington, S. J. Planar polarity genes in the *Drosophila* wing regulate the localisation of the FH3-domain protein Multiple Wing Hairs to control the site of hair production. *Development* 135, 3103–3111 (2008).
230. Strutt, H. & Strutt, D. Nonautonomous planar polarity patterning in *Drosophila*: Dishevelled-independent functions in frizzled. *Dev. Cell* 3, 851–863 (2002).
231. Strutt, H. & Strutt, D. Differential Stability of Flamingo Protein Complexes Underlies the Establishment of Planar Polarity. *Curr. Biol.* 18, 1555–1564 (2008).
232. Strutt, H., Warrington, S. J. & Strutt, D. Dynamics of Core Planar Polarity Protein Turnover and Stable Assembly into Discrete Membrane Subdomains. *Dev. Cell* 20, 511–525 (2011).
233. Takahashi, K., Matsuo, T., Katsube, T., Ueda, R. & Yamamoto, D. Direct binding between two PDZ domain proteins canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Mech. Dev.* 78, 97–111 (1998).
234. Tatum, N. J. & Endicott, J. A. Chatterboxes: the structural and functional diversity of cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2020). doi:10.1016/j.semcdb.2020.04.021
235. Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. & Adler, P. N. Van Gogh: A new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* 150, 199–210 (1998).
236. Tepass, U. & Knust, E. Phenotypic and developmental analysis of mutations at thecrumbs locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199, 189–206 (1990).
237. Tio, M., Udolph, G., Yang, X. & Chia, W. cdc2 links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* 409, 1063–1067 (2001).
238. Toughiri, R., Li, X., Du, Q. & Bieberich, C. J. Phosphorylation of NuMA by Aurora-A kinase in PC-3 prostate cancer cells affects proliferation, survival, and interphase NuMA localization. *J. Cell. Biochem.* 114, 823–830 (2013).
239. Tree, D. R. P. et al. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* 109, 371–381 (2002).
240. Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset, A. & Penzo-me, A. The C-cytoplasmic Lys-Thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/B-catenenin signaling. 19, (2000).
241. Usui, T. et al. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* 98, 585–595 (1999).
242. Vaidžiulyte, K., Coppey, M. & Schauer, K. Intracellular organization in cell polarity – placing organelles into the polarity loop. *J. Cell Sci.* 132, 1–9 (2019).
243. Vigneron, S. et al. Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev. Cell* 45, 637–650.e7 (2018).

244. Wang, H., Ouyang, Y., Somers, W. G., Chia, W. & Lu, B. Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* 449, 96–100 (2007).
245. Wang, H., Cai, Y., Chia, W. & Yang, X. Drosophila homologs of mammalian TNF/TNFR-related molecules regulate segregation of Miranda/Prospero in neuroblasts. *EMBO J.* 25, 5783–5793 (2006).
246. Wang, Y. & Nathans, J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: New insights and new questions. *Development* 134, 647–658 (2007).
247. Warrington, S. J., Strutt, H., Fisher, K. H. & Strutt, D. A Dual Function for Prickle in Regulating Frizzled Stability during Feedback-Dependent Amplification of Planar Polarity. *Curr. Biol.* 27, 2784–2797.e3 (2017).
248. Weber, U. & Mlodzik, M. APC/CFzr/Cdh1-Dependent Regulation of Planar Cell Polarity Establishment via Nek2 Kinase Acting on Dishevelled. *Dev. Cell* 1–14 (2016). doi:10.1016/j.devcel.2016.12.006
249. Wee, B., Johnston, C. A., Prehoda, K. E. & Doe, C. Q. Canoe binds RanGTP to promote pinsTPR/Mud-mediated spindle orientation. *J. Cell Biol.* 195, 369–376 (2011).
250. Westendorf, J. M., Swenson, K. I. & Ruderman, J. V. The role of cyclin B in meiosis I. *J. Cell Biol.* 108, 1431–1444 (1989).
251. Wianny, F. et al. G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 212, 49–62 (1998).
252. Williams, S. E., Beronja, S., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature* 470, 353–358 (2011).
253. Winter, C. G. et al. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81–91 (2001).
254. Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. & Knoblich, J. A. Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell* 135, 161–173 (2008).
255. Wolff, T. & Rubin, G. M. strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. *Development* 125, 1149–1159 (1998).
256. Wolgemuth, D. J., Lele, K. M., Jobanputra, V. & Salazar, G. The A-type cyclins and the meiotic cell in mammalian male germ cells. *Int. J. Androl.* 27, 192–199 (2004).
257. Wong, H. C. et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell* 12, 1251–60 (2003).
258. Wong, L. L. & Adler, P. Tissue Polarity Genes of Drosophila Regulate the Subcellular Location for Prehair Initiation in Pupal Wing Cells. *J. Cell Biol.* 123, 209–221 (1993).
259. Wu, G., Huang, X., Hua, Y. & Mu, D. Roles of planar cell polarity pathways in the development of neutral tube defects. *J. Biomed. Sci.* 18, 1–10 (2011).
260. Wu, J., Jenny, A., Mirkovic, I. & Mlodzik, M. Frizzled-Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in Drosophila. *Mech. Dev.* 125, 30–42 (2008).
261. Yam, C. H., Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 59, 1317–1326 (2002).
262. Yamano, H. APC/C: current understanding and future perspectives. *F1000Research* 8, 1–15 (2019).
263. Yamashita, Y. M. & Fuller, M. T. Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *J. Cell Biol.* 180, 261–266 (2008).
264. Yan, J. et al. The multiple-wing-hairs gene encodes a novel GBD-FH3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics* 180, 219–228 (2008).
265. Yanfeng, W. A. et al. Functional dissection of phosphorylation of Dishevelled in Drosophila. *Dev. Biol.* 360, 132–142 (2011).
266. Yu, F. et al. A mouse homologue of Drosophila pins can asymmetrically localize and substitute for pins function in Drosophila neuroblasts. *J. Cell Sci.* 116, 887–896 (2003).

267. Yuan, H., Chiang, C.-Y. A., Cheng, J., Salzmann, V. & Yamashita, Y. M. Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells. *Dev. Biol.* 361, 57–67 (2012).
268. Yuan, K. & O'Farrell, P. H. Cyclin B3 is a mitotic cyclin that promotes the metaphase-anaphase transition. *Curr. Biol.* 25, 811–816 (2015).
269. Zakaria, S. et al. Regulation of Neuronal Migration by Dchs1-Fat4 Planar Cell Polarity. *Curr. Biol.* 24, (2014).
270. Zallen, J. A. Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* 129, 1051–1063 (2007).
271. Zhang, L. et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration. *Nat. Commun.* 7, (2016).
272. Zhang, S., Tischer, T. & Barford, D. Cyclin A2 degradation during the spindle assembly checkpoint requires multiple binding modes to the APC/C. *Nat. Commun.* 10, (2019).
273. Zhou, Z., He, M., Shah, A. A. & Wan, Y. Insights into APC/C: From cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div.* 11, 1–18 (2016).

Résumé

Durant une division asymétrique (ACD), cycle et polarité cellulaires se coordonnent pour servir la diversité cellulaire. Dans le cas d'une ACD au sein d'un épithélium, la Polarité Cellulaire Planaire, menée par Frizzled (Fz) et Dishevelled (Dsh), oriente la cellule mère et le fuseau mitotique et induit une polarité qui va permettre l'alignement et la répartition des déterminants cellulaires entre les cellules filles. Dans ce contexte, mon sujet de thèse vise à étudier les liens entre cycle et polarité dans le modèle du lignage des soies de la drosophile, où depuis l'ACD de la cellule précurseur pI, quatre destins cellulaires distincts émergent. À chaque division, la voie Notch est différenciellement activée et la PCP régule les orientations stéréotypées des divisions dans le plan de l'épithélium.

Au sein de la division de la cellule pI, j'ai pu mettre en exergue que l'un des acteurs majeurs du cycle cellulaire, la Cycline A faisait ce lien. En effet, j'ai observé qu'une portion de Cycline A se localisait asymétriquement au cortex apical postérieur de pI en prophase. Cette portion de Cycline A est dégradée en même temps que la portion cytoplasmique. Ensuite j'ai montré que Cycline A colocalisait avec les facteurs de la PCP, Fz et Dsh, que ceux-ci lui servaient d'ancre au cortex: la perte de fonction *dsh* ou *fz* empêche le recrutement de Cycline A au cortex et la délocalisation forcée de Frizzled entraîne aussi celle de Cycline A. Aussi, Cycline A influence sur l'orientation du fuseau mitotique comme Frizzled et Dsh par la perte de fonction *cycline A* ou l'expression d'une Cycline A ectopique au cortex. Ceci suggère que Cycline A fait partie du complexe formé par Fz et Dsh régulant l'orientation du fuseau. Ce rôle dans l'orientation de la division a été montré par un le recrutement au cortex apical postérieur de la protéine Mud (NuMA/LIN-5).

Ce travail de thèse ouvre la porte sur les rôles encore peu connus des facteurs de cycle dans d'autres processus biologiques.

Abstract

During an asymmetric cell division (ACD), the cell cycle and cell proliferation are coordinated to serve cell fate diversity. In the case of an ACD occurring in epithelia, the Planar Cell Polarity, lead by Frizzled (Fz) and Dishevelled (Dsh) orients the mother cell and the mitotic spindle to induce a polarity upon which the cell fate determinants are asymmetrically divided between the daughter cells. In this context, my thesis subject relies on the study of the links between cell cycle and cell polarity in the model of the lineage of mechanosensory organs of *Drosophila*, from which four distinct cell fates rise. At each division, the Notch pathway is asymmetrically activated and the PCP regulates the stereotyped orientations of the divisions along the epithelial plan.

During the ACD of the pI cell, I have shown that one of these links was the major actor the cell cycle Cyclin A. Indeed, I have shown that a pool of Cyclin A localises asymmetrically the apical posterior cortex of the pi cell during prophase. This portion of Cyclin A is degraded at the same time of the cytoplasmic pool. Then, I have shown that Cyclin A co-localised with the PCP factor Fz and Dsh, as they anchors CycA to the cortex: a *fz* or *dsh* loss of function (LOF) abolishes the cortical recruitment of Cyclin A and the delocalisation of Frizzled drags Cyclin A. More importantly, I have shown that Cyclin A also regulates the orientation of the division as PCP factors, as its LOF or ectopic cortical localisation deviated the orientation. Altogether this data suggest that Cyclin A is part of complex regulating the spindle orientation formed by Fz and Dsh. In order to do so, Cyclin A is required for the apical posterior recruitment of the Mud protein (NuMA/LIN-5).

This work opens the door on the roles, poorly described, of the cells cycle factors in other biological processes.