



HAL
open science

Cycline G et le maintien de l'homéostasie des tissus au cours du développement chez *drosophila melanogaster*

Camille Dupont

► **To cite this version:**

Camille Dupont. Cycline G et le maintien de l'homéostasie des tissus au cours du développement chez *drosophila melanogaster*. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066556 . tel-01327973

HAL Id: tel-01327973

<https://theses.hal.science/tel-01327973>

Submitted on 7 Jun 2016

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

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

Université Pierre et Marie Curie

ED 515 Complexité du Vivant

IBPS - UMR7622 Laboratoire de Biologie du Développement UPMC CNRS

Equipe Contrôle épigénétique de l'homéostasie et de la plasticité du développement

CYCLINE G ET LE MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE DES TISSUS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Par Camille Dupont

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Neel Randsholt

Présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr Isabelle Guénaï	Maître de Conférences	Rapporteur
Pr François Karch	Professeur	Rapporteur
Pr Nathalie Dostatni	Professeur	Examineur
Dr Frédérique Peronnet	DR CNRS	Examineur
Dr Juliette Salvaing	CR INRA	Examineur
Dr Neel Randsholt	CR CNRS	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

I	Introduction	5
1	Contrôle de la taille finale des organes chez <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.1	Le modèle d'étude <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2	Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération.....	9
1.2.1	Contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK	11
1.2.2	Régulation de l'activité des complexes Cycline/CDK	12
1.3	Contrôle de la croissance des organes au cours du développement	13
1.3.1	Implication de Myc dans le contrôle de la croissance cellulaire.....	13
1.3.2	Régulation de la croissance des organes par la voie Insuline/TOR.....	14
1.3.3	Contrôle de la taille finale des tissus par la voie Hippo	17
1.4	Survie cellulaire et apoptose.....	20
1.4.1	Les caspases, effecteurs de l'apoptose	20
1.4.2	Régulation de l'activité des caspases.....	21
1.4.3	Apoptose régulée par la voie JNK	23
1.5	Prolifération et organisation du disque imaginal d'aile : rôles de Dpp et Wg.....	25
2	Processus de maintien de l'homéostasie tissulaire	31
2.1	La compétition cellulaire	31
2.1.1	Découverte de la compétition cellulaire induite par les mutations <i>Minute</i>	31
2.1.2	Une grande diversité de contextes induisent de la compétition cellulaire	33
2.1.3	Signaux impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules perdantes	37
2.1.4	Quel rôle pour la compétition cellulaire dans l'homéostasie des tissus ?..	38

2.2	La stabilité du développement.....	41
2.2.1	La stabilité du développement, ou le contrôle du bruit développemental	41
2.2.2	L'asymétrie fluctuante, une estimation de la stabilité du développement dans une population	43
2.2.3	Mesure de l'asymétrie fluctuante.....	44
2.2.4	Bases génétiques de la stabilité du développement	44
3	Le maintien des identités cellulaires par les complexes Polycomb et trithorax.....	49
3.1	Les gènes PcG et trxG sont impliqués dans le maintien de l'expression des gènes.....	49
3.2	Les protéines des groupes Polycomb, trithorax et Enhancers de Trithorax et Polycomb.....	52
3.2.1	Le groupe Polycomb.....	52
3.2.2	Le groupe trithorax	55
3.2.3	Les Enhancers de Trithorax et Polycomb.....	56
3.3	Rôles des gènes PcG et trxG dans l'homéostasie des tissus	60
4	Cycline G de <i>Drosophila melanogaster</i> , un acteur du maintien de l'homéostasie tissulaire	63
4.1	Les cyclines de type G de mammifère.....	63
4.1.1	Régulation de Cycline G1 et G2.....	63
4.1.2	Rôle des Cyclines G1 et G2 au cours du cycle cellulaire	65
4.1.3	Rôle des Cyclines G dans la réponse aux lésions de l'ADN	67
4.2	Cycline G de <i>Drosophila melanogaster</i> , un régulateur du cycle cellulaire ..	69
4.2.1	Cycline G, homologue des cyclines de type G chez la drosophile	69
4.2.2	Rôle de Cycline G au cours du cycle cellulaire	71
4.2.3	Rôle de Cycline G dans la réparation des cassures double brin induites par la recombinaison méiotique.....	73

4.3	Cycline G, un acteur majeur de la stabilité du développement.....	77
4.4	Cycline G, un partenaire de l'Enhancer de Trithorax et Polycomb Corto ...	79
5	Présentation du projet de thèse.....	83
II	Résultats	85
1	Cycline G et le maintien des identités cellulaires au cours du développement.....	85
1.1	Présentation de l'article	85
1.2	Article : <i>Drosophila</i> Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development.....	86
2	Cycline G, homéostasie tissulaire et stabilité du développement.....	87
2.1	Bases génétiques de la stabilité du développement.....	87
2.1.1	Crible de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats	89
2.1.2	Crible à l'échelle du génome pour rechercher des gènes impliqués dans la stabilité du développement.....	109
2.2	La compétition cellulaire, un garant de la stabilité du développement ?	113
III	Discussion et perspectives	121
1	Rôle de Cycline G dans le maintien des identités cellulaires	121
2	Apports des cribles de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement.....	122
3	Compétition cellulaire et stabilité du développement	127
	Références bibliographiques	131

I INTRODUCTION

Un équilibre entre prolifération, croissance et mort cellulaire est indispensable à l'homéostasie des tissus, et à la formation d'organes fonctionnels. De plus, la différenciation des cellules au sein d'un tissu et le maintien des identités cellulaires acquises au cours du développement sont également des éléments clés de l'homéostasie tissulaire. Ces différents mécanismes sont finement régulés au cours du développement, ainsi qu'en réponse à des contraintes environnementales ou à des perturbations qui peuvent affecter la formation des organes.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à des processus de maintien de l'homéostasie tissulaire chez *Drosophila melanogaster*, un organisme modèle pour lequel ils sont bien décrits, tant au niveau génétique que moléculaire. En particulier, j'ai analysé le rôle de Cycline G, une protéine impliquée dans plusieurs de ces processus : le contrôle de la croissance cellulaire et de la prolifération, mais aussi le maintien des identités cellulaires, ainsi que la stabilité du développement, un processus qui permettrait le maintien de l'homéostasie tissulaire en contrôlant les variations stochastiques qui affectent le développement.

Dans cette introduction, j'ai choisi de décrire tout d'abord les mécanismes généraux de contrôle de la prolifération, de la croissance et de la survie cellulaire. Puis je décrirai certains processus qui assurent l'homéostasie des tissus au cours du développement. Dans une troisième partie, j'aborderai les mécanismes de maintien des identités cellulaires au cours du développement par les protéines chromatinienne des groupes Polycomb et trithorax. Enfin, je détaillerai plus particulièrement l'implication de Cycline G de *Drosophila melanogaster* dans la régulation du cycle cellulaire, dans le maintien des identités cellulaires et dans la stabilité du développement.

1 **Contrôle de la taille finale des organes chez *Drosophila melanogaster***

Au cours du développement, la forme, la taille et l'identité des tissus sont finement régulées afin de permettre la formation d'organes fonctionnels. Ces mécanismes impliquent une coordination entre la prolifération des cellules et leur croissance, c'est-à-dire l'augmentation de masse. Un premier niveau de régulation permet l'organisation des cellules au sein du tissu et implique des interactions à faible distance entre les cellules. De plus, des signaux systémiques, tels que les hormones, assurent la synchronisation du développement et l'harmonisation de la taille finale des différents organes d'un même individu. Le développement intègre ainsi des signaux extrinsèques, permettant une adaptation de l'organisme à son environnement, en fonction par exemple de la température, de l'abondance de nutriments ou de la densité de population du milieu.

Dans cette partie, je commencerai par décrire le développement de *Drosophila melanogaster*, un organisme modèle dont l'étude a largement contribué à l'établissement des connaissances actuelles sur la régulation de la taille finale des organes et sur l'homéostasie des tissus. Puis je décrirai différents niveaux de régulation de la taille des organes : le contrôle de la prolifération cellulaire, la régulation de la croissance des organes et enfin la balance entre survie et mort cellulaire au cours du développement.

1.1 **Le modèle d'étude *Drosophila melanogaster***

La drosophile est un insecte holométabole : son développement présente trois phases larvaires (L1 à L3), suivies d'une phase immobile (pupe) durant laquelle a lieu la métamorphose, qui aboutit à la formation de l'individu adulte, ou imago. La durée du cycle de développement de la drosophile varie en fonction de la température : elle est par exemple de 10 jours à 25°C et de 20 jours à 18°C. A 25°C, les stades larvaires débutent 24h après la ponte des œufs. Les deux premiers stades larvaires durent chacun 24h, tandis que le troisième stade dure 48h.

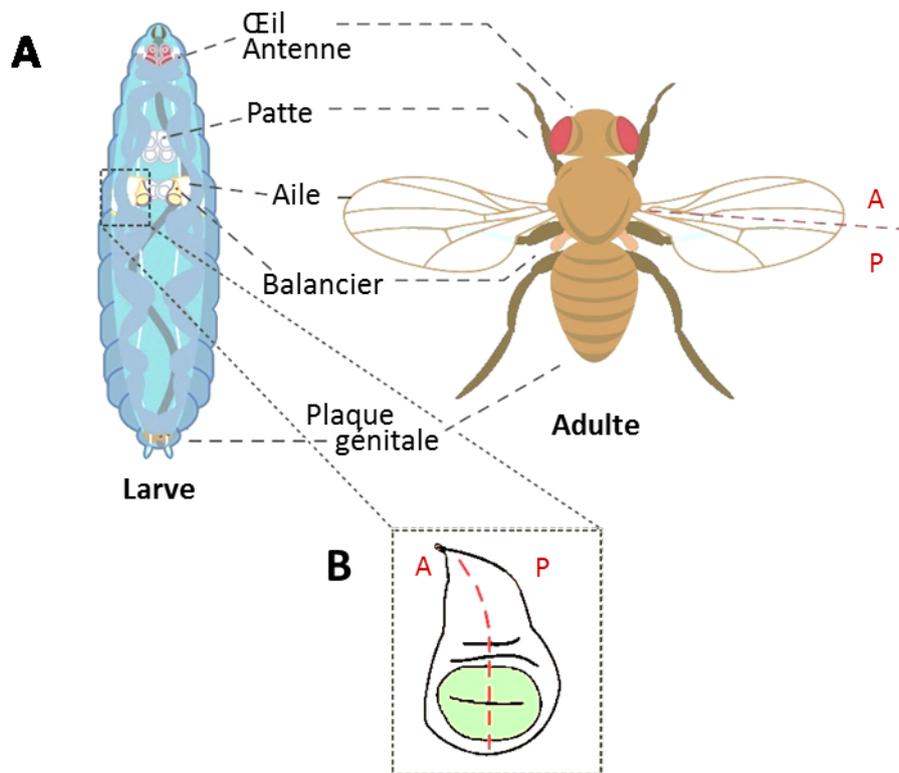


Figure 1. Les disques imaginaux, tissus larvaires précurseurs des structures adultes

- (A) Les structures de l'adulte sont issues de groupes de cellules déterminées dès l'embryogenèse, qui présentent une forte prolifération au cours de la vie larvaire. Pendant la métamorphose, chacun des disques se différencie en un appendice spécifique (oeil, antenne, patte, aile, balancier, plaque génitale).
- (B) Les disques imaginaux sont divisés en compartiments, représentant des lignages cellulaires distincts. Sur cet exemple est représentée la frontière (pointillées rouges) entre les compartiments antérieur (A) et postérieur (P) d'un disque imaginal d'aile. La poche de l'aile (en vert) est le territoire du disque d'aile qui donnera la lame de l'aile adulte.

(Adapté de Restrepo *et al.*, 2014)

Les larves présentent des tissus dits imaginaux, composés de cellules diploïdes et qui sont les précurseurs des structures adultes (Figure 1). Ces disques imaginaux sont issus de groupes de cellules déterminées durant l'embryogenèse. Ils présentent une prolifération très intense pendant le développement larvaire, et voient leur nombre de cellules multiplié par un facteur 1000 environ en 4 jours. Simultanément, les cellules acquièrent leur identité, mais la différenciation n'a lieu qu'à la fin de la vie larvaire ou durant la métamorphose.

A la fin du troisième stade larvaire, les larves s'éloignent de la source de nourriture et s'immobilisent pour former une puppe. Au cours de la métamorphose, une partie des tissus larvaires subissent une histolyse, tandis que les tissus imaginaux se réorganisent et se différencient afin de former les structures de l'adulte. A l'issue d'une pupaison de 5 jours, l'adulte émerge de la puppe.

La rapidité du cycle de vie de la drosophile, sa petite taille, la conservation d'un grand nombre de processus biologiques et la richesse des outils disponibles en font un modèle de choix en génétique et en biologie du développement, particulièrement adapté à l'étude du maintien de l'homéostasie des tissus. Par exemple, l'aile de drosophile est un modèle d'étude qui a largement contribué à la compréhension actuelle des mécanismes impliqués dans le contrôle de la taille des organes. Cet appendice, plan et facilement observable chez la drosophile adulte, a permis de réaliser des cribles d'identification de mutations affectant la taille ou la morphologie des organes. Ces recherches ont abouti à la caractérisation de différents gènes et voies de signalisation impliqués dans la régulation de la taille finale des organes, dont un grand nombre sont conservés chez les vertébrés.

1.2 Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération

Le cycle cellulaire désigne une succession d'étapes finement régulées permettant l'augmentation du nombre de cellules par division, ou prolifération cellulaire. Le cycle cellulaire canonique est composé d'une phase de synthèse de matériel génétique (phase S), pendant laquelle l'ADN est répliqué, et d'une phase de mitose (phase M) précédées respectivement des phases de croissance G1 et G2 (Figure 2). Des variations du cycle cellulaire sont observées à différentes étapes du développement ou dans certains tissus.

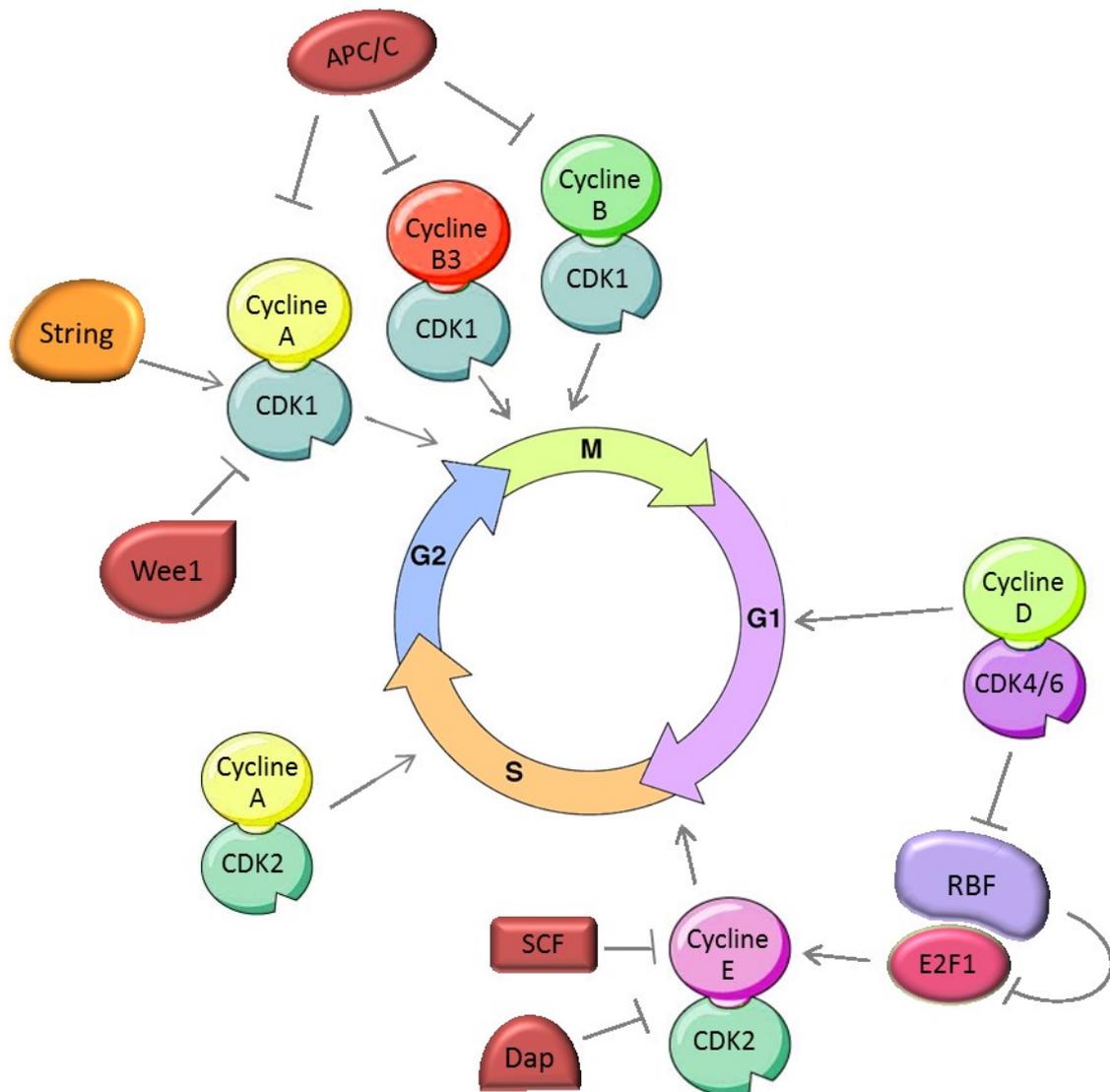


Figure 2. Régulation du cycle cellulaire chez *Drosophila melanogaster*

L'entrée en phase S requiert la phosphorylation de RBF par Cycline D/CDK4/6, ce qui lève l'inhibition de E2F1, un facteur de transcription dont les gènes cibles (tels que *CycE*) sont impliqués dans l'entrée en phase S. Dacapo/p27 (Dap) est également impliquée dans le contrôle de la transition G1/S, en inhibant l'activité de Cycline E/CDK2.

Le complexe Cycline A/CDK2 régule la progression de la phase S. Puis Cycline A s'associe à CDK1 lors de la phase G2. La kinase Wee1 inhibe CDK1 pendant la phase G2.

La phosphatase String/Cdc25 permet le retour de CDK1 à un état actif. CDK1 est successivement associée aux cyclines mitotiques A, B3 et B afin de permettre l'entrée en phase M et la progression de la mitose.

La présence des cyclines lors de phase spécifiques du cycle cellulaire est finement régulée. Le complexe ubiquitine ligase SCF est impliqué dans la dégradation de Cycline E. Le complexe APC/C (Anaphase promoting complex/Cyclosome) dégrade les cyclines mitotiques afin de permettre la sortie de mitose.

Par exemple, au début du développement embryonnaire de la drosophile, la formation des cellules est précédée d'une étape de syncytium, une phase où seuls les noyaux se divisent par une succession de phases S et M sans divisions cellulaires (Lee and Orr-Weaver, 2003).

1.2.1 Contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK

La régulation de la progression des différentes phases du cycle cellulaire est assurée par une activation séquentielle de complexes kinase spécifiques composés de deux protéines : une kinase cycline-dépendante (CDK) et une sous-unité activatrice de la famille des cyclines (Lim and Kaldis, 2013). Les CDK sont des sérine-thréonine kinases qui comportent un cœur catalytique, composé d'une poche de liaison de l'ATP, d'un domaine de liaison aux cyclines et d'une boucle T activatrice (Lim and Kaldis, 2013).

Les protéines de la famille des cyclines présentent une grande diversité de séquence et de fonction. Elles ont en commun la présence d'un domaine d'une centaine d'acides aminés, la cyclin box, qui est impliqué dans l'interaction avec les CDK (Gopinathan et al., 2011). Chez la drosophile, 13 cyclines ont été identifiées et classées en différents sous-groupes en fonction de leurs similitudes de structure. Les cyclines A, B, D et E sont directement impliquées dans la progression du cycle cellulaire. D'autres cyclines possèdent des rôles indépendants du cycle cellulaire, en association ou non avec des CDK, tels que la régulation de la transcription, la spermatogenèse, le renouvellement des cellules souches ou le métabolisme (Lim and Kaldis, 2013).

La Cycline D s'associe à CDK4/6 afin de réguler la progression de la phase G1. L'entrée en phase S requiert la phosphorylation de RBF (Retinoblastoma family protein) par Cycline D/CDK4/6. Cela lève l'inhibition de E2F1, un facteur de transcription dont les gènes cibles (tels que *CycE*) sont impliqués dans l'entrée en phase S, une étape qui requiert la formation du complexe Cycline E/CDK2. Le complexe Cycline A/CDK2 régule ensuite la progression de la phase S. Enfin, CDK1 est associée successivement aux cyclines A, B3 et B, afin de contrôler l'entrée en phase M (Figure 2).

1.2.2 Régulation de l'activité des complexes Cycline/CDK

L'activation séquentielle des complexes Cycline/CDK, nécessaire à la progression des différentes phases du cycle cellulaire, doit être finement régulée. Un premier niveau de contrôle s'effectue par la régulation de la présence des différentes cyclines lors des phases du cycle cellulaire (Figure 2). Ce contrôle temporel de la présence des cyclines est exercé au niveau transcriptionnel mais également *via* une dégradation rapide des protéines à des moments précis du cycle cellulaire. En effet, les cyclines doivent leur nom à la variation de leur niveau protéique au cours du cycle cellulaire, puisque les cyclines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire sont produites de façon cyclique au cours de phases spécifiques.

Par exemple, les cyclines D et E possèdent une séquence PEST (séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)) impliquée dans leur dégradation ubiquitine-dépendante. Ainsi le complexe SCF (SKP1/Cullin/F-box protein) qui possède une activité ubiquitine ligase, est impliqué dans la dégradation de Cycline E (Moberg et al., 2001). D'autres cyclines, telles que Cycline A et B, présentent des séquences de dégradation nommées « cyclin destruction box » qui sont ubiquitinylées par le complexe APC/C (Anaphase promoting complex/Cyclosome) et permettent ainsi leur dégradation au cours de la mitose (Huang and Raff, 2002).

Le niveau de phosphorylation des CDK est également impliqué dans la régulation de l'activité des complexes Cycline/CDK. Par exemple, la phosphorylation de la boucle T par les CDK-activating kinases (CAK) est une étape clé de l'activation des complexes Cycline/CDK chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Pavletich, 1999). A l'inverse, la phosphorylation de résidus du domaine de liaison à l'ATP par les kinases de la famille Wee1 inhibe l'activité enzymatique des CDK (Campbell et al., 1995). La kinase Wee1 inhibe ainsi CDK1 pendant la phase G2. La phosphatase String/Cdc25 permet le retour de CDK1 à un état actif et l'entrée en mitose en retirant ces phosphorylations (Edgar and O'Farrell, 1989).

Enfin, la régulation de l'activité des CDK au cours du cycle cellulaire fait également intervenir des inhibiteurs de CDK (CKI). D'une part, les CKI de la famille Cip/Kip inhibent l'activité kinase en s'associant aux complexes Cycline/CDK (Lane et al., 1996; de Nooij et al., 1996). Par exemple, Dacapo/p27 (Dap) est impliquée dans le contrôle de la transition G1/S,

en inhibant l'activité de Cycline E/CDK2. D'autre part, la CKI Roughex (Rux) empêche l'activation de CDK1 et l'entrée en mitose en interagissant avec Cycline A (Foley et al., 1999).

L'ensemble de ces mécanismes de contrôle de l'activité des complexes Cycline/CDK aux différentes phases du cycle cellulaire permet une régulation précise de ce cycle. De plus, ces différents acteurs de la régulation du cycle cellulaire peuvent être mis en jeu afin de moduler la prolifération en réponse à différents signaux. Par exemple, la présence de lésions de l'ADN entraîne un arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation des cassures. De manière intéressante, la prolifération cellulaire au sein des disques imaginaux dépend aussi de facteurs qui sont essentiels pour l'organisation de chacun des futurs organes. C'est notamment le cas pour les morphogènes Wg (Wingless) et Dpp (Decapentaplegic) dans le disque imaginal d'aile, dont je traiterai au paragraphe 1.5 de cette introduction.

1.3 Contrôle de la croissance des organes au cours du développement

La croissance des organes est finement régulée au cours du développement. En effet, la formation d'un organisme correctement proportionné nécessite une coordination de la croissance des différents organes. De plus, la croissance peut s'adapter aux conditions environnementales telles que l'abondance de nutriments. Je décrirai ici certains mécanismes impliqués dans cette régulation : la régulation de la croissance cellulaire par le proto-oncogène Myc, le contrôle de la croissance et du métabolisme par la voie Insuline/TOR et le rôle de la voie Hippo dans la taille finale des organes.

1.3.1 Implication de Myc dans le contrôle de la croissance cellulaire

L'augmentation de la taille des organes requiert une augmentation du nombre de cellules, mais également une augmentation de la masse des cellules. Cette croissance cellulaire nécessite une régulation de la synthèse protéique et du métabolisme des cellules. Un facteur clé dans la régulation de la croissance cellulaire est la protéine Myc, qualifiée de

proto-oncogène en raison de sa surexpression dans de nombreux types de cancers. Chez la drosophile, elle est codée par le gène *dm* (*diminutive*) porté par le chromosome X (Gallant, 2006). Les femelles adultes homozygotes pour *dm^{po}*, un allèle hypomorphe faible de *dm*, présentent une taille réduite mais sont correctement proportionnées. Elles ont également un retard de développement, et des soies courtes et fines. Ce faisceau de phénotypes est similaire au phénotype « Minute » (Morata and Ripoll, 1975), induit par les mutations de gènes codant des protéines ribosomiques, qui ralentissent le développement en raison d'une diminution de la synthèse protéique (Marygold et al., 2007). Les cellules du disque d'aile de mouches mutantes pour *dm* présentent une croissance cellulaire réduite, détectable par une diminution de taille des cellules tout au long du développement (Johnston et al., 1999). A l'inverse, la surexpression de *dm* induit une augmentation de la croissance cellulaire et une accélération de la phase G1, qui n'affecte cependant pas la prolifération cellulaire puisqu'elle est compensée par un allongement de la phase G2 (Johnston et al., 1999). Cela aboutit à une augmentation de la taille des cellules, et à des mouches adultes présentant une augmentation de taille de 30% (la Cova et al., 2004).

Myc est impliquée dans la régulation de la croissance des tissus, de la prolifération et de l'apoptose. Elle forme avec la protéine Max des hétérodimères qui activent la transcription de leurs gènes cible. A l'inverse, lorsque Max interagit avec Mad/Mnt, elle exerce un rôle de répresseur au niveau des mêmes cibles, s'opposant ainsi à la fonction de Myc. L'analyse des sites de fixation de Myc:Max et l'étude du transcriptome de cellules dans lesquelles *dm* est dérégulé montrent qu'un grand nombre des cibles transcriptionnelles de Myc sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes, la traduction et la régulation du métabolisme (Orion et al., 2003; Hulf et al., 2005; Grewal et al., 2005).

1.3.2 Régulation de la croissance des organes par la voie Insuline/TOR

La perception de l'abondance de nutriments dans l'environnement est essentielle pour adapter la croissance de l'organisme aux ressources disponibles. De plus, chez les organismes pluricellulaires, la croissance de chaque cellule doit être coordonnée avec celle des cellules du même tissu, et en adéquation avec la croissance du reste de l'organisme,

grâce à une régulation systémique. Ces deux niveaux de régulation de la croissance des organes font intervenir les voies hautement conservées InR (Insulin Receptor) et TOR (Target of rapamycin) (Oldham and Hafen, 2003; Grewal, 2009) (Figure 3).

Les mutations affectant la voie TOR chez la drosophile induisent des phénotypes similaires à ceux observés dans des conditions de privation de nourriture, à savoir une taille réduite de l'organisme due à une diminution du nombre et de la taille des cellules. C'est le cas notamment d'allèles hypomorphes de *Tor* et de *s6k* (ribosomal protein S6 kinase), une cible de la voie TOR (Oldham et al., 2000; Montagne et al., 1999). La kinase TOR contrôle de façon autonome cellulaire de nombreux processus limitants pour la division et la croissance cellulaire. Par exemple, TOR régule positivement la biogenèse des ribosomes, en favorisant l'activité de TIF-IA (transcription initiation factor IA), impliquée dans la synthèse des ARN ribosomiques (Grewal et al., 2007) et de S6K (ribosomal protein S6 kinase) (Grewal, 2009). D'autre part, TOR favorise l'initiation de la traduction en régulant négativement 4E-BP/Thor (eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E)-binding protein), un inhibiteur de l'initiateur de la traduction eIF4E (Hietakangas and Cohen, 2009). La voie TOR peut être activée en réponse à l'abondance de nutriments, en fonction du statut énergétique de la cellule, ou encore par la voie du récepteur de l'insuline (InR) (De Virgilio and Loewith, 2006).

La voie InR régule la croissance et le métabolisme en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme (Figure 3). Chez la drosophile, le récepteur de l'insuline est activé par liaison des ILP (insulin-like peptides) circulants, qui sont les orthologues structurels et fonctionnels de l'insuline et des IGF (insulin growth factor) de mammifère (Brogiolo et al., 2001). L'activation de InR permet le recrutement de la protéine adaptatrice Chico/IRS (insulin receptor substrate) et l'activation de la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (également appelée PKB pour Protéine kinase B) (Grewal, 2009). Une des cibles de cette voie est le facteur de transcription FOXO (Forkhead box class O) dont la phosphorylation par Akt empêche la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle (Burgering, 2008). Les facteurs de transcription de la famille FOXO sont conservés au cours de l'évolution, et ils sont impliqués dans la régulation négative de la croissance, de la prolifération et de la survie cellulaire, et dans la résistance au stress. Chez *D. melanogaster*, FOXO promeut notamment la transcription de *4E-BP* (Jünger et al., 2003; Puig et al., 2003), et réprime les gènes *dm* et *dilp2* (Puig and Mattila, 2010).

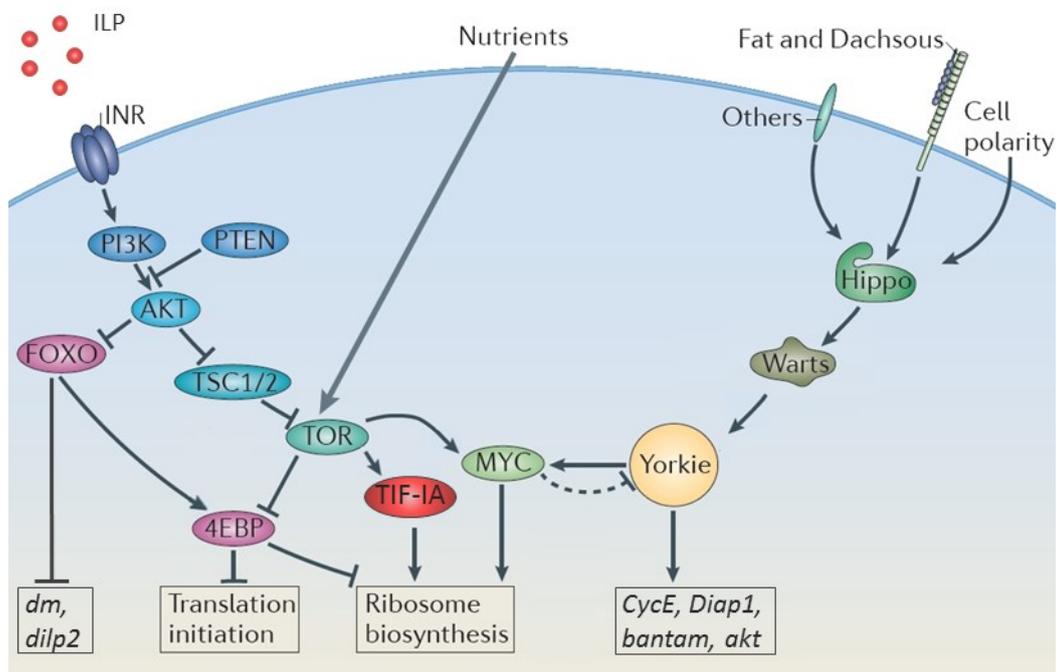


Figure 3. La voie Insuline/TOR

A gauche : La voie de l'insuline/TOR (Target of Rapamycin) agit sur des régulateurs de la synthèse protéique tels que Myc et l'inhibiteur de traduction 4E-BP (eukaryotic Initiation Factor 4E-binding protein).

L'activation du récepteur de l'insuline (InR) par la fixation des ILP (Insulin-like peptides) mène à l'activation de la kinase AKT par PI3K (phosphatidyl-inositol 3 kinase). AKT inhibe le facteur de transcription FOXO, qui régule négativement la croissance, notamment *via* la répression de *dm* et l'activation de 4E-BP. AKT a aussi pour cible le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2) qui inhibe le régulateur métabolique TOR. L'activité de TOR est également modulée en réponse à la présence de nutriments.

TOR promeut la biogenèse des ribosomes en activant Myc et TIF-IA (transcription initiator IA), qui sont impliquées dans la synthèse des protéines et ARN ribosomiques. TOR favorise également la synthèse protéique en réprimant 4E-BP.

A droite : La voie Insuline/TOR s'oppose dans la régulation de Myc à la voie Hippo, une voie qui régule négativement la croissance. (Adapté de Vincent et al., 2013)

Une diminution d'activation de la voie de signalisation InR, par exemple suite à une perte de fonction de *chico* ou à une diminution de l'activité PI3K, induit une diminution de la taille des mouches (Böhni et al., 1999; Britton et al., 2002). A l'inverse, les mutants du gène codant PTEN (phosphatase and tensin homolog), un suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie InR, présentent un excès de croissance tissulaire (Gao et al., 2000).

Les voies InR et TOR sont interconnectées à plusieurs niveaux, si bien qu'on les regroupe parfois sous le nom de voie Insuline/TOR (Figure 3). Par exemple, il a été montré que la régulation de la biogenèse des ribosomes par TOR est dépendante de Myc, et que *dm* est une cible directe de FOXO (Teleman et al., 2008). De plus l'activité de TOR est régulée par Akt (Hietakangas and Cohen, 2009). Finalement, FOXO converge également avec TOR dans la régulation de 4E-BP (Teleman et al., 2008). Le réseau d'effecteurs de la voie Insuline/TOR permet ainsi d'adapter le métabolisme cellulaire et la croissance des tissus à la quantité de nutriments disponibles au cours du développement.

1.3.3 Contrôle de la taille finale des tissus par la voie Hippo

Différentes expériences de transplantation et de greffe d'organes ont mis en évidence l'existence d'une régulation intrinsèque de la taille des organes. Par exemple, des disques imaginaux transplantés dans l'abdomen de femelles adultes continuent de se développer normalement et s'arrêtent de croître lorsque leur taille finale est atteinte (Bryant & Simpson 1984). Chez la drosophile, l'induction de cellules polyploïdes ou une altération du cycle cellulaire peuvent affecter la taille des cellules de l'aile, sans modifier la taille finale de l'aile adulte (Santamaria 1983, Weigmann 1997, Neufeld 1998). Une augmentation de la taille des cellules est compensée par une diminution du nombre de cellules et inversement, suggérant que la régulation se fait au niveau des dimensions finales de l'organe ou de la masse de tissu, plutôt qu'au niveau du nombre de divisions cellulaires. Quels sont les mécanismes permettant à l'organe de « sentir » que la taille finale est atteinte ? Une des voies qui semblent impliquées est la voie Hippo, identifiée lors de cribles ayant isolé des mutations induisant un excès de croissance (Edgar, 2006).

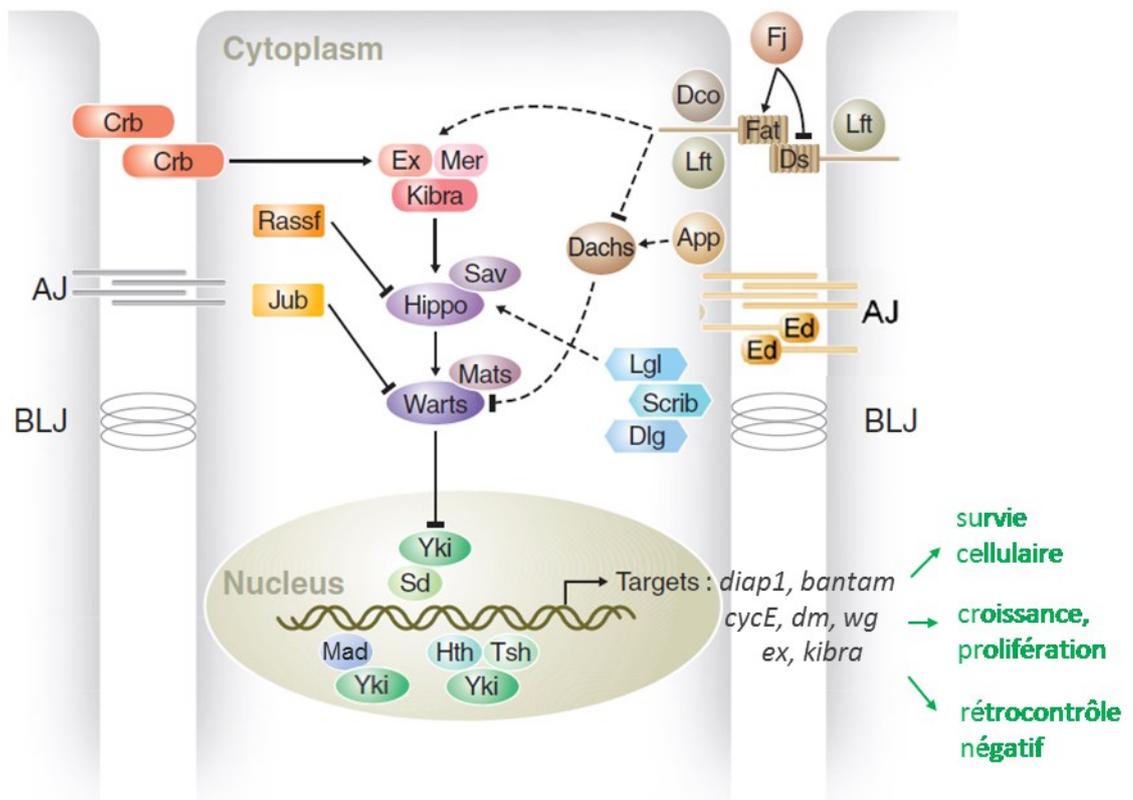


Figure 4. La voie Hippo

Au coeur de cette voie se trouvent les kinases Hippo et Warts et leurs cofacteurs Salvador (Sav) et Mob as tumor suppressor (Mats). Warts inhibe Yorkie (Yki) par phosphorylation. Dans le noyau, Yki active différents facteurs de transcription tels que Scalloped (Sd), Mothers against Dpp (Mad), Homothorax (Hth) et Teashirt (Tsh) pour promouvoir la croissance, la survie et la prolifération cellulaires.

En amont de Hippo et Warts, la voie est régulée par un grand nombre de protéines, notamment par le complexe Expanded (Ex), Merlin (Mer) et Kibra. L'activité de Ex est régulée par les cadhérines Fat et Crumbs (Crb).

AJ, jonction adhérente; App, Approximated; BLJ, jonction basolatérale; Dco, Discs overgrown; Dlg, Discs large; Ds, Dachsous; Ed, Echinoid; Fj, Four-jointed; Jub, Ajuba LIM protein; Lft, Lowfat; Lgl, Lethal giant larvae; Rassf, Ras-association family; Scrib, Scribble.

(Adapté de Halder and Johnson, 2011)

La voie Hippo contrôle la taille des organes en régulant négativement la croissance cellulaire, la prolifération et la survie (Figure 4). Les kinases Hippo (Hpo) et Warts (Wts), et les protéines adaptatrices Salvador (Sav) et Mob as tumor suppressor (Mats), agissent ensemble pour inactiver Yorkie (Yki) par phosphorylation (Huang et al., 2005). Yki est un coactivateur transcriptionnel qui, lorsqu'il est activé, est relocalisé dans le noyau où il s'associe avec divers facteurs de transcription, dont Scalloped (Sd) et Mad (Oh and Irvine, 2010). Yki promeut ainsi la prolifération, la croissance des tissus et la survie cellulaire en activant la transcription de gènes cibles tels que *cycE*, *dm*, le gène anti-apoptotique *Diap1* (Tapon et al., 2002) ou encore *bantam*, un miRNA qui a pour cibles l'ARNm du gène pro-apoptotique *hid* et l'ARNm de *mats* (Nolo et al., 2006; Zhang and Lai, 2013).

En amont de la voie Hippo se trouvent les activateurs Merlin (Mer), Expanded (Ex) et Kibra, qui stimulent l'activité de Hpo et Wts (Hamaratoglu et al., 2006; Yu et al., 2010). Ce sont également des cibles transcriptionnelles directes de Yki, établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie (Hamaratoglu et al., 2006).

La voie Hippo est modulée par différentes protéines impliquées dans les jonctions cellule-cellule, telles que Ajuba (Jub) et Echinoid (Ed), qui sont présentes au niveau des jonctions adhérentes (Thakur et al., 2010; Yue et al., 2012). De plus, la localisation apicale et l'abondance de Ex, essentielles pour le contrôle de la voie Hippo, sont régulées par les cadhérines Fat et Crumbs (Crb), deux protéines impliquées dans la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Bennett and Harvey, 2006; Chen et al., 2010; Ling et al., 2010). Enfin, une étude récente a montré que les tensions du cytosquelette régulent positivement la croissance des ailes et l'activité de Yki, grâce à l'inhibition de Wts par Jub (Rauskolb et al., 2014). Ces différents liens de la voie Hippo avec les jonctions cellule-cellule et des acteurs du cytosquelette d'actine suggèrent un rôle de cette voie de signalisation dans la régulation de la croissance en réponse à des changements de compression mécanique et d'étirement des tissus (Irvine and Harvey, 2015).

La voie Hippo est également interconnectée avec les autres voies de régulation de la croissance. En effet, il a été montré que la voie InR active Yorkie et que la croissance induite par PI3K requiert Yorkie (Straßburger et al., 2012). De plus, Yki est un activateur transcriptionnel de *akt* (Ye et al., 2012) (Figure 3). D'autre part, la voie Hippo interagit avec

les voies de signalisation des morphogènes Dpp et Wg, essentielles notamment pour la prolifération et le patterning du disque imaginal d'aile, puisque Mad est l'un des facteurs de transcription qui est coactivé par Yki (Figure 4), et que *wg* est l'une des cibles transcriptionnelles de Yki (Pan, 2010). Enfin, la voie Hippo est également impliquée dans la régulation de l'activité de Myc, Yki activant la transcription de *dm*. A l'inverse, un niveau élevé de Myc réprime l'expression de *yki* (Neto-Silva et al., 2010).

La prolifération et la croissance au sein d'un tissu sont donc finement régulées au cours du développement, par un ensemble de voies de signalisation fortement interconnectées. L'ensemble de ces mécanismes de régulation est nécessaire au maintien de l'homéostasie des tissus et à la formation d'organes fonctionnels.

1.4 Survie cellulaire et apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui exerce un rôle essentiel au cours du développement des métazoaires. Elle permet de sculpter les tissus au cours de la morphogenèse en éliminant certaines des cellules qui les composent. Chez la drosophile, l'apoptose est requise par exemple dans la rotation des organes génitaux mâles au cours de la morphogenèse (Kuranaga et al., 2011) et pour l'élimination des cellules épithéliales de l'aile après l'émergence. Elle est également impliquée dans l'élimination de structures larvaires, telles que les glandes salivaires, pendant la métamorphose (Denton et al., 2013). Au-delà de ce rôle développemental, l'apoptose est impliquée dans l'élimination de cellules anormales ou dangereuses pour l'organisme, par exemple en réponse à un stress génotoxique.

1.4.1 Les caspases, effecteurs de l'apoptose

L'apoptose est caractérisée par l'activation de caspases (Cysteinyl aspartate cleaving protease) et par une fragmentation de l'ADN. On distingue les caspases initiatrices qui présentent un long pro-domaine N-terminal, et qui activent par clivage une autre classe de caspases, dites effectrices. Le génome de *D. melanogaster* code sept caspases, dont trois

possèdent un long pro-domaine N-terminal : Dronc (Death regulator Nedd2-like caspase), Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like caspase) et Strica/Dream (Ser/Thr-rich caspase). Les quatre autres caspases, DrICE (Death related ICE-like caspase), Dcp-1 (Death caspase-1), Decay (Death executioner caspase related to Apopain/Yama) et Damm (Death associated molecule related to Mch2 caspase), ont un domaine N-terminal plus court et sont des caspases effectrices potentielles. Dronc, la caspase initiatrice principale chez *D. melanogaster*, possède un domaine CARD (Caspase activation and recruitment domain) et est l'orthologue de la Caspase 9 de mammifère. Son activation requiert sa dimérisation et le recrutement de la protéine adaptatrice Dark (Death-associated APAF-1-related killer) afin de former un complexe appelé apoptosome, qui permet le recrutement et l'activation des caspases effectrices (Figure 5). DrICE est la caspase effectrice principale chez la drosophile et un analogue fonctionnel de la Caspase 3 de mammifère.

1.4.2 Régulation de l'activité des caspases

En absence de signaux pro-apoptotiques, il est primordial d'empêcher une activation inappropriée des caspases afin de garantir la survie des cellules. Les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) DIAP1, DIAP2, Bruce (BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) et Deterin exercent ce rôle de garants de la survie cellulaire. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine BIR (Baculovirus inhibitory repeat) qui leur permet d'interagir avec les caspases. DIAP1 est l'IAP qui présente un rôle anti-apoptotique majeur chez la drosophile. En effet, la perte de fonction de *diap1* est suffisante pour induire une apoptose massive dans l'embryon (Wang et al., 1999). DIAP1 possède également un domaine RING qui lui confère une activité E3 ubiquitine ligase. Elle se lie à Dronc *via* son domaine BIR et l'ubiquitinyne, ce qui empêche l'activation de Dronc par Dark (Lee et al., 2011) (Figure 5).

Chez les mammifères, une voie majeure d'induction d'apoptose est la voie mitochondriale, ou intrinsèque, activée par exemple en réponse à des dommages cellulaires (stress oxydatif, cassures de l'ADN). Cette voie, qui fait intervenir la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), comporte des membres anti-apoptotiques, ainsi que des membres pro-apoptotiques qui perméabilisent la membrane mitochondriale. Cela permet le relargage dans le cytosol d'un composant essentiel de l'apoptosome, le cytochrome c.

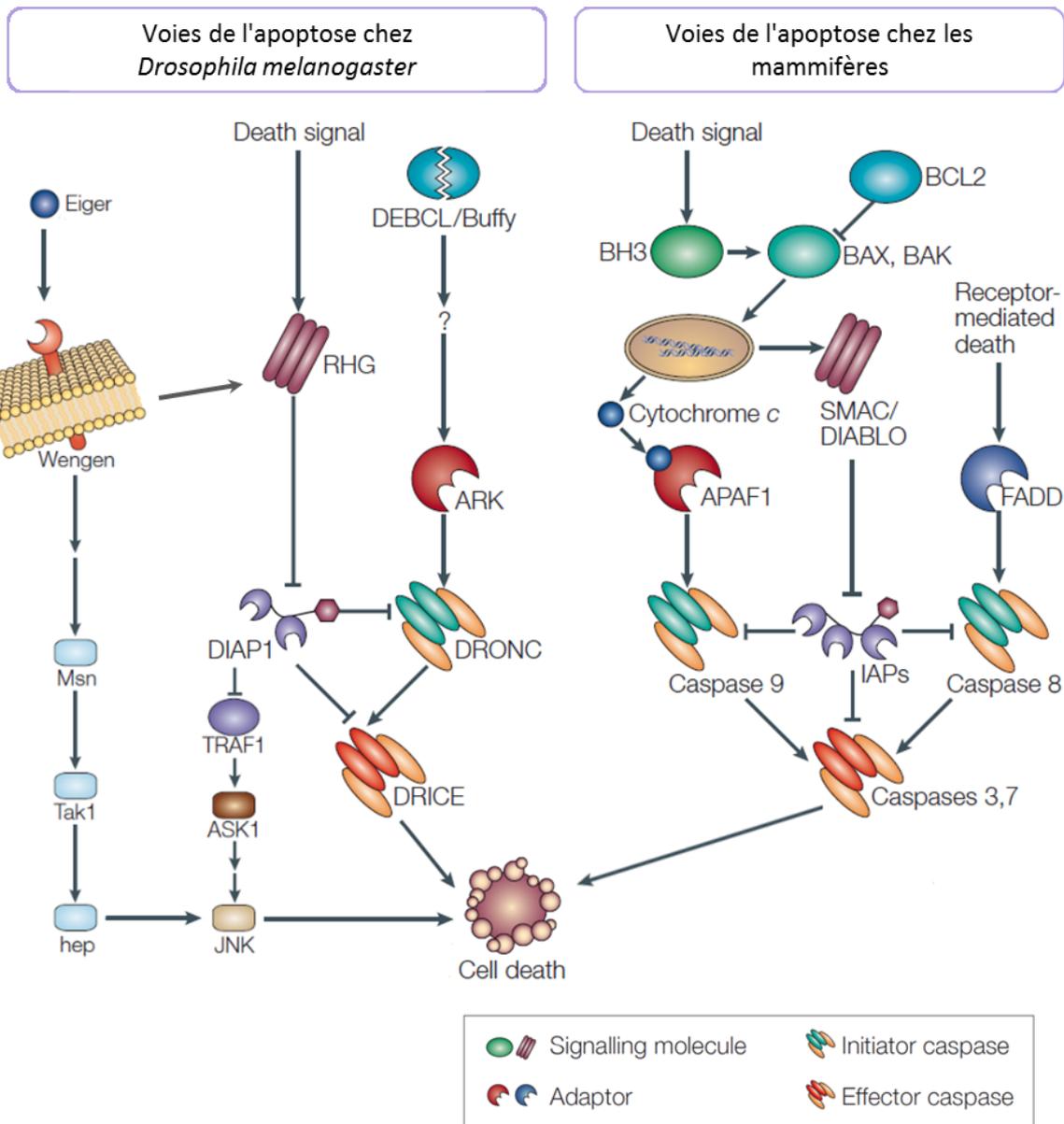


Figure 5. Les voies de l'apoptose chez *D.melanogaster* et chez les mammifères

La régulation de l'apoptose est fortement conservée chez les métazoaires. Ici sont représentées les voies d'activation de l'apoptose chez *Drosophila melanogaster* (à gauche) et chez les mammifères (à droite). Elles diffèrent principalement par les processus menant à l'activation des caspases. En effet, la perméabilisation de la mitochondrie et le relargage de cytochrome c exercent un rôle prépondérant chez les mammifères, contrairement à chez *D. melanogaster*.

(Adapté de Hay *et al.*, 2004)

Cependant chez la drosophile, le cytochrome c ne semble pas intervenir dans la formation de l'apoptosome (Yu et al., 2006). Seuls deux membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés chez *D. melanogaster*, Buffy et Debcl (Death executioner Bcl-2 homologue), et leur rôle dans l'apoptose est peu connu.

L'activation des caspases chez la drosophile est essentiellement médiée par des antagonistes des IAPs, les protéines RHG (Reaper, Hid, Grim), qui sont les homologues de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 de mammifère (Figure 5). Les membres principaux de la famille RHG sont codés par les gènes *hid*, *rpr*, *grim* et *sickle*, organisés en cluster sur le chromosome III. Les embryons homozygotes pour la délétion *Df(3L)H99* qui découvre ces quatre gènes présentent une forte réduction d'apoptose développementale et meurent au cours de l'embryogenèse (White et al., 1994). Ces facteurs pro-apoptotiques sont capables de lever l'inhibition des caspases par DIAP1, en interagissant avec son domaine BIR (Chai et al., 2003).

1.4.3 Apoptose régulée par la voie JNK

Il existe également une voie extrinsèque de l'apoptose, qui est activée par des signaux extracellulaires (Figure 5). Chez les mammifères, elle est initiée par la fixation de ligands spécifiques, tels que TNF α (tumor necrosis factor α) ou FasL (Fas ligand) à des récepteurs à domaine de mort (DD pour Death Domain), qui conduit à la formation d'un complexe DISC (Death-inducing signaling complex) composé de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain protein) et des caspases activatrices 8 et 10. Chez *D. melanogaster* n'ont été identifiés qu'un seul membre de la famille des TNF, Eiger, et un seul récepteur, Wengen, qui est dépourvu de domaine DD (Igaki et al., 2002; Kanda et al., 2002). La fixation de Eiger sur son récepteur induit de la mort cellulaire en activant la voie de réponse au stress JNK (c-Jun N-terminal kinase).

La voie JNK est l'une des trois voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) conservées chez les métazoaires, avec la voie ERK et la voie p38. Ces voies regroupent des Ser/Thr kinases et sont nommées d'après les kinases activées en aval de la cascade de phosphorylation chez les mammifères. Chez *D. melanogaster*, une seule JNK a été identifiée : Basket (Bsk).

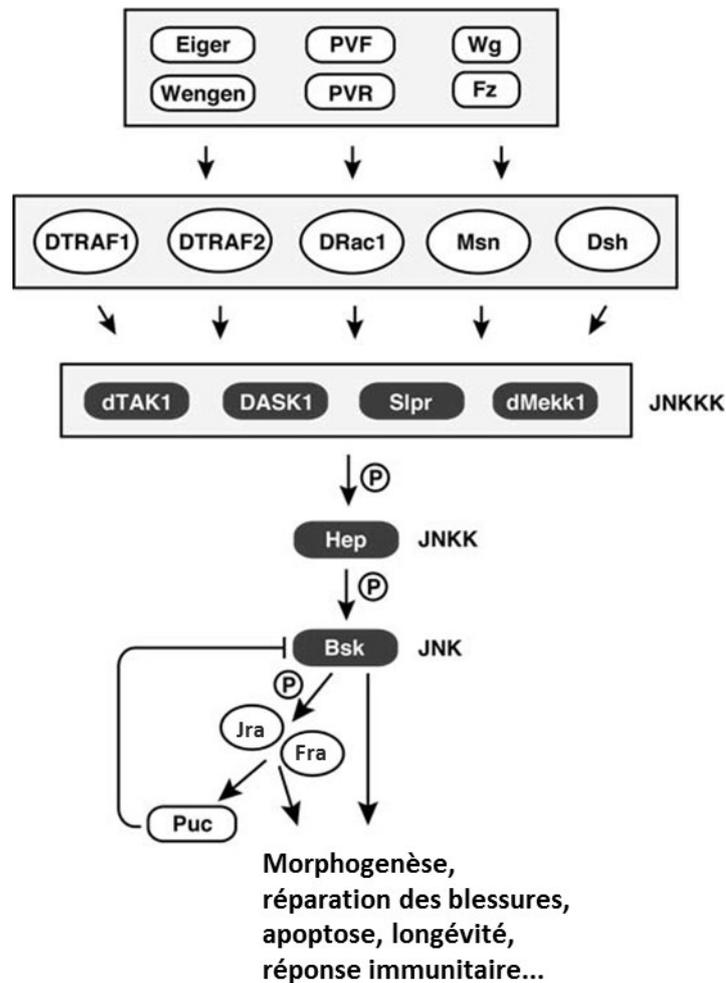


Figure 6. La voie de réponse au stress JNK (c-Jun N-terminal kinase)

La voie JNK contrôle la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire en réponse à un grand nombre de signaux intracellulaires, ou extracellulaires suite à la liaison à leurs récepteurs de différents ligands : Eiger, PVF (platelet vascular factor) et Wg (Wingless).

Ces signaux activent différentes cascades de phosphorylations, qui convergent vers le cœur de la voie, composé de Hep (Hemipterous), Bsk (Basket) et du dimère Jra/Fra (Jun et Fos-related antigens). La phosphatase Puc (Puckered) est un inhibiteur de Bsk, et constitue un rétrocontrôle négatif de la voie puisque *puc* est une cible transcriptionnelle de Jra/Fra.

La combinaison des différentes kinases et protéines adaptatrices en amont de Bsk confèrent la spécificité de réponse médiée par cette voie de signalisation.

(Adapté de Igaki 2009)

L'activation de Bsk résulte de différentes cascades de kinases, qui confèrent la spécificité de la réponse médiée par la voie JNK (Figure 6). Bsk activée phosphoryle le facteur de transcription Jra (Jun-related antigen) qui s'hétérodimérise alors avec Kayak (Kay), également appelée Fra (Fos-related antigen). Ces deux protéines constituent le complexe AP-1 (Adaptator protein complex-1), qui régule un grand nombre de cibles transcriptionnelles (Igaki, 2009). La voie JNK intervient dans divers processus développementaux, tels que l'apoptose requise pour la rotation de la plaque génitale ou la fermeture dorsale de l'embryon. Elle exerce également un rôle dans une grande variété de processus assurant l'homéostasie des tissus tels que la prolifération induite par l'apoptose, la régénération suite à des blessures, ou encore la compétition cellulaire qui sera décrite dans la suite de cette introduction.

1.5 Prolifération et organisation du disque imaginal d'aile : rôles de Dpp et Wg

Pour former un organe correctement proportionné, le contrôle de la prolifération doit être coordonné avec les processus qui organisent les identités cellulaires du futur organe au cours du développement. C'est notamment le rôle des morphogènes Decapentaplegic (Dpp), un membre de la famille TGF- β (transforming growth factor- β), et Wingless (Wg), un membre de la famille Wnt, dans le disque imaginal d'aile. Ces deux molécules ont un rôle mitogène puisque la perte de fonction de *wg* ou de *dpp* entraîne un défaut de prolifération des cellules du disque d'aile, et que leur expression ectopique induit une augmentation de tissu alaire (Neumann and Cohen, 1996; Zecca et al., 1995). Mais ces molécules sont en plus essentielles pour l'organisation des cellules du disque d'aile. Dpp et Wg agiraient comme des morphogènes, dont les gradients spécifient les types cellulaires au sein de l'organe, *via* l'activation de facteurs de transcription distincts en fonction de la position des cellules par rapport au gradient (Tabata, 2001). Le disque imaginal d'aile est divisé en compartiments antérieur et postérieur dès l'embryogenèse (Martín and Morata, 2006), et en compartiments dorsal et ventral au cours du deuxième stade larvaire. Les communications cellulaires entre ces différents compartiments organisent et mettent en place le patterning, c'est à dire les identités des cellules selon leur position dans le disque.

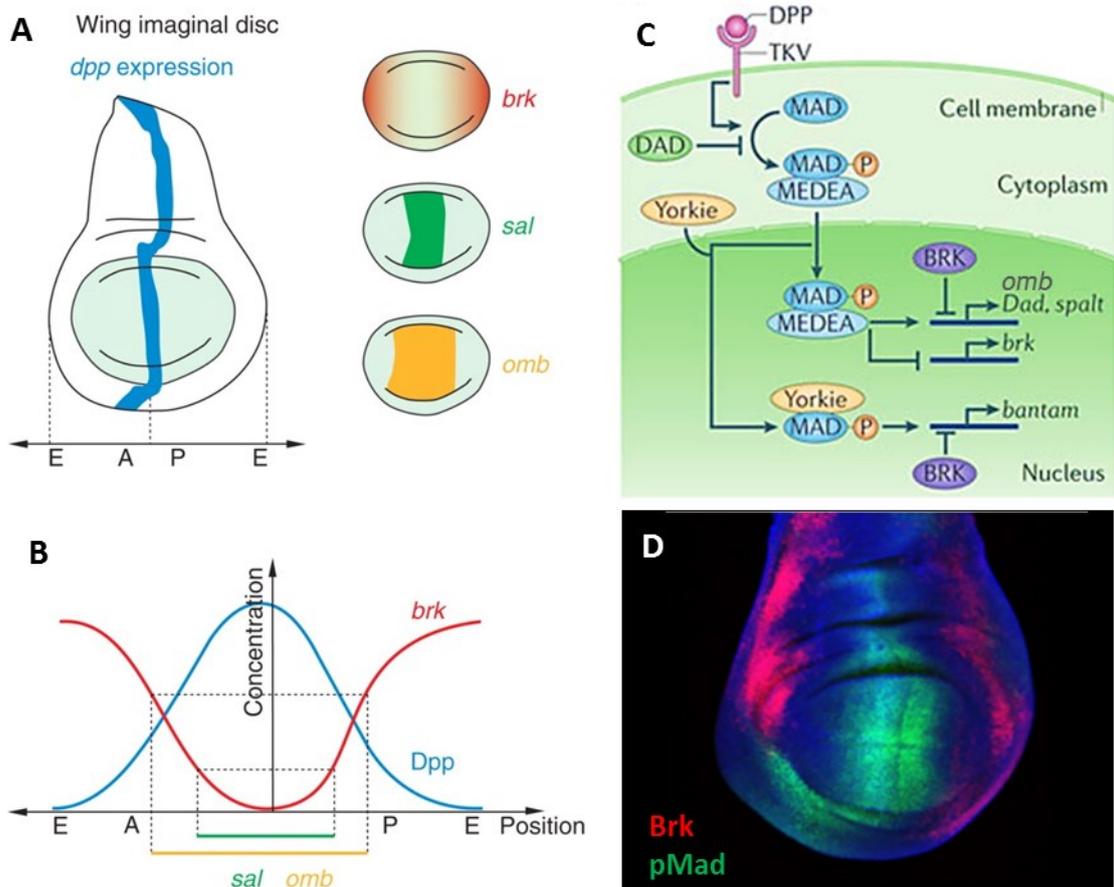


Figure 7. Voie de signalisation et cibles de Decapentaplegic (Dpp)

- (A) Schéma du territoire d'expression de *dpp* et de ses cibles *brk* (*brinker*), *sal* (*spalt*) et *omb* (*optomotor-blind*) dans le disque imaginal d'aile. *dpp* est exprimé le long de la frontière entre les compartiments antérieur (A) et postérieur (P).
- (B) Un gradient de Dpp se forme vers les bords du disque (E: edge). L'expression de *brk* est réprimée par l'activité de la voie Dpp, formant un gradient de Brk inverse à celui de Dpp. Le niveau de Brk détermine les territoires d'expression de *sal* et *omb* (Schwank and Basler, 2010).
- (C) Voie de signalisation Dpp. Le facteur de transcription Mad est phosphorylé suite à la fixation de Dpp sur son récepteur Thickveins (Tkv). Mad se lie à Medea et s'accumule dans le noyau où il réprime la transcription du répresseur *brk*. Brk et Mad phosphorylé régulent l'expression des gènes cibles de la voie Dpp, tels que *Dad* (*Daughters against Dpp*), *omb* et *spalt*. Mad interagit également avec le co-activateur transcriptionnel Yorkie pour réguler la transcription du miRNA *bantam* impliqué dans la croissance. La phosphorylation de Mad est régulée négativement par Dad (Adapté de Wartlick *et al.*, 2011).
- (D) Rapporteurs de l'activité de Dpp dans le disque imaginal d'aile : immunomarquage de Brinker (en rouge) et Mad (Mothers against Dpp) phosphorylé (en vert) (Image de Markus Affolter, www.biozentrum.unibas.ch).

Dpp est spécifiquement produit par les cellules du compartiment antérieur qui bordent la frontière antéropostérieure (A/P) du disque (Zecca et al., 1995) (Figure 7A). Ce ligand sécrété diffuse et forme un gradient de part et d'autre de sa source (Figure 7B). Dpp exerce ainsi une action à longue distance dans les compartiments antérieur et postérieur. La fixation de Dpp sur le récepteur Thickveins (Tkv) permet la phosphorylation du facteur de transcription Mad (Mothers against Dpp), qui interagit aussi avec Yki, donc avec la voie Hippo (Figure 7C). Mad phosphorylé se lie à Medea afin d'inhiber l'expression du gène *brinker* (*brk*), qui code un répresseur transcriptionnel. Brk participe avec Mad à la régulation de différents gènes cibles de la voie Dpp en fonction de la position des cellules par rapport à la frontière A/P (Figure 7B et 7D). Le gradient de Dpp fournit ainsi une information de position aux cellules du disque d'aile. De manière intéressante, le rôle de Dpp dans la croissance des tissus n'est pas soumis au même contrôle. En effet, les cellules du disque d'aile prolifèrent de façon uniforme, et non suivant le gradient de Dpp, suggérant que le rôle mitogène de Dpp est indépendant de sa concentration (Schwank et al., 2008). Différents modèles ont été proposés afin d'expliquer cette énigme (modèle de seuil, présence d'un gradient d'inhibiteur de Dpp, ou encore influence des forces mécaniques exercées au sein du tissu). Davantage de validations expérimentales sont donc requises pour pouvoir élucider la façon dont Dpp induit la prolifération cellulaire dans le disque d'aile (Schwank and Basler, 2010; Restrepo et al., 2014).

Wg est produit le long de la frontière dorsoventrale du disque d'aile, ainsi qu'autour de la poche de l'aile, par les cellules qui formeront la marge de l'aile adulte (Figure 8). De même que pour Dpp, Wg activerait différents gènes cibles de façon concentration-dépendante, tels que *vestigial* (*vg*) ou *Distal-less* (*Dll*) (Zecca et al., 1996). Cependant, la taille et la structure de l'aile adulte semblent peu affectées par une surexpression uniforme de *wg*, suggérant que le gradient n'est requis pour la prolifération et le patterning du disque d'aile (Baena-Lopez et al., 2009). De même, l'expression d'une forme de Wg ancrée à la membrane plasmique en contexte perte de fonction de *wg* permet la formation d'une aile normale, bien que légèrement réduite en taille (Alexandre et al., 2014). Les auteurs de cette étude proposent que les cellules qui se trouvent éloignées du territoire d'expression de *wg* du fait de leur prolifération pourraient, par un mécanisme de mémoire, continuer de répondre à un signal qu'elles auraient reçu plus précocement au cours du développement.

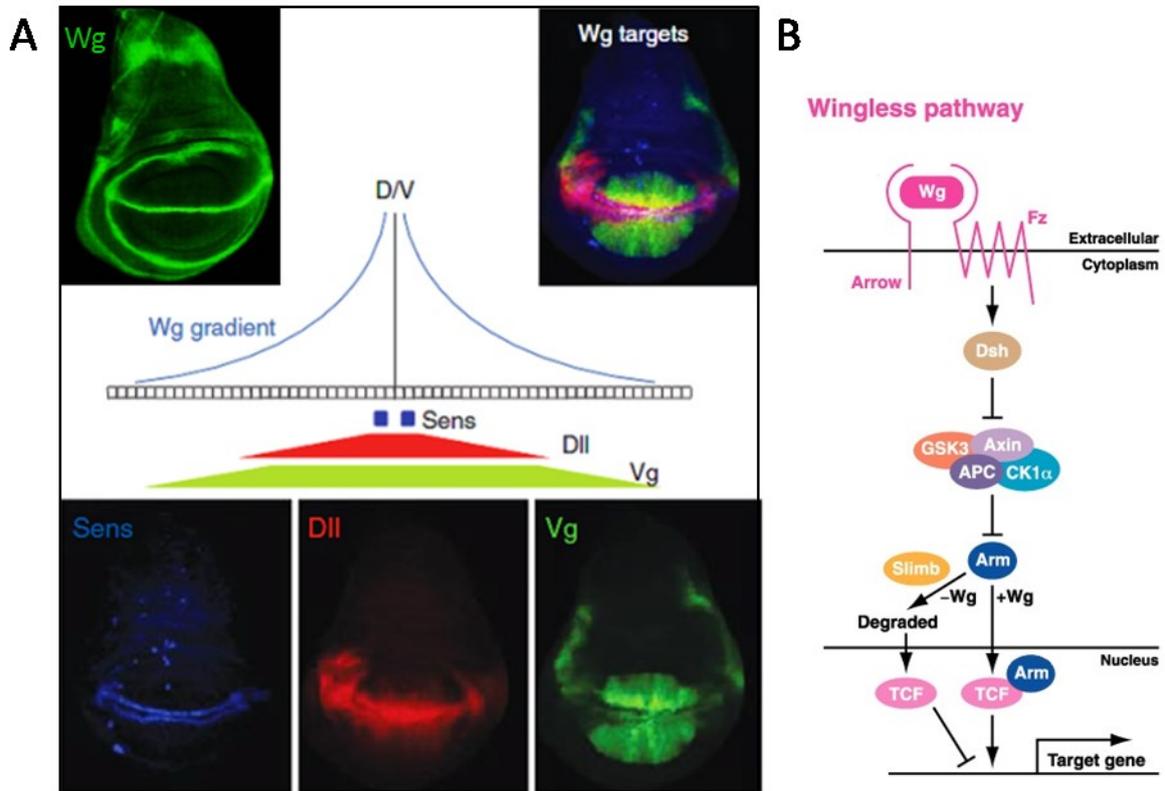


Figure 8. Voie de signalisation et cibles de Wingless (Wg)

- (A) Territoires d'expression de *wg* dans le disque imaginal de larve de troisième stade. Wg est sécrétée par les cellules localisées le long de la frontière drosoventrale (D/V), et par les cellules entourant la poche de l'aile. Wg forme un gradient de part et d'autre de la frontière D/V. Suivant la concentration de Wg en différentes positions du gradient, le signal Wg va activer différentes cibles : *senseless* (Sens, en bleu), *distalless* (Dll, en rouge), et *vestigial* (Vg, en vert). (Adapté de Swarup and Verheyen, 2012)
- (B) Voie de signalisation de Wg. La fixation de Wg sur son récepteur Frizzled (Fz), et de son co-récepteur Arrow entraîne la répression par Disheveled (Dsh) d'un complexe multiprotéique impliqué dans la dégradation de la β -caténine Armadillo (Arm). En absence de Wg, TCF (T-cell factor) agit comme un répresseur transcriptionnel. En présence de Wg, Arm modifie l'activité de TCF, qui va alors activer ses gènes cibles (Michelson, 2003).

Decapentaplegic et Wingless sont ainsi des molécules qui coordonnent prolifération et organisation d'un tissu au cours du développement. Comment ces morphogènes intègrent-ils les deux processus ? Des mécanismes différents sont probablement mis en jeu, mais les intermédiaires *via* lesquels Dpp et Wg contrôlent le cycle cellulaire et assurent la prolifération homogène dans le disque imaginal d'aile restent à découvrir.

2 Processus de maintien de l'homéostasie tissulaire

Un grand nombre de processus de maintien de l'homéostasie tissulaire ont été décrits, dont certains font intervenir les différents mécanismes de régulation de la prolifération, de la croissance et de la mort cellulaire décrits précédemment. Je détaillerai ici les processus de compétition cellulaire et de stabilité du développement, qui m'ont intéressée au cours de ma thèse.

2.1 La compétition cellulaire

La survie d'une cellule ne dépend pas seulement de ses propriétés intrinsèques, ou de celles des autres cellules du tissu, mais également d'une comparaison entre les propriétés de cette cellule et de celles de ses voisines. Cette idée a été renforcée par l'observation de phénomènes de compétition entre les différentes cellules d'un tissu.

2.1.1 Découverte de la compétition cellulaire induite par les mutations *Minute*

Le phénomène de compétition cellulaire a été observé pour la première fois chez la drosophile lors de l'induction, dans des disques d'aile, de clones de cellules portant une mutation *Minute* (*M*). Les mutations *Minute* forment un groupe de plus de 60 mutations dominantes, létales à l'état homozygote et qui affectent des gènes codant différentes protéines ribosomiques (Marygold et al., 2007). Les cellules *M/+* sont viables dans un contexte homotypique, et les mouches de ce génotype présentent un faisceau de phénotypes appelé syndrome « Minute » : retard de développement, taille réduite, soies courtes et fines, réduction de la viabilité et de la fertilité. Cependant, lorsqu'un clone de cellules *M/+* est induit dans un disque d'aile *+/+*, ces cellules sont éliminées, et seuls les clones induits tardivement sont observés dans l'aile adulte. Les cellules *M/+* sont donc soumises à une compétition pour la contribution au tissu d'aile adulte, mais uniquement en présence de cellules *+/+* (Morata and Ripoll, 1975). Ce phénomène de compétition cellulaire est restreint à des cellules du même compartiment du disque d'aile (Simpson and Morata, 1981).

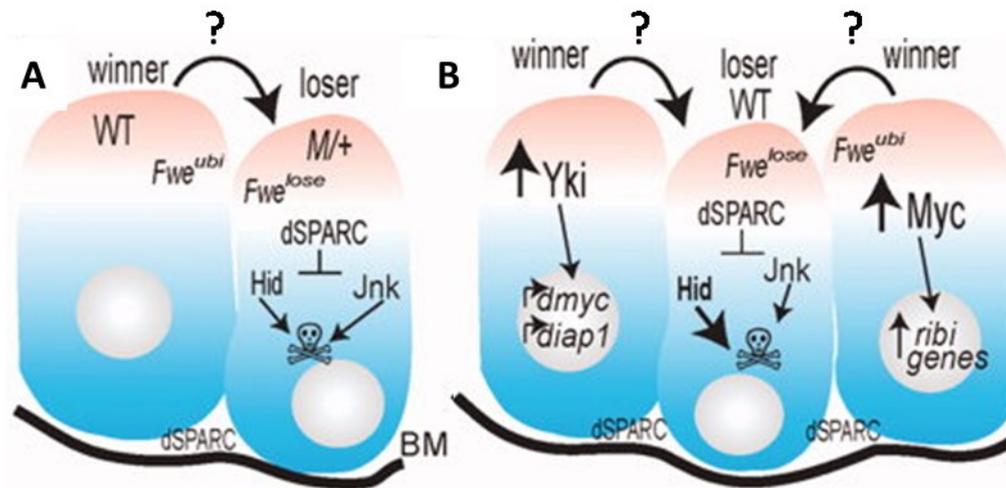


Figure 9. Représentations schématiques du phénomène de compétition cellulaire

- (A) Modèle d'élimination des cellules perdantes ($M/+$) par compétition cellulaire dans un tissu épithélial sauvage. Les cellules gagnantes (WT) émettent un signal (non identifié) qui entraîne l'activation de la voie JNK et du facteur pro-apoptotique Hid dans les cellules perdantes, entraînant leur mort par apoptose. La confrontation des deux populations de cellules entraîne également la production d'une isoforme spécifique de la protéine transmembranaire Fwe (Flower), Fwe^{lose} , dans les cellules $M/+$. Les cellules perdantes expriment $dSPARC$, codant une protéine sécrétée qui les protège transitoirement de la mort cellulaire.
- (B) Modèle d'induction de compétition cellulaire par des cellules "super-compétitrices" juxtaposées à des cellules sauvages (perdantes). Les super-compétitrices peuvent présenter une forte activité de Wg (Wingless), de Myc ou de Yki (Yorkie), un facteur de transcription qui régule l'expression de dm (codant Myc). Elles peuvent également présenter une diminution d'activité de la voie Hippo (qui régule négativement Yki).

(de Beco et al., 2012)

Une analyse de ce mécanisme a été réalisée plus récemment, révélant que les cellules *M/+* soumises à de la compétition cellulaire sont activement éliminées du tissu par apoptose dépendante de la voie JNK. En effet, les cellules *M/+* présentent une fragmentation de l'ADN, et leur élimination est bloquée par le facteur anti-apoptotique p35 ou lorsqu'elles portent une mutation du gène codant la JNKK Hep (Moreno et al., 2002).

L'observation de cas de compétition cellulaire chez les mammifères a montré qu'il s'agit d'un phénomène conservé au cours de l'évolution. Par exemple, dans des souris chimères comportant des cellules mutantes pour *Bst* (*Belly spot and tail*), qui code la protéine ribosomique Rpl24 (Oliver et al., 2004), les cellules *Bst/+* entrent en compétition avec les cellules sauvages voisines, se comportant comme les cellules *Minute/+* dans un contexte sauvage chez *D. melanogaster*.

2.1.2 Une grande diversité de contextes induisent de la compétition cellulaire

La compétition cellulaire n'est pas spécifique des mutations *Minute*. Elle a été observée par la suite dans différents contextes de juxtaposition de deux populations cellulaires (Vincent et al., 2013; Amoyel and Bach, 2014).

Dans tous les cas décrits de compétition cellulaire, des cellules de moindre capacité de prolifération ou de croissance, appelées cellules « perdantes », sont soumises à de l'apoptose. Cette mort cellulaire est induite de façon non-autonome par les cellules voisines, dites cellules « gagnantes » (Figure 9). L'activation de la voie JNK et du gène pro-apoptotique *hid* dans les cellules perdantes sont également des étapes détectées dans différents cas de compétition cellulaire. Cependant, l'activation de la voie JNK ne semble pas indispensable à tous les cas de compétition cellulaire (la Cova et al., 2004; Rodrigues et al., 2012).

Il a par ailleurs été montré que des cellules sauvages sont soumises à la compétition cellulaire lorsqu'elles sont juxtaposées à des clones de cellules où *dm* est surexprimé (la Cova et al., 2004). Les cellules présentant une activité de Myc supérieure à celle des cellules sauvages sont alors qualifiées de « super-compétitrices » (Figure 9). Ceci montre que cette compétition n'est pas due à un défaut de viabilité des cellules perdantes, mais bien à une interaction entre deux populations cellulaires ayant des propriétés distinctes.

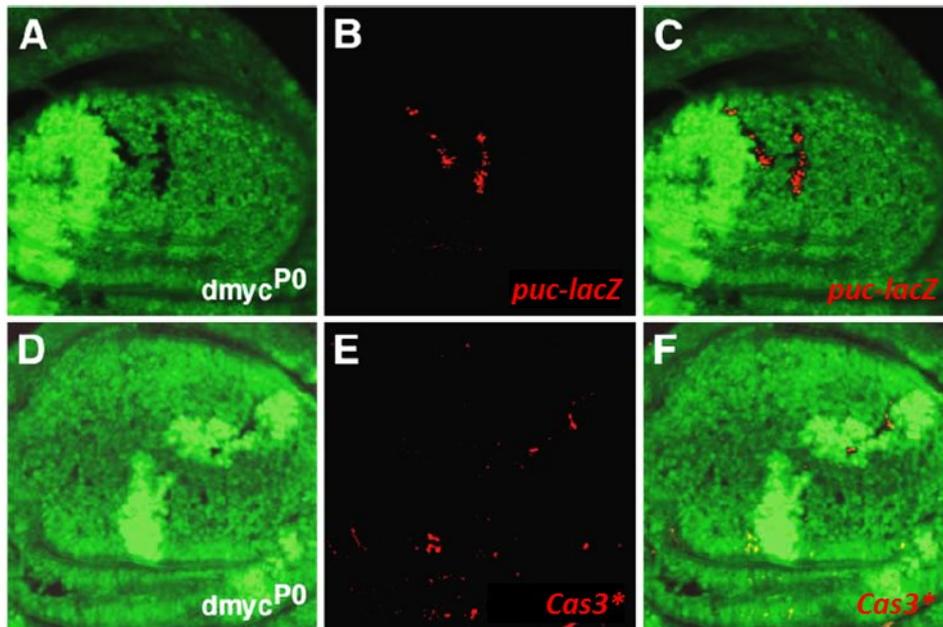


Figure 10. Elimination par compétition cellulaire de clones mutants pour *dm*

Disques imaginaux d'aile *dm*^{P0}/+ (GFP+) dans lequel des clones mitotiques ont été induits par recombinaison grâce au système MARCM. Le même événement de recombinaison conduit à la formation simultanée de clones +/+ (GFP++) et de clones *dm*^{P0} (GFP-). 72h après l'induction des clones, les clones *dm*^{P0} sont beaucoup plus petits que leurs clones frères en raison de leur élimination du tissu par compétition cellulaire.

(A-C) Les clones *dm*^{P0} présentent une activation de la voie JNK, et l'expression d'un de ses gènes cible, *puckered* (*puc*, en rouge), détectée à l'aide d'un transgène rapporteur *puc-lacZ*.

(D-F) Les cellules *dm*^{P0} présentent une activation des caspases (en rouge, anticorps dirigé contre la Caspase 3 activée humaine, Cas3*, qui révèle chez *D. melanogaster* l'activité de Dronc).

(Moreno and Basler, 2004)

A l'instar de ce qui est observé pour les clones de cellules *Minute*+, un grand nombre de cas de compétition cellulaire impliquent une différence de biogenèse des ribosomes entre deux populations de cellules.

C'est le cas de clones mutants pour *dm*, ou de son homologue murin *Myc*, qui code le régulateur de la biogenèse des ribosomes *Myc* (Moreno and Basler, 2004; la Cova et al., 2004; Clavería et al., 2013; Villa del Campo et al., 2014) (Figure 10). De façon intéressante, des clones de cellules présentant une diminution d'activité de Yki, qui régule la transcription de *dm*, sont éliminés par compétition avec les cellules sauvages voisines (Neto-Silva et al., 2010). A l'inverse, des cellules présentant une hyperactivation de Yki (*via* une perte d'activité de la voie Hippo, par exemple), présentent une augmentation d'activité de *Myc* et se comportent comme des super-compétitrices (Tyler et al., 2007; Ziosi et al., 2010) (Figure 9).

De la même façon, la compétition cellulaire peut être induite par des mutations des gènes *discs large 1 (dlg1)*, *lethal giant larvae (lgl)*, *scribbled (scrib)* et *crumbs (crb)*, qui sont des régulateurs de la polarité cellulaire et de la voie Hippo (Amoyel and Bach, 2014). Une implication de *Myc* n'a été démontrée que dans le cas de mutants de *lgl* (Menéndez et al., 2010), et elle est controversée dans le cas de *crb* (Hafezi et al., 2012)

Il existe des cas de compétition cellulaire dans lesquels *Myc* n'est pas impliquée. Ainsi des clones de cellules présentant une augmentation d'activité de la voie de signalisation Wg sont capables d'induire l'apoptose des cellules voisines sauvages. Cette compétition cellulaire n'est pas affectée par des mutations *Minute* ni par une modification de l'activité de *Myc* (Vincent et al., 2011). Des variations d'activité de la voie JAK-STAT induisent également de la compétition cellulaire, indépendamment de *Myc*, de Wg et de la biogenèse des ribosomes (Rodrigues et al., 2012). La compétition cellulaire n'est donc pas uniquement liée au contrôle de la croissance *via* la biogenèse des ribosomes. De la même façon, les contextes génétiques qui affectent la croissance n'induisent pas tous de la compétition cellulaire. Par exemple, une dérégulation de la voie Insuline (mutants *Pten* ou *InR*) altère la croissance des clones cellulaires mais n'induit pas de compétition cellulaire (Vincent et al., 2013).

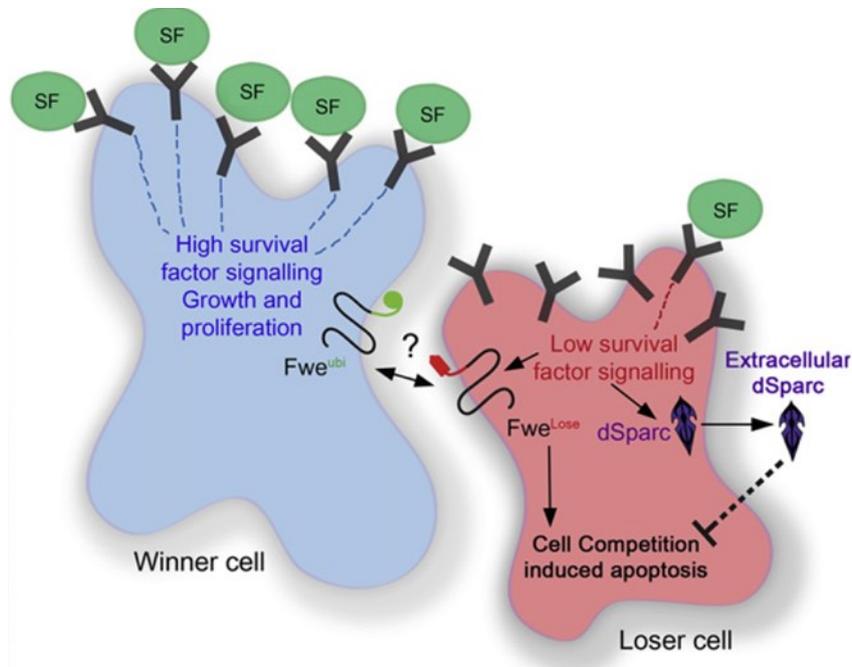


Figure 11. Modèle de la compétition pour un signal de survie et de la reconnaissance des cellules perdantes par la présence de Fwe^{Lose}

Modèle de la capture d'un signal de survie sécrété. La cellule gagnante (en bleu) présente une plus grande capacité à capturer un signal de survie sécrété (SF) que la cellule perdante voisine (en rouge). Cette compétition des deux cellules pour le ligand disponible serait à l'origine de la production de Fwe^{Lose}, une isoforme spécifique de la protéine transmembranaire Fwe (Flower). Cette protéine permettrait la reconnaissance et l'élimination de la cellule perdante par la cellule gagnante par apoptose. La compétition pour le facteur de survie induirait également la sécrétion de dSparc par la cellule perdante, ce qui la protégerait transitoirement de la mort.

(Portela et al., 2010)

2.1.3 Signaux impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules perdantes

Les cellules perdantes sont viables lorsqu'elles ne sont pas en présence de cellules qui ont une plus grande capacité de prolifération. Cela suggère que la présence des cellules gagnantes est à l'origine de l'élimination des cellules perdantes. Une hypothèse proposée serait que les cellules gagnantes présenteraient une plus grande capacité de capture d'un signal de survie sécrété. Du fait de cette compétition pour le signal de survie, les cellules perdantes seraient alors « privées » de ce facteur sécrété, ce qui conduirait à leur élimination (Moreno, 2008) (Figure 11). Il a été proposé que ce facteur pourrait être le morphogène Dpp (ou des BMP chez les mammifères). Des clones dans lesquels le signal Dpp est réduit, grâce à une surexpression de *brk*, présentent une activation de la voie JNK et sont éliminés par apoptose. Une réduction de la réponse au signal Dpp dans des cellules semble donc être une condition suffisante pour induire leur élimination par compétition cellulaire (Moreno et al., 2002). De plus, dans des embryons de souris, des cellules déficientes pour la voie de signalisation BMP sont éliminées par apoptose (Sancho et al., 2013). Cependant, l'implication de la signalisation Dpp/BMP dans la compétition cellulaire est controversée, deux études ayant rapporté une absence de modification du signal Dpp dans des cellules perdantes *M/+* ou mutantes pour *dm* (la Cova et al., 2004; Martín et al., 2009).

Le phénomène de compétition cellulaire implique également que les cellules gagnantes doivent être capables de reconnaître et d'éliminer spécifiquement les cellules présentant une moindre aptitude à composer le tissu final, mais néanmoins viables. Différentes études ont cherché à identifier des facteurs spécifiquement produits dans les cellules perdantes, qui pourraient constituer ce signal de reconnaissance de cellules suboptimales par les cellules gagnantes. Ces travaux ont permis de montrer que, lors de la compétition cellulaire induite par Myc, les cellules perdantes produisent des isoformes spécifiques d'une protéine transmembranaire, Flower (Fwe) (Rhiner et al., 2010). La production ectopique de ces deux isoformes, appelées Fwe^{Lose-A} et Fwe^{Lose-B}, dans des clones cellulaires est suffisante pour induire leur élimination par compétition cellulaire. Fwe pourrait donc être impliquée dans la signalisation permettant aux cellules juxtaposées de comparer leur aptitude à composer le tissu final (Figure 11).

La même étude a permis d'identifier une autre protéine produite spécifiquement par les cellules perdantes : la protéine SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). SPARC est une glycoprotéine sécrétée de la matrice extracellulaire qui protègerait transitoirement les cellules perdantes de l'apoptose en inhibant l'activation des caspases effectrices (Portela et al., 2010). Le rôle de SPARC dans la survie cellulaire semble spécifique de la compétition cellulaire (Figure 11).

La mort cellulaire induite par la compétition cellulaire est observée à une distance maximale de 10 cellules par rapport au point de contact entre les deux populations de cellules. Cette observation est difficile à concilier avec l'hypothèse que Fwe^{Lose} constituerait le seul signal de reconnaissance des cellules perdantes par les cellules gagnantes. Ce modèle a été actualisé afin de proposer l'existence d'un signal de mort sécrété par les cellules gagnantes, qui diffuserait à courte distance et serait l'événement déclencheur de l'apoptose des cellules perdantes (Levayer and Moreno, 2013). Seules les cellules perdantes seraient sensible à ce signal, qui reste à identifier.

2.1.4 Quel rôle pour la compétition cellulaire dans l'homéostasie des tissus ?

La compétition cellulaire est un phénomène conservé au cours de l'évolution. Ce processus semble généralement utilisé pour comparer les capacités de croissance et de prolifération des différentes cellules d'un tissu, et pour éliminer les cellules « inaptées » à la formation de l'organe final.

Il a été proposé que la compétition cellulaire serait un mécanisme important pour l'homéostasie des tissus, permettant une régulation fine de la taille des organes (Moreno et al., 2002; la Cova et al., 2004). Cependant aucune étude ne décrit un effet majeur de l'inhibition de la compétition cellulaire sur la taille finale des organes (Courgeon et al., 2015). On peut cependant imaginer un rôle de la compétition cellulaire dans la régulation fine de la taille des organes.

Quelques cas physiologique de compétition cellulaire ont été décrits. Il a été montré d'une part que Fwe^{Lose} est nécessaire et suffisante pour la reconnaissance et l'élimination

des neurones surnuméraires dans les ommatidies de *D. melanogaster* (Merino et al., 2013). D'autre part, une étude récente propose un rôle de la compétition cellulaire et de Flower dans la régénération du cerveau de drosophile suite à une lésion, qui permettrait de favoriser le remplacement des neurones endommagés par de nouvelles cellules (Moreno et al., 2015). La compétition cellulaire pourrait donc constituer un mécanisme de surveillance permettant de détecter si une cellule est apte à contribuer à la formation du tissu.

Les cellules super-compétitrices semblent se comporter de façon similaire à des cellules cancéreuses. Cela a conduit à proposer que les mécanismes de compétition cellulaire pourraient être détournés par les cellules tumorales afin de coloniser un tissu sain. À l'inverse, la compétition cellulaire pourrait être un mécanisme de protection précoce des tissus contre des cellules rendues « inaptées » par des mutations qui pourraient favoriser la cancérisation (Moreno, 2008; Tamori and Deng, 2011; Wagstaff et al., 2013). Ces deux hypothèses sont renforcées par l'observation d'une augmentation de SPARC, qui protège transitoirement les cellules perdantes, à la périphérie de tumeurs cancéreuses humaines. Dans certains types de tumeur, le niveau de SPARC est augmenté dans les cellules saines entourant la tumeur, ce qui est en faveur d'un rôle de la compétition cellulaire dans la progression tumorale. Dans d'autres cas de cancer, SPARC est produit par les cellules cancéreuses en contact avec le tissu sain environnant, ce qui suggère que ces cellules sont soumises à de la compétition cellulaire (Petrova et al., 2011). Une meilleure connaissance des mécanismes de compétition cellulaire pourrait améliorer la compréhension de la progression tumorale, et ouvrir la voie à de nouvelles thérapies anticancéreuses.

La compétition cellulaire est donc un phénomène conservé au cours de l'évolution, impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des cellules inaptées à contribuer au tissu, ou des cellules potentiellement dangereuses pour l'organe, contribuant ainsi à l'homéostasie des tissus. Il serait intéressant de savoir si ce mécanisme joue d'autres rôles au cours du développement.

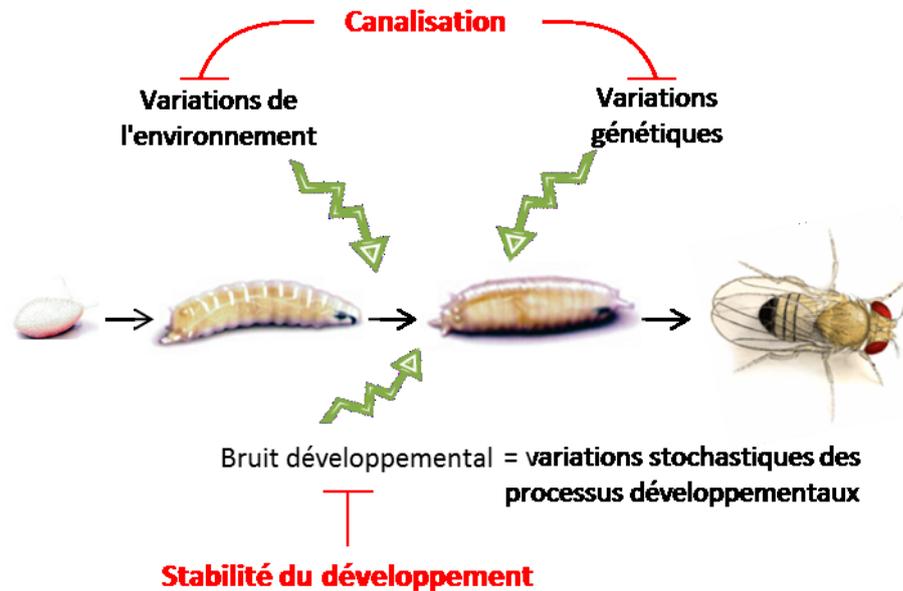


Figure 12. Le contrôle des variations pouvant affecter le développement

Trois types de variations peuvent affecter les organismes au cours de leur développement : les variations environnementales, les variations génétiques, et les variations stochastiques des processus développementaux, ou bruit développemental.

La grande reproductibilité des phénotypes des individus au sein d'une population a poussé les biologistes à postuler l'existence de mécanismes de contrôle de ces variations. Ainsi le terme de canalisation a été proposé pour désigner les mécanismes de contrôle des variations d'origine environnementale et génétique, tandis que la stabilité du développement contrôle le bruit développemental.

(D'après Waddington, 1942)

2.2 La stabilité du développement

Les mécanismes de maintien de l'homéostasie tissulaire précédemment décrits sont mis en jeu lorsque le développement est soumis à des contraintes génétiques (mutations ou lésions de l'ADN...) ou environnementales (stress, blessures, manque de nutriments...). Mais un troisième type de variation peut affecter le développement : le bruit développemental, c'est-à-dire les variations stochastiques des processus développementaux eux-mêmes, dont l'origine ne peut être attribuée ni au génotype, ni à l'environnement (Palmer, 1996) (Figure 12).

2.2.1 La stabilité du développement, ou le contrôle du bruit développemental

Les organismes présentent une remarquable capacité à résister à ces différents types de perturbations, et le développement conduit à la formation d'individus au phénotype « stéréotypé » en dépit des multiples variations qui peuvent l'affecter. Ces observations ont conduit les biologistes à formuler l'hypothèse de l'existence de mécanismes assurant le contrôle des variations pouvant affecter le développement (Waddington, 1942) (Figure 12).

D'une part, le terme de canalisation a été proposé afin de désigner l'ensemble des processus, sélectionnés au cours de l'évolution, assurant un phénotype constant en contrôlant les variations environnementales et génétiques (Waddington, 1942; Debat and David, 2001). D'autre part, le concept de stabilité du développement désigne les mécanismes assurant la constance phénotypique dans des conditions génétiques et environnementales fixées. La stabilité du développement correspond donc au contrôle du bruit développemental (Debat and David, 2001).

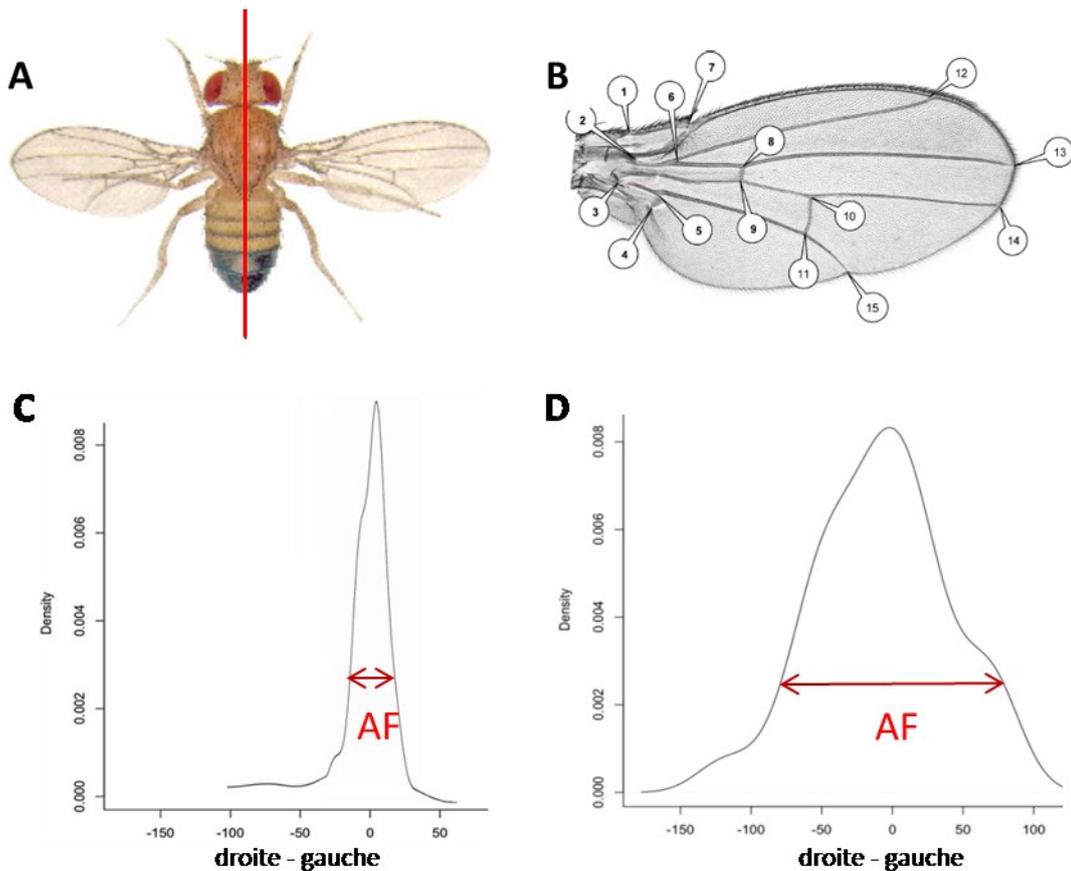


Figure 13. L'asymétrie fluctuante, un estimateur de la stabilité du développement

- (A) Chez les organismes présentant une symétrie bilatérale, tels que *D. melanogaster*, le bruit développemental peut être estimé, dans des populations isogéniques élevées dans des conditions standardisées, en comparant les organes des côtés droit et gauche des individus.
- (B) Points de repère de l'aile de drosophile, utilisés pour analyser précisément la taille et la forme de l'aile par morphométrie géométrique.
- (C) Exemple de distribution des différences (droite - gauche) dans une population où le bruit développemental est faible ...
- (D) ... et dans une population où il est élevé. Les valeurs (droite-gauche) au sein d'une population suivent une distribution normale. Leur variance au sein de la population permet de quantifier l'asymétrie fluctuante (AF, flèche rouge).

2.2.2 L'asymétrie fluctuante, une estimation de la stabilité du développement dans une population

Chez les organismes bilatériens, la stabilité du développement peut être estimée à l'échelle d'une population en mesurant le niveau d'asymétrie fluctuante (AF), c'est-à-dire la variation intra-individuelle entre les deux côtés des individus (Figure 13).

Même si les organismes présentent une symétrie bilatérale, de petites variations sont observables entre les deux côtés des individus. L'AF est ainsi un type d'asymétrie courant en biologie, et correspond généralement à des variations de faible amplitude et de direction aléatoire.

La relation entre stabilité du développement et asymétrie fluctuante repose sur le postulat que les deux côtés des organismes à symétrie bilatérale sont soumis aux mêmes conditions environnementales et sont contrôlés par les mêmes gènes (Palmer, 1994). Suivant ce postulat, l'AF reflète les erreurs aléatoires survenues au cours du développement, et aussi la capacité de l'organisme à contrôler ces variations (stabilité du développement). Il s'agit d'une propriété importante du développement, qui permet d'assurer la précision de la morphogenèse et la réplication précise du phénotype sélectionné au cours de l'évolution. Toute étude de l'AF présuppose également que le phénotype optimal sélectionné au cours de l'évolution est la symétrie, et que tout écart par rapport à cette symétrie tend à être corrigé au cours du développement (Palmer and Strobeck, 1986; Palmer, 1994; Willmore and Hallgrímsson, 2005).

L'étude de l'AF a connu un grand essor dans les années 1990, popularisée par l'idée qu'elle pouvait refléter des perturbations du développement par des stress environnementaux et génétiques. L'AF a été largement utilisée comme un marqueur de stress, de fitness, jusqu'à des études recherchant une relation entre AF et beauté, quotient intellectuel, position sociale ou choix de partenaire sexuel. Ces dérives à tendance eugéniste de l'utilisation de l'AF ont conduit à d'intenses débats et à une discréditation de l'utilisation de l'AF comme marqueur de phénomènes biologiques (Palmer, 1999; Van Dongen, 2006). Ces controverses ne justifient pas d'abandonner l'utilisation de l'AF comme marqueur biologique, mais exhortent à l'utiliser de manière raisonnée. Les débats reflètent également la nécessité d'améliorer la compréhension des mécanismes génétiques qui sous-tendent

l'AF, et de mener les études avec une grande précision méthodologique (Van Dongen, 2006). Ainsi, mes travaux de thèse utilisent uniquement l'AF comme marqueur de la stabilité du développement, que j'aborde comme une composante de l'homéostasie tissulaire, et cela afin de mieux comprendre les processus du développement qui assurent la précision de la morphogenèse.

2.2.3 Mesure de l'asymétrie fluctuante

Prenons l'exemple de la mesure d'AF de taille ou de forme des ailes chez *Drosophila melanogaster*. Cet organe est particulièrement adapté pour des mesures d'AF, du fait de sa planéité qui facilite la quantification et de la grande reproductibilité du pattern de veines dans des populations de référence. On peut définir 15 points de référence, ou landmarks, grâce aux intersections entre les veines, les interveines et la marge de l'aile (Figure 13B). L'acquisition des coordonnées de ces points permet une quantification précise de la taille centroïde et de la forme des ailes, grâce à des techniques de morphométrie géométrique (Klingenberg, 2010).

On peut ainsi mesurer précisément les différences de taille entre l'aile droite et l'aile gauche des drosophiles (D-G). L'AF se traduit par une distribution normale des valeurs (D-G), centrée sur zéro. Cette distribution reflète le fait que le phénotype symétrique est le plus représenté dans la population, et que les variations de taille affectent aléatoirement le côté droit ou le côté gauche des individus. La variance de la distribution des valeurs (D-G) au sein de la population estime l'amplitude de l'AF (Figure 13 C,D).

2.2.4 Bases génétiques de la stabilité du développement

Les bases génétiques de la stabilité du développement et les mécanismes impliqués dans le contrôle du bruit développemental sont peu connus. Différentes études à grande échelle ont été menées dans le but d'identifier des régions du génome impliquées dans la stabilité du développement chez *Drosophila melanogaster* (Breuker et al., 2006; Takahashi et al., 2011). Les auteurs de ces études ont étudié l'effet de délétions découvrant différentes

régions du génome, à l'état hétérozygote, sur l'asymétrie fluctuante de forme et de taille des ailes. D'une part, Breuker et ses collaborateurs ont testé 115 délétions de la collection Exelixis (Harvard) (Breuker et al., 2006). Une analyse de leurs données montre une augmentation significative de l'AF de taille des ailes pour 18 délétions, jusqu'à une augmentation d'un facteur 10 par rapport à la moyenne de l'AF des 115 contextes génétiques étudiés. D'autre part, Takahashi et ses collaborateurs ont testé l'effet de 435 délétions de la collection DrosDel, découvrant 65% du génome de la drosophile. Ils ont identifié 89 délétions affectant faiblement l'AF de forme des ailes (Takahashi et al., 2011). Mais aucune de ces deux études n'a montré quel(s) gène(s) découvert(s) par ces déficiences seraient responsables de l'augmentation d'AF.

A ce jour, seuls trois gènes ont été clairement impliqués dans la stabilité du développement chez *Drosophila melanogaster*: *hid* (Neto-Silva et al., 2009), *CycG* (Debat et al., 2011) et *dilp8* (Garelli et al., 2012). Les travaux démontrant le rôle de *CycG* dans la stabilité du développement seront détaillés dans la partie 4.3 de cette introduction.

Comme nous l'avons vu précédemment, *hid* est un gène pro-apoptotique qui joue un rôle clé dans l'induction de la mort cellulaire programmée. Les mouches portant un allèle mutant de *hid* (allèle non précisé) face à la délétion *Df(3L)H99* découvrant les gènes de la famille RHG *hid*, *rpr*, *grm* et *sickle*, présentent une augmentation significative de l'asymétrie fluctuante comparée à celle de mouches contrôle (Neto-Silva et al., 2009) (Figure 14 A,B). Ce résultat suggère que l'apoptose induite par les protéines de la famille RHG est impliquée dans la stabilité du développement de l'aile de drosophile, et dans la régulation fine de la taille de l'aile.

Le gène *dilp8* code un peptide Insuline-like (Insulin-like peptide 8). Il a été identifié par deux équipes de recherche lors de cribles indépendants visant à identifier des signaux impliqués dans la coordination entre la croissance des tissus imaginaux et la durée du développement (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012). La première de ces équipes a induit un retard de pupaison, en inactivant *avalanche* ou *rpl7* dans les disques imaginaux, et a observé que l'inactivation de *dilp8* par RNAi restaure la durée du développement dans ces deux contextes (Colombani et al., 2012).

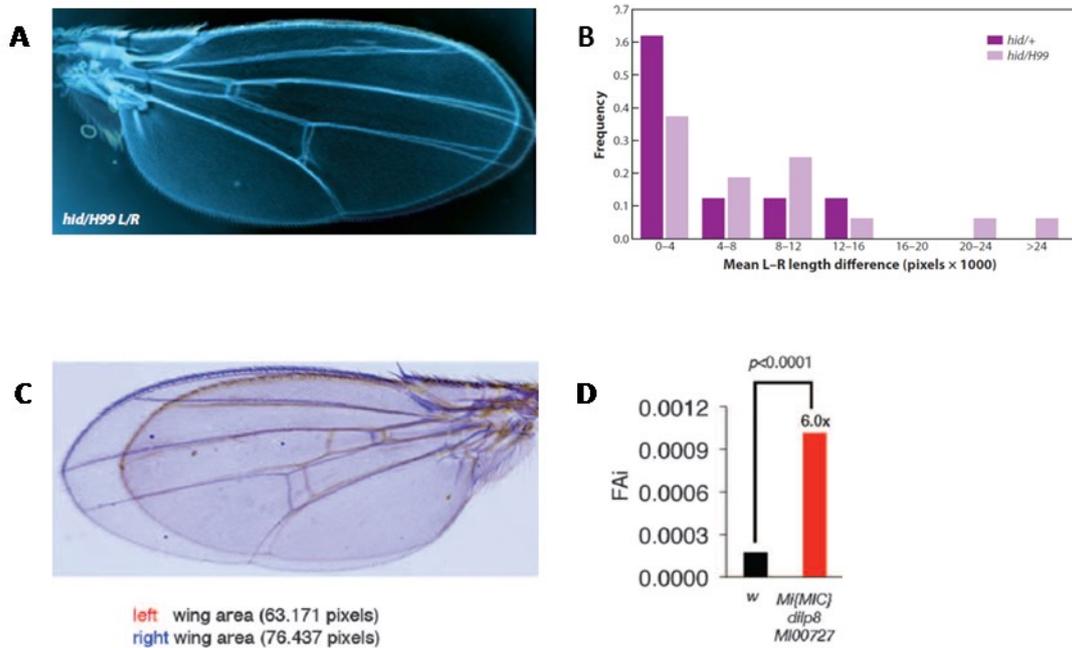


Figure 14. Les gènes RHG (*hid reaper grim*) et *Dilp8* sont impliqués dans la stabilité du développement

- (A) Superposition des ailes droite et gauche d'une drosophile de génotype *hid/H99*, où *hid* désigne un allèle non précisé du gène *hid* et *H99* désigne la délétion *Df(3L)H99* qui découvre les gènes de la famille RHG (*hid*, *reaper*, *grim*).
- (B) Ce contexte génétique induit une augmentation de l'asymétrie de taille des ailes par rapport à un témoin *hid/+*, suggérant que les gènes RHG sont impliqués dans la régulation fine de la taille des organes *via* le contrôle du bruit développemental (Neto-Silva et al., 2009).
- (C) Superposition des ailes droite et gauche d'une drosophile homozygote pour l'allèle perte de fonction *dilp8*^{Mi00727}, montrant une forte asymétrie.
- (D) Ce contexte génétique augmente fortement l'asymétrie fluctuante (FA) d'aire des ailes par rapport au témoin *w*. *dilp8* semble donc impliqué dans la stabilité du développement (Garelli et al., 2012).

La deuxième équipe a utilisé un système d'induction de tumeurs dans les disques imaginaux d'œil, et a recherché par microarray des gènes induits par ce système et codant potentiellement des protéines sécrétées. Les auteurs ont observé que Dilp8 est sécrétée dans l'hémolymphe par les disques portant des tumeurs (Garelli et al., 2012). Un retard de développement dépendant de la sécrétion de Dilp8 a ainsi été observé dans différents contextes de perturbation du développement des disques imaginaux : tumeurs, défaut de biogenèse des ribosomes, ou encore induction d'un stress du réticulum endoplasmique (Demay et al., 2014). Par ailleurs, cette sécrétion de Dilp8 est dépendante de la voie JNK (Colombani et al., 2012; Demay et al., 2014). Dilp8 semble ainsi constituer un signal systémique qui renseigne l'organisme sur l'état de croissance des organes, et régule la durée du développement en modulant la production d'ecdysone par la ring gland (Colombani et al., 2012). Lorsqu'un organe est endommagé, Dilp8 favorise donc sa réparation en ralentissant le développement, ce qui permet le maintien de l'homéostasie des tissus. De façon intéressante, en l'absence de lésion des tissus, la perte de fonction de *dilp8* induit une augmentation d'un facteur 6 de l'AF de taille des ailes (Garelli et al., 2012), suggérant que Dilp8 est impliquée dans la stabilité du développement (Figure 14 C,D). Il est également intéressant de noter que *dilp8* est découvert par l'une des délétions qui avaient donné un effet fort sur l'AF de taille des ailes lors du crible de (Breuker et al., 2006).

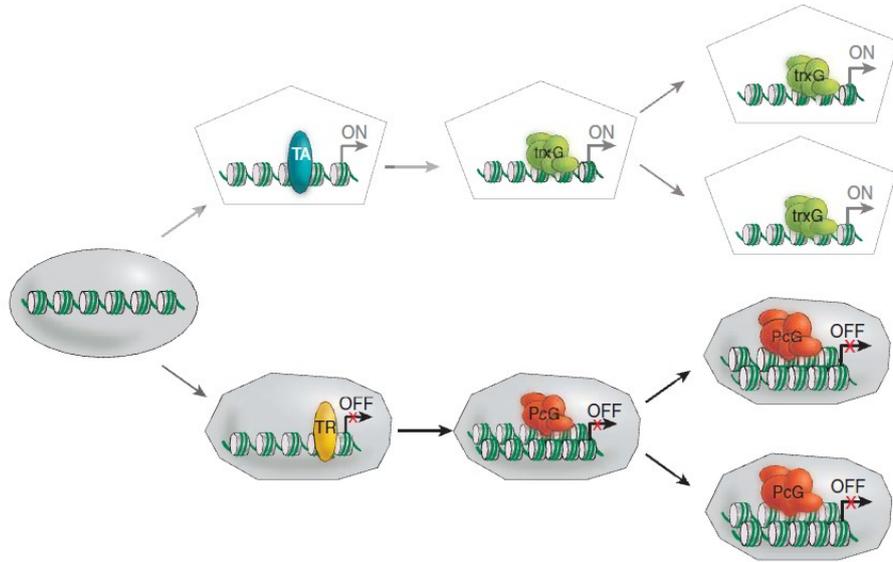


Figure 15. Modèle de la mémoire cellulaire

Représentation schématique du rôle des complexes Polycomb (PcG, en rouge) dans le maintien de l'état réprimé des gènes (en gris) et du rôle des complexes Trithorax (TrxG, en vert) dans le maintien de l'état activé de l'expression des gènes (en blanc). Ce maintien du profil transcriptionnel au cours des divisions cellulaires assure la "mémoire" de l'identité des cellules et permet leur différenciation correcte.

TA : activateur transcriptionnel, TR : répresseur transcriptionnel.

(Grossniklaus and Paro, 2014)

3 Le maintien des identités cellulaires par les complexes Polycomb et trithorax

Les organismes pluricellulaires sont composés de différents types de cellules spécialisées, dont l'identité et la fonction sont déterminées par un profil spécifique d'expression des gènes. L'établissement et le maintien des types cellulaires, au cours du développement et dans les tissus adultes, sont indispensables à l'homéostasie des tissus et au bon fonctionnement de l'organisme. Comment sont maintenues ces identités cellulaires, ainsi que les profils d'expression des gènes qui les définissent, est l'une des questions fondamentales posées en biologie du développement.

Cette mémoire cellulaire (ou mémoire transcriptionnelle) dépend d'un processus épigénétique qui fait notamment intervenir les gènes des groupes Polycomb et trithorax, des acteurs clé du maintien de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires (Figure 15).

Je commencerai cette partie par un historique de la découverte des gènes des groupes Polycomb et trithorax, suivi d'une description des protéines codées par ces gènes. Puis je citerai quelques exemples de l'implication de ces protéines dans des processus de maintien de l'homéostasie des tissus.

3.1 Les gènes PcG et trxG sont impliqués dans le maintien de l'expression des gènes

Les gènes des groupes Polycomb (PcG) et trithorax (trxG) ont été identifiés à travers leur rôle dans le maintien épigénétique de l'expression des gènes Hox au cours du développement de la drosophile. Ces gènes homéotiques codent des facteurs de transcription à homéoboîte qui spécifient l'identité des différents segments du corps le long de l'axe antéro-postérieur.

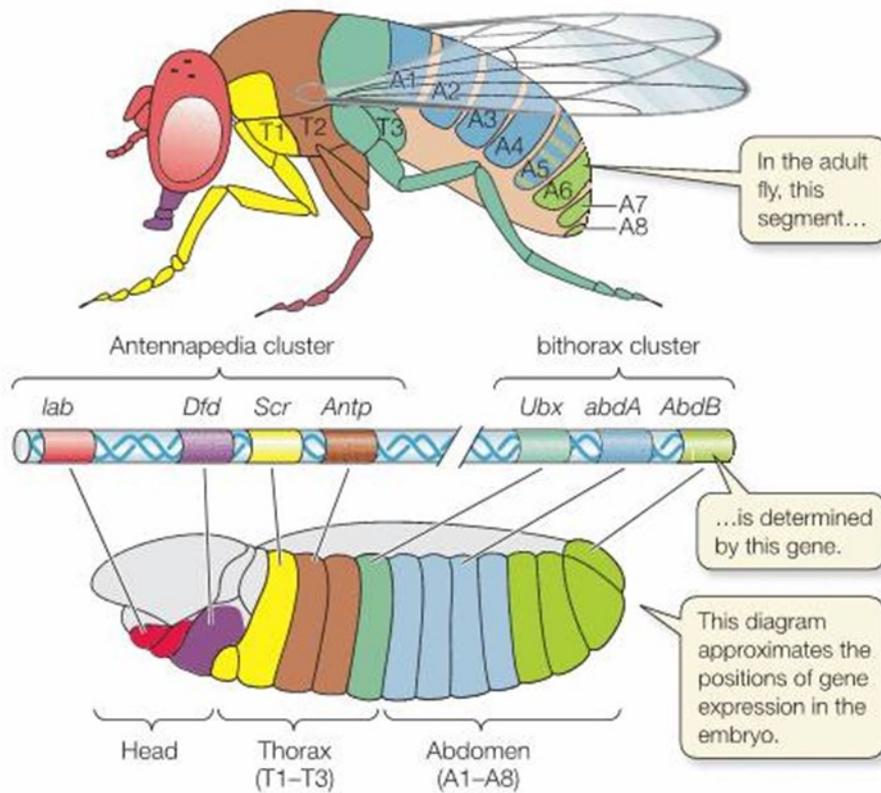


Figure 16. Représentation schématique des domaines d'expression des gènes Hox de *D. melanogaster* le long de l'axe antéro-postérieur

Centre : Les gènes Hox sont organisés en deux clusters (ou complexes), Antennapedia (qui contient les gènes *lab*, *Dfd*, *Scr* et *Antp*) et Bithorax (qui porte les gènes *Ubx*, *abdA* et *AbdB*).

Le profil d'expression des gènes Hox est mis en place au cours de l'embryogenèse (Bas). Il est maintenu au cours du développement afin de déterminer l'identité des différents segments de l'adulte (Haut). On peut noter la colinéarité entre la position des gènes Hox dans le génome et leur profil d'expression le long de l'axe antéro-postérieur.

(D'après Sadava et al., 2009)

Chez *D. melanogaster*, les gènes Hox sont regroupés en deux clusters, localisés sur le chromosome 3 (Figure 16). Le complexe Bithorax (BX-C) contient les trois gènes homéotiques *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* et *Abdominal-B (Abd-B)*, qui spécifient les identités du troisième segment thoracique (T3) et des segments abdominaux (A1 à A8). L'analyse génétique détaillée de ce locus, initiée par Edward Lewis (Lewis, 1978), suivie de son analyse moléculaire, ont permis l'identification de 9 régions cis-régulatrices qui permettent de réguler finement l'expression de ces trois gènes dans chacun des 9 segments les plus postérieurs de la drosophile (Maeda and Karch, 2006). Le complexe Antennapedia (ANT-C) contient les gènes *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* et *Antennapedia (Antp)* qui définissent les identités des segments les plus antérieurs de la drosophile (Scott et al., 1983; Wakimoto and Kaufman, 1981).

Au cours de l'embryogenèse précoce de la drosophile, des facteurs de transcription maternels et zygotiques codés par les gènes gap, pair-rule et par les gènes de segmentation, divisent l'embryon en 14 parasegments. Ces différents facteurs de transcription établissent le profil d'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Figure 16). Ce profil est ensuite maintenu après la disparition des protéines ayant permis sa mise en place, grâce aux gènes des groupes PcG et trxG (Kennison, 1995). Les gènes PcG sont impliqués dans le maintien épigénétique de la répression des gènes Hox dans les segments où ils ne doivent pas être exprimés, tandis que les gènes trxG sont nécessaires au maintien de l'activation des gènes Hox dans les segments dont ils spécifient l'identité. Ainsi chez les mutants des gènes PcG et trxG, l'expression des gènes Hox est correctement mise en place mais n'est pas maintenue au cours du développement. Ceci induit des transformations dites homéotiques, consistant au changement partiel (ou total) d'identité d'une structure du corps en une autre structure. Par exemple le gène *Ubx* spécifie l'identité du segment T3 portant le balancier. Les mutants du gène *Polycomb (Pc)* présentent une expression ectopique de *Ubx* dans le segment T2, qui induit une transformation partielle de l'aile, portée par ce segment, en balancier. Les transformations homéotiques des mutants PcG et trxG attestent donc d'un défaut de maintien des identités cellulaires au cours du développement.

L'analyse des profils de fixation des protéines PcG et trxG sur l'ensemble du génome suggère qu'elles sont impliquées dans la régulation de nombreux autres gènes (Bracken et al., 2006; Schwartz et al., 2006; Tolhuis et al., 2006). Parmi ces cibles se trouvent des gènes codant des facteurs de transcription impliqués dans un grand nombre de processus développementaux, des gènes intervenant dans des voies de signalisation ou des régulateurs du cycle cellulaire (Oktaba et al., 2008). La grande variété de processus régulés par les gènes PcG et la conservation de leurs cibles attestent de l'importance de ces gènes dans le développement de nombreux organismes (Grossniklaus and Paro, 2014). Par exemple, les premiers gènes PcG identifiés chez *Arabidopsis thaliana* l'ont été lors de cribles recherchant des gènes impliqués dans différents processus tels que la formation des organes floraux, la germination ou la vernalisation (Hsieh et al., 2003).

3.2 Les protéines des groupes Polycomb, trithorax et Enhancers de Trithorax et Polycomb

La classification des gènes PcG et trxG, d'abord réalisée d'après des critères génétiques, a évolué afin d'intégrer la fonction moléculaire des produits de ces gènes, ainsi que leur présence au sein de complexes protéiques. En effet, de nombreux produits des gènes PcG et trxG ont été identifiés au sein de complexes multimériques qui fixent la chromatine. Ces complexes protéiques participent au contrôle transcriptionnel de leurs gènes cible, grâce à l'apposition et à la lecture de modifications post-traductionnelles des histones, et au remodelage de la chromatine (Figure 17).

3.2.1 Le groupe Polycomb

Le gène fondateur du groupe, *Polycomb* (*Pc*), a été identifié par Edward Lewis comme un répresseur du complexe BX-C (Lewis, 1978). *Pc* doit son nom au phénotype homéotique de peignes sexuels (ou « sex combs ») ectopiques induit par la mutation d'une copie du gène. Les peignes sexuels sont des structures spécifiques de la première paire de pattes des drosophiles mâles, portées par le segment T1, dont l'identité est spécifiée par le gène Hox

Sex combs reduced (Scr) (Struhl, 1982). La perte de fonction du gène *Pc* induit une expression ectopique de *Scr* dans les segments T2 et T3, où il est normalement réprimé. Ces segments acquièrent donc partiellement une identité de première paire de pattes, qui se traduit chez les mâles par la présence de peignes sexuels ectopiques sur les deuxième et troisième paires de pattes (portées par les segments T2 et T3).

De nombreux autres gènes du groupe PcG ont été identifiés grâce à des mutations induisant des phénotypes homéotiques résultants d'un défaut de maintien de l'expression des gènes Hox, ou lors de cribles visant à rechercher des modificateurs de ces phénotypes (Alonso et al., 2007; Duncan, 1982; Dura et al., 1985; Jürgens, 1985).

L'analyse des mécanismes de répression par les gènes PcG a permis d'identifier deux complexes répresseurs principaux, PRC1 (Polycomb repressive complexe 1) et PRC2, conservés chez la drosophile, les mammifères et les plantes. Le complexe PRC2 de *D. melanogaster* regroupe les protéines Enhancer of zeste (E(Z)), Extra sex combs (ESC), et Suppressor of Zeste 12 (SU(Z)12) (Ng et al., 2000; Tie et al., 2001). ESC et SU(Z)12 sont des sous-unités de PRC2 essentielles à l'activité enzymatique de E(Z), une histone méthyltransférase spécifique de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) (Czermin et al., 2002; Müller et al., 2002). La marque H3K27me3 est spécifique de l'inactivation par les groupes Polycomb ; elle est liée spécifiquement par le chromodomaine de Polycomb (PC), un composant du complexe PRC1, ce qui a conduit à proposer un rôle de PRC2 dans le recrutement de PRC1. Ce dernier complexe contient également les protéines Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (PSC) et dRing/Sex Combs Extra (SCE) (Francis et al., 2001; Kyba and Brock, 1998; Shao et al., 1999). SCE possède une activité E3 ubiquitine ligase spécifique de la lysine 119 de l'histone H2A, et PSC est nécessaire à l'apposition de la marque H2AK119Ub par SCE.

Le gène PcG *calypso* code une ubiquitine hydrolase carboxy-terminale, capable de déubiquitiner spécifiquement H2AK119Ub. Calypso forme avec ASX (Additional sex combs) le complexe PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase), qui est paradoxalement requis pour la répression par les PcG (Scheuermann et al., 2010). Cette observation suggère que la répression par les PcG nécessite une régulation précise du niveau de H2AK119Ub (Gutiérrez et al., 2012; Scheuermann et al., 2012).

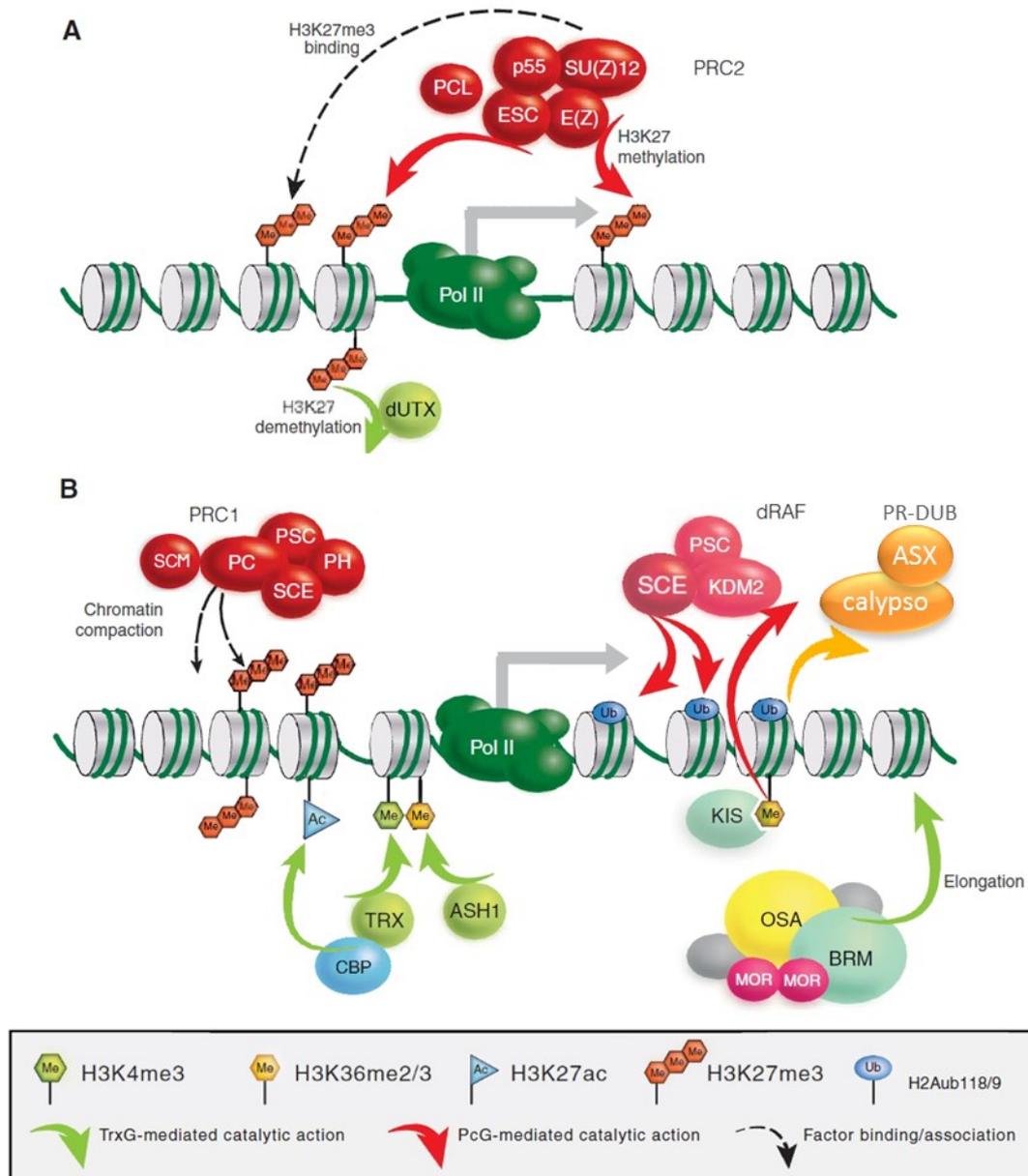


Figure 17. Représentation schématique des principaux complexes Polycomb et trithorax de *D. melanogaster* et de leur mécanisme d'action

- (A) Composants du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2, en rouge) dont l'activité s'oppose aux protéines trxG (en vert clair).
- (B) Composants et fonctions des complexes PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1), dRAF (dRING-associated factor) et PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase), qui s'opposent au complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et aux histone lysine méthyltransférases TRX et ASH1.

Les membres du groupe PcG sont représentés au-dessus de l'ADN, ceux du groupe trxG sont en-dessous.

(Adapté de Grossniklaus and Paro, 2014)

3.2.2 Le groupe trithorax

Les gènes du groupe *trxG* ont été identifiés dans un premier temps car leur mutation induit des phénotypes similaires à une perte de fonction des gènes *Hox* (Ingham and Whittle, 1980; Shearn, 1989). Par exemple la perte de fonction d'une copie du gène *trithorax* (*trx*) induit une transformation des segments abdominaux postérieurs vers une identité de segments abdominaux plus antérieurs, en raison d'une perte d'expression des gènes *abd-A* et *Abd-B* dans ces segments (Ingham and Whittle, 1980). De la même façon, le défaut d'expression de *Scr* dans le segment thoracique T1 induit la transformation partielle de la première paire de pattes vers une identité T2 chez ces mutants, qui est visualisable par une réduction du nombre de dents des peignes sexuels (Ingham and Whittle, 1980). D'autres gènes *trxG* ont été identifiés lors de cribles recherchant des suppresseurs des phénotypes homéotiques des mutants de gènes *PcG* (Kennison and Tamkun, 1988). Ainsi les gènes *trxG* agissent comme des antagonistes des gènes *PcG* dans le maintien de l'expression des gènes *Hox*.

De nombreux produits de gènes *trxG* agissent au sein de complexes protéiques impliqués dans l'activation des gènes (Figure 17). Ces complexes hautement conservés au cours de l'évolution présentent une grande diversité fonctionnelle, qui reflète les nombreuses étapes requises pour l'activation des gènes : décompaction de la chromatine pour augmenter l'accessibilité des séquences d'ADN, recrutement des facteurs de transcription, régulation de la processivité de l'ARN polymérase II (Kingston and Tamkun, 2014).

Certaines protéines du groupe *trxG* modifient post-traductionnellement les queues N-terminales des histones. C'est le cas par exemple de la protéine TRX, présente au sein du complexe TAC1 (Trithorax Acetylation Complex 1), qui présente une activité histone méthyltransférase spécifique de la lysine 4 de l'histone H3 (Smith et al., 2004). TRX interagit avec dCBP (CREB-binding protein), une histone lysine acétyltransférase responsable de la marque activatrice H3K27ac (Petruk et al., 2001). Les marques H3K4me1 et H3K27ac, apposées par TRX et dCBP respectivement, sont nécessaires à l'inhibition de la répression par les complexes *PcG* (Tie et al., 2009, 2014). La protéine *trxG* ASH1 est également impliquée dans la méthylation de différents résidus lysine portés par des histones, tels que

H3K4, H3K9 and H4K20 (Beisel et al., 2002; Tanaka et al., 2007). De plus, ASH1 régulerait positivement l'activité méthyltransférase de TRX (Byrd and Shearn, 2003). Plusieurs propositions ont été formulées pour expliquer comment ces différentes modifications d'histones affectent la transcription. Elles pourraient par exemple modifier la charge des queues d'histones et diminuer la capacité des nucléosomes à former des structures compactes, ce qui augmenterait l'accessibilité des séquences d'ADN. Ces modifications pourraient également créer des sites de liaison de complexes impliqués dans l'activation transcriptionnelle, ou à l'inverse inhiber la fixation des complexes répresseurs PcG (Kingston and Tamkun, 2014).

D'autres protéines trxB sont impliquées dans des modifications de la structure de la chromatine en déplaçant les nucléosomes. Ainsi, les protéines Brahma (BRM), Moira (MOR) et OSA de *D. melanogaster* sont au cœur d'un complexe homologue au complexe SWI/SNF de levure (Kal et al., 2000; Papoulas et al., 1998; Tamkun et al., 1992). Ces complexes augmentent l'accessibilité de l'ADN aux protéines en utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour déplacer les nucléosomes (Kwon et al., 1994; Wang et al., 1996). Le complexe Brahma semble donc impliqué de manière générale dans la transcription (Armstrong et al., 2002).

Enfin certaines protéines classées dans le groupe trxB interagissent directement avec la machinerie transcriptionnelle. Parmi ces protéines se trouve KIS, le produit du gène *kismet*, identifié lors d'un crible de suppresseurs de *Pc* (Kennison and Tamkun, 1988). KIS est un remodelleur de la chromatine qui présente un domaine ATPase et un domaine CHD (Chromatin helicase DNA-binding). Tout comme BRM, KIS agit de manière générale dans l'activation des gènes, mais semble plutôt impliquée lors de l'étape de l'élongation par l'ARN polymérase II (Srinivasan et al., 2005, 2008).

3.2.3 Les Enhancers de Trithorax et Polycomb

La classification des gènes dans les groupes PcG et trxB a été remise en question lorsque des gènes, initialement décrits comme des PcG, ont été identifiés lors de crible de recherche de suppresseurs de phénotypes *Polycomb*. Par la suite, il a été proposé de restreindre les groupes Polycomb et trithorax aux gènes dont le produit a été identifié au

sein d'un des complexes protéiques décrits précédemment, tandis qu'une troisième classe de gènes de mémoire épigénétique, les Enhancers de Polycomb et Trithorax (ETP), serait définie uniquement sur des critères d'interactions génétiques. Cette classe des ETP, hétérogène sur le plan de la fonction moléculaire, regroupe différents types de cofacteurs des PcG et trxG qui peuvent exercer alternativement des rôles dans le maintien de l'activation ou de la répression des gènes.

Cette classification ne résout néanmoins pas le problème de la place de protéines telles que E(Z), qui porte l'activité méthyltransférase du complexe PRC2, et dont la perte de fonction aggrave des phénotypes de type *trithorax*. E(Z) a dans un premier temps été classé dans le groupe des ETP, avant que son appartenance au complexe PRC2 et son activité enzymatique n'aient été identifiées.

Parmi les ETP se trouvent des gènes codant des protéines présentant une activité de liaison séquence-spécifique de l'ADN telles que DSP1 (Dorsal switch protein 1), TRL (Trithorax-like ; aussi appelée GAGA factor), PSQ (Pipsqueak), PHO (Pleiohomeotic) et PHO-like (Figure 18). L'absence de protéines possédant une activité de liaison de l'ADN au sein des complexes PcG et trxG a conduit à formuler l'hypothèse que ces complexes pourraient être recrutés sur la chromatine par les protéines DSP1, TRL et PHO (Déjardin et al., 2005). Ce recrutement a lieu au niveau de séquences régulatrices spécifiques, nommées PRE/TRE (Polycomb/Trithorax Response Element), qui contiennent une association variable des séquences de fixation de PHO, PHO-like, TRL et DSP1. Différentes combinaisons d'ETP pourraient donc permettre le recrutement des complexes PcG ou trxG, participant ainsi au choix entre activation ou répression des gènes cibles (Salvaing et al., 2006) (Figure 18).

D'autres gènes ont été intégrés au groupe des ETP d'après les données génétiques. C'est le cas des gènes *corto* et *Asx* (*Additionnal sex combs*) de *D. melanogaster*. Le gène *corto* code une protéine à chromodomaine (chromatin organization modifier), domaine protéique impliqué dans la reconnaissance de lysines méthylées qu'on retrouve dans différents facteurs chromatinien tels que PC et HP1 (heterochromatin protein 1).

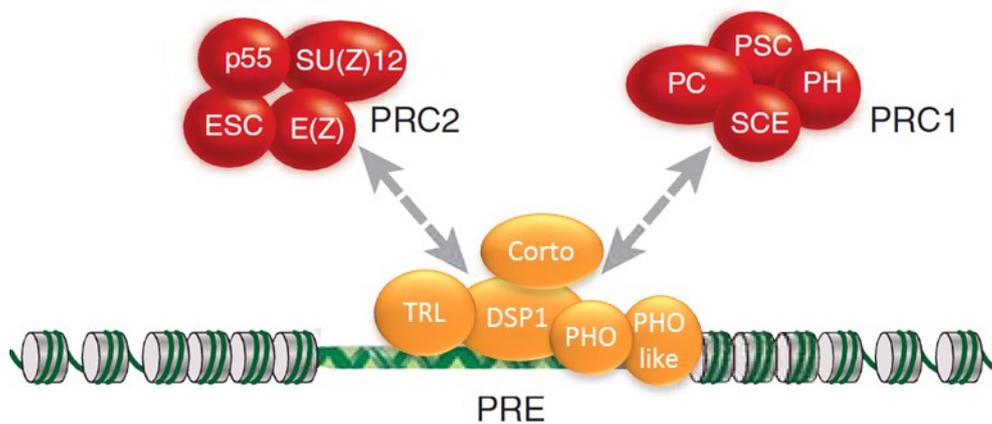


Figure 18. Modèle du recrutement des complexes PcG

Les protéines de la famille des ETP (Enhancer de Polycomb et Trithorax, en orange) présentant un domaine de liaison de l'ADN se fixent au niveau de leurs séquences consensus, présentes dans les PRE (Polycomb response element). La combinatoire de fixation des ETP permettrait le recrutement spécifique des complexes PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) et PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), mais également des complexes TrxG (Trithorax), au niveau de leurs gènes cibles.

(Adapté de Grossniklaus and Paro, 2014)

La perte de fonction de *corto* aggrave le phénotype *trxG* induit par un allèle perte de fonction de *osa*, mais également le phénotypes de peignes sexuels ectopiques dû à la perte de fonction de gènes PcG (Lopez et al., 2001; Kodjabachian et al., 1998). Ces interactions génétiques suggèrent que Corto est impliquée dans le maintien de l'activation de gènes par les protéines *trxG* et dans le maintien de l'état réprimé par les complexes PcG. De plus, Corto interagit physiquement avec les ETP DSP1 et TRL (Salvaing et al., 2003, 2006).

La perte de fonction d'*Asx* chez la drosophile, ou de son homologue murin *ASXL2* induit à la fois des phénotypes de type PcG et de *trxG* (Gildea et al., 2000; Baskind et al., 2009). Cependant, *ASX* a été identifié comme un composant essentiel du complexe Polycomb PR-DUB, impliqué dans la répression dépendante des PcG, mais dont l'activité enzymatique antagonise celle de la sous-unité SCE de PRC1 (Scheuermann et al., 2010).

Les gènes *trxG* *kothalo* et *skuld* codent respectivement Med12 et Med13. Ces protéines forment avec Cycline C/CDK8 le module kinase du complexe Mediator, un large complexe à l'interface des activateurs transcriptionnels et de la formation du complexe de préinitiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Janody et al., 2003). Ces deux gènes ont été initialement identifiés comme des gènes *trxG* lors d'un crible visant à identifier des suppresseurs du phénotype de peignes sexuels ectopiques induits par *Pc* (Kennison and Tamkun, 1988), puis ils ont été trouvés dans un crible recherchant des gènes impliqués dans la répression de *Ubx* dans le disque d'aile (Alonso et al., 2007). Ces gènes semblent impliqués dans la répression ou dans l'activation transcriptionnelle en fonction des cibles, et peuvent donc être classés dans le groupe des ETP.

Un problème soulevé par cette classification est qu'il est difficile d'y trouver une place pour des gènes qui se comportent génétiquement comme des gènes PcG, mais dont le produit n'a pas été identifié dans les complexes PcG. C'est le cas de *cramped* (*crm*) ou de *multi sex combs* (*mxs*). Il sera nécessaire d'améliorer les connaissances concernant la fonction moléculaire des produits de ces gènes, pour déterminer s'ils peuvent être classés dans le groupe PcG.

3.3 Rôles des gènes PcG et trxG dans l'homéostasie des tissus

Un nombre important de travaux démontre également un rôle des gènes PcG dans de nombreux processus de maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, au-delà des aspects développementaux, la compréhension du maintien des identités cellulaires au sein de l'organisme présente un intérêt croissant pour les mécanismes de cancérogenèse, de maintien des cellules souches et de régénération.

La dérégulation des gènes PcG peut aboutir à la formation de tumeurs, possiblement *via* une reprogrammation de l'identité des cellules cancéreuses. Il a par exemple été observé que des clones de cellules perte de fonction pour le gène PcG *ph* dans des disques imaginaux d'œil présentent de la surprolifération, des défauts de polarité, et perdent la capacité de se différencier. Ces cellules se comportent comme des cellules tumorales et envahissent le tissu sain environnant (Martinez et al., 2009). De plus, de nombreuses cellules cancéreuses présentent une dérégulation des gènes PcG et trxG, souvent associée à une réactivation de gènes tels que les gènes Hox. Ces observations sont en faveur de l'idée que la mémoire cellulaire est affectée dans les cellules tumorales (Mills, 2010).

Par ailleurs, le maintien de l'homéostasie des tissus suite à des dommages ou des blessures pourrait impliquer un changement d'identité des cellules saines du tissu afin permettre des processus de régénération et de réparation tissulaire. En effet, des expériences de fragmentation de disques imaginaux de drosophile, transplantés par la suite dans des abdomens de femelles adultes, sont capables de se régénérer. Dans certains cas, un changement d'identité des disques peut être observé (on parle alors de transdétermination). Ce phénomène est associé à une dérégulation de gènes normalement réprimés par les complexes PcG. Il a été montré que l'activation de la voie JNK dans les disques fragmentés induit une répression des gènes *PcG*, ce qui permettrait une plasticité du destin cellulaire (Lee et al., 2005).

Un des processus impliquant les gènes PcG, trxG et ETP est le contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire. Ainsi, l'inhibition de *Pc* dans des cellules S2 résulte en une altération du profil du cycle cellulaire, avec un allongement des phases G2/M (Martinez and Cavalli, 2006). Les composants du complexe PRC1 PH, PSC et SU(Z)2 sont aussi impliqués dans le contrôle de la croissance et de la prolifération des cellules des disques imaginaux

(Oktaba et al., 2008). De plus, des mutations de certains gènes PcG et trxG entraînent des défauts de condensation ou de ségrégation des chromosomes lors des mitoses. Les embryons issus de mères homozygotes mutantes pour *ph-p*, ou portant un allèle mutant de *Pc*, *Psc* ou *Asx*, présentent des ponts chromatiniens en anaphase et en télophase, résultant de défauts de ségrégation des chromatides sœurs (O'Dor et al., 2006). Ces défauts observés lors de la mitose pourraient être la conséquence du déroulement incorrect de phases antérieures du cycle cellulaire. C'est le cas par exemple pour la perte de *ph-p*, qui conduit à un raccourcissement spécifique de la phase S du cycle cellulaire (Beck et al., 2010). L'ensemble de ces observations suggère une implication des protéines de mémoire épigénétique dans le contrôle du cycle cellulaire. Ce rôle pourrait en partie s'exercer *via* la régulation épigénétique de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération. Par exemple, *CycA* est un gène cible des complexes PcG chez la drosophile (Martinez et al., 2006), et les protéines BRM et E(Z) participent à la régulation transcriptionnelle de *Cyclin A* et *E* chez les vertébrés. D'autre part, on peut envisager une interaction directe entre des protéines de mémoire épigénétique et des acteurs du cycle cellulaire, à l'instar de BRM, qui interagit avec Cycline E chez *D. melanogaster* (Brumby et al., 2002).

4 Cycline G de *Drosophila melanogaster*, un acteur du maintien de l'homéostasie tissulaire

Au cours de ma thèse, j'ai abordé les processus de maintien de l'homéostasie des tissus, en étudiant les rôles de Cycline G dans ces processus. En effet, Cycline G est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la croissance, dans la stabilité du développement et dans le maintien des identités cellulaires. Avant de détailler les rôles de Cycline G de *D. melanogaster* dans ces différents processus, je décrirai ce qui est connu des cyclines de type G de mammifère.

4.1 Les cyclines de type G de mammifère

Les mammifères présentent deux cyclines de type G, Cycline G1 et Cycline G2. Cycline G1 a d'abord été identifiée chez le rat comme étant l'homologue de Cig1 de la levure *S. pombe*, une cycline de type B impliquée dans la régulation des phases G1/S du cycle cellulaire (Tamura et al., 1993). Par la suite, deux cyclines de type G ont été identifiées chez les mammifères, Cycline G1 et Cycline G2. Elles sont fortement conservées chez l'homme, la souris et le rat.

Cycline G2 présente 53% d'identité et 72% de similarité avec Cycline G1, et 49% d'identité avec Clb-5, une cycline impliquée dans la phase S chez *S. cerevisiae* (Horne et al., 1996). Parmi les autres cyclines de mammifère, Cycline G1 et G2 présentent la plus grande similitude avec Cycline I, une cycline présente dans les tissus différenciés et impliquée dans la survie cellulaire (Horne et al., 1997).

4.1.1 Régulation de Cycline G1 et G2

L'ARNm de *CCNG1*, le gène codant Cycline G1, ne présente pas de variation d'expression au cours du cycle cellulaire, même si on peut observer une légère augmentation du niveau d'ARNm en fin de phase G1 jusqu'à la fin de la phase G2 dans certaines lignées cellulaires humaines (Horne et al., 1996). Malgré la présence de Cycline G1 tout au long du cycle cellulaire, il semble que sa quantité est finement régulée. Il a en effet été observé que Cycline G1 est une protéine très instable, puisque l'induction de Cycline G1

endogène ou exogène est observée de façon extrêmement transitoire (Piscopo and Hinds, 2008). Par ailleurs, des formes polyubiquitinylées de Cycline G1 ont pu être détectées, et un traitement des cellules avec des inhibiteurs du protéasome induit une stabilisation du niveau de Cycline G1 (Liu et al., 2013). Ces données suggèrent que le niveau de Cycline G1 est régulé au niveau post-traductionnel par la voie ubiquitine-protéasome. Or Cycline G1 de mammifère ne comporte ni séquence PEST ni « cyclin destruction box », les séquences protéolytiques classiquement impliquées dans la dégradation ubiquitine-dépendante des cyclines (Tamura et al., 1993; Horne et al., 1996). De façon intéressante, l'ajout d'une étiquette en N-terminal de la séquence de Cycline G1 induit une stabilisation de la protéine et une absence de forme ubiquitinylée. La dégradation de Cycline G1 pourrait donc être médiée par l'ajout d'ubiquitine directement sur la première méthionine comme cela a été observé pour d'autres protéines (Li et al., 2009).

D'autre part, il a été montré que l'activité de Cdk2 est nécessaire à la dégradation de Cycline E pendant la phase S (Clurman et al., 1996). Un mécanisme de déstabilisation similaire peut être envisagé pour Cycline G1. Ainsi une mutation de la lysine K106 de la cyclin box de Cycline G1, analogue à un acide aminé de Cycline D1 nécessaire pour l'activation mais pas pour la liaison des CDK, entraîne une stabilisation de la protéine (Piscopo and Hinds, 2008). Ces données suggèrent que l'instabilité de Cycline G1 est liée à sa cyclin box et que Cycline G1 pourrait être dégradée suite à l'activation d'un partenaire protéique, à ce jour non identifié.

Contrairement à Cycline G1, Cycline G2 présente un domaine PEST dans sa région C-terminale. L'ARNm de *CCNG2* présente une oscillation au cours du cycle cellulaire dans des lymphocytes, avec un pic d'expression en phase S, ce qui suggère que son rôle est requis durant cette phase en particulier (Horne et al., 1996, 1997). Cycline G2 présente également une forte instabilité et tout comme Cycline G1, elle est rapidement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (Xu et al., 2008).

4.1.2 Rôle des Cyclines G1 et G2 au cours du cycle cellulaire

Le rôle de Cycline G1 au cours du cycle cellulaire est controversé. Ainsi la surexpression de *CCNG1* dans des cellules cancéreuses de côlon induit une augmentation de la prolifération (Smith et al., 1997). *CCNG1* est surexprimé dans de nombreuses cellules cancéreuses et l'inactivation de *CCNG1* par ARN interférent dans ces cellules induit un arrêt de prolifération suggérant un rôle positif de Cycline G1 dans la régulation du cycle cellulaire (Skotzko et al., 1995). Malgré un manque de données concernant le mécanisme exact de cette régulation, des stratégies de thérapie anti-cancéreuses basées sur l'inactivation de *CCNG1* ont été développées, soit en exprimant un dominant négatif délété des séquences N-terminales de Cycline G1 dans des cancers métastatiques (Gordon and Hall, 2010), soit en restaurant dans les cancers hépatiques l'expression de *mir-122*, un micro-ARN spécifique des hépatocytes ayant pour cible l'ARNm de *CCNG1* (Ma et al., 2010).

A l'inverse, la surexpression de *CCNG1* dans d'autres types cellulaires inhibe la prolifération cellulaire et favorise l'apoptose (Liu et al., 2013; Okamoto and Prives, 1999), suggérant que Cycline G1 exerce également un contrôle négatif du cycle cellulaire. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce rôle de Cycline G1, différentes équipes ont recherché ses partenaires protéiques, en s'intéressant en particulier aux CDK et autres kinases dont Cycline G1 pourrait réguler l'activité. Une analyse par coimmunoprécipitation dans des extraits cellulaires a montré que Cycline G1 murine peut se lier à de nombreuses CDK (CDK1, CDK2, CDK4, CDK5 et CDK6) (Piscopo and Hinds, 2008). D'autre part, Cycline G1 interagit également avec une autre serine-thréonine kinase appelée GAK, pour Cyclin G-associated kinase (Kanaoka et al., 1997). A ce jour, aucune activité kinase des complexes Cycline G1/CDK n'a été mise en évidence. Il n'est donc pas démontré que Cycline G1 exerce un rôle dans l'activation de kinases, similaire aux autres cyclines. Une hypothèse serait que Cycline G1 régulerait négativement le cycle cellulaire en empêchant l'activation de différentes CDK par d'autres cyclines, agissant donc comme un inhibiteur de CDK (Okamoto and Beach, 1994).

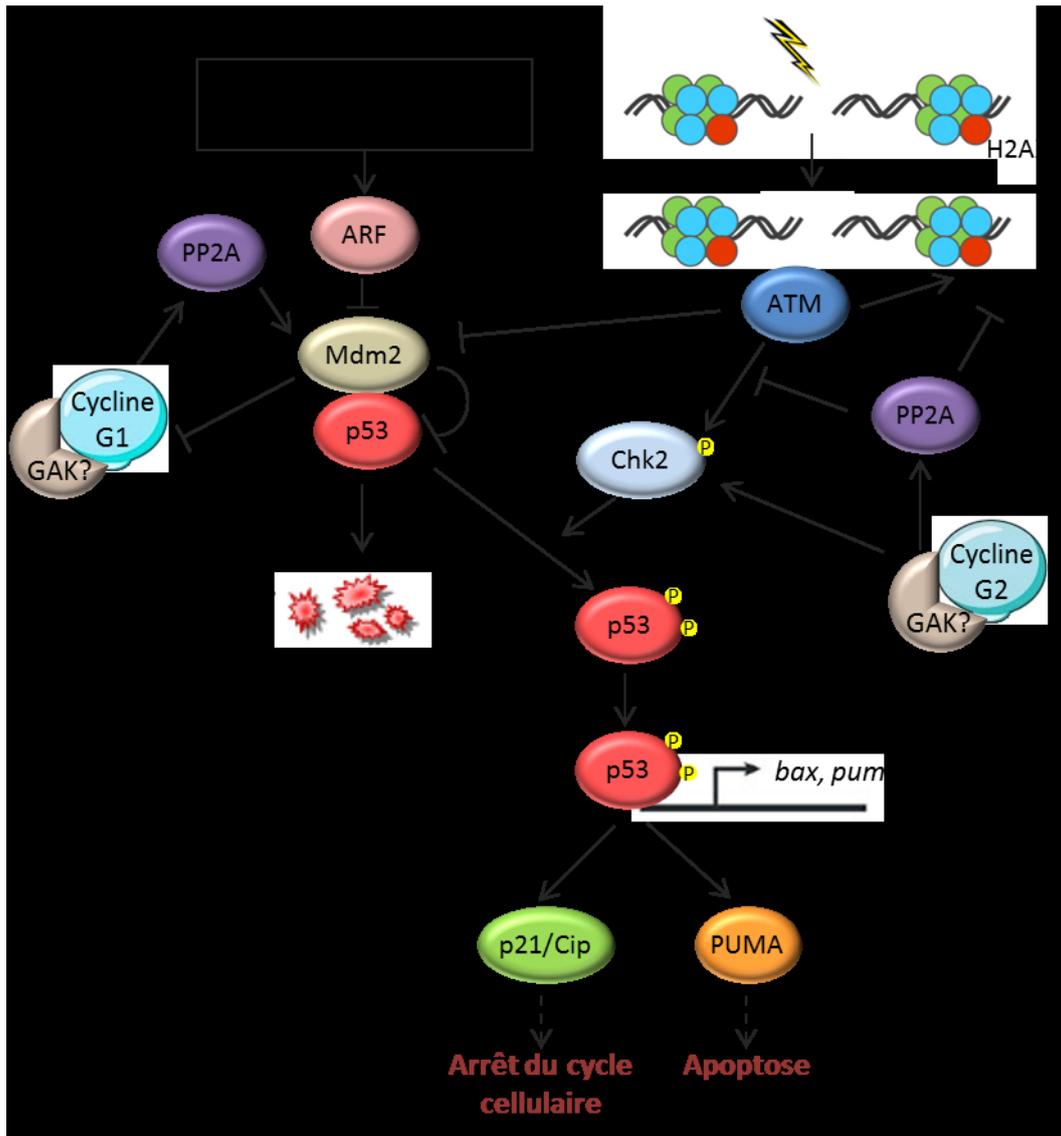


Figure 19. Modèle du rôle de Cycline G1 et Cycline G2 dans la régulation négative du cycle cellulaire par p53

Le suppresseur de tumeur p53 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'induction d'apoptose suite à l'activation d'oncogènes ou à des dommages à l'ADN. L'interaction de p53 avec Mdm2 (Mouse double minute 2) induit son inactivation et sa dégradation par le protéasome. L'activation d'oncogènes induit une répression de Mdm2 par ARF, ce qui lève l'inhibition de p53. Cycline G1 interagit physiquement avec Mdm2 et PP2A (Protéine phosphatase 2A), et favorise la déphosphorylation de Mdm2 par PP2A. Ainsi on peut imaginer que Cycline G1 participe au contrôle négatif de p53 (Okamoto et al., 2002). *CCNG1* est également une cible transcriptionnelle de p53, et pourrait ainsi exercer un rétrocontrôle négatif de la voie p53 (Okamoto and Beach, 1994).

En cas de lésions de l'ADN suite à des irradiations, la voie ATM (Ataxia telangectasia mutated) est activée. La kinase ATM phosphoryle H2AX et la kinase Chk2, qui va alors activer p53 en la phosphorylant. L'activation de p53 par ATM peut également se faire *via* l'inhibition de Mdm2 par phosphorylation. Il a été proposé que Cycline G2 participe à l'arrêt du cycle cellulaire et régule positivement la voie p53 en activant Chk2 (Zimmermann et al., 2012). Par ailleurs, Cycline G2 est recrutée aux foyers de γ H2AX, et participerait à sa déphosphorylation ainsi que celle de Chk2 par PP2A une fois que les lésions de l'ADN sont réparées (Naito et al., 2013).

CCNG2 est sous-exprimé dans des cancers de la thyroïde ou de la cavité orale (Ito et al., 2003; Kim et al., 2004), ce qui suggère que Cycline G2 aurait un rôle négatif dans la prolifération. D'autre part, la surexpression de *CCNG2* induit un arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (Bennin et al., 2002). Il a été montré plus récemment que le domaine C-terminal de Cycline G2 est nécessaire et suffisant à ce contrôle négatif du cycle cellulaire (Arachchige Don et al., 2006).

Ces travaux montrent donc que les deux Cyclines de type G de mammifère sont impliquées dans la régulation négative de la progression du cycle cellulaire, et que Cycline G1 peut également réguler positivement la prolifération, en fonction des types cellulaires.

4.1.3 Rôle des Cyclines G dans la réponse aux lésions de l'ADN

Différentes études ont montré une implication de Cycline G1 et G2 dans la régulation négative de la prolifération en réponse à des lésions de l'ADN.

L'activation du suppresseur de tumeur p53 suite à différents types de stress génotoxiques (irradiation aux rayons gamma, aux UV...) conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 et à de la mort cellulaire par apoptose. *CCNG1* a été identifié comme une cible transcriptionnelle directe de p53 (Okamoto and Beach, 1994). Ces résultats ont conduit à postuler un rôle de Cycline G1 dans le contrôle négatif de la prolifération en réponse à des dommages de l'ADN. Par ailleurs, des souris mutantes pour *CCNG1* sont viables et fertiles, et ne présentent aucun phénotype particulier à l'exception d'une augmentation de la létalité suite à une irradiation aux rayons gamma (Kimura et al., 2001). L'analyse de fibroblastes murins *CCNG1*^{-/-} montre que la sensibilité aux irradiations est associée à un défaut d'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. Ainsi la mortalité induite par la perte de fonction de *CCNG1* pourrait être due à un défaut d'activation du point de contrôle G2/M.

Par ailleurs, Cycline G1 interagit avec la sous-unité B'γ de la phosphatase PP2A (Okamoto et al., 1996) et stimule son activité de déphosphorylation de Mdm2, une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de p53 par le protéasome (Okamoto et al., 2002) (Figure 19). De la même façon, la kinase associée à Cycline G1, GAK, régule positivement l'activité de PP2A en phosphorylant sa sous-unité régulatrice B'γ en réponse à des dommages de l'ADN, mais il reste à démontrer si cette activité de GAK est exercée sous

forme d'un complexe actif avec Cycline G1 (Naito et al., 2012). Cycline G1 exercerait donc, en association ou non avec GAK, un rétrocontrôle négatif sur l'activité de p53, et donc un contrôle positif de la prolifération, en favorisant la déstabilisation de p53 par Mdm2. A l'inverse, une autre étude a décrit un rôle de Cycline G1 dans l'induction d'un arrêt de prolifération médié par ARF (alternative reading frame), mais indépendant de p53 (Zhao et al., 2003). Les auteurs de cette étude proposent que Cycline G1 exercerait des rôles opposés en fonction de sa concentration. Un niveau élevé de Cycline G1 induirait un arrêt du cycle cellulaire *via* la formation de complexes Cycline G1/ARF, tandis qu'un niveau plus faible aurait un effet positif sur la prolifération, médié par son interaction avec PP2A. Le rôle de Cycline G1 pourrait également varier en fonction du type cellulaire.

De façon intéressante, des fibroblastes murins *CCNG2*^{-/-} présentent également une sensibilité aux irradiations. D'autre part, l'inactivation de *CCNG2* par shRNA (short hairpin RNA) empêche l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M suite à l'induction de lésions de l'ADN par la doxorubicine, un inhibiteur de l'ADN Topoisomérase II (Zimmermann et al., 2012). A l'inverse, la surexpression de *CCNG2* induit un arrêt à la transition G1/S dépendant de p53 (Arachchige Don et al., 2006) *via* une activation de la kinase Chk2 (Zimmermann et al., 2012). Enfin, il a été montré que suite à une irradiation, Cycline G2 est recrutée au niveau des foyers de H2AX phosphorylé (γ H2AX) qui marque les cassures de l'ADN (Naito et al., 2013). Tout comme Cycline G1, Cycline G2 interagit avec PP2A B' *via* le domaine en C-terminal de la cyclin box (Bennin et al., 2002). Cycline G2 semble impliquée dans la déphosphorylation de γ H2AX par PP2A et dans la déphosphorylation de Chk2 suite à la réparation des lésions de l'ADN. Les auteurs de cette étude proposent que Cycline G2 serait ainsi impliquée dans la reprise du cycle cellulaire après la réparation des lésions de l'ADN (Naito et al., 2013). Ainsi, tout comme *CCNG1*, *CCNG2* exercerait un rôle complexe dans l'activation du point de contrôle et dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages de l'ADN.

L'ensemble de ces résultats suggère que Cycline G1 et Cycline G2 seraient impliquées dans des processus similaires, tels que la régulation négative du cycle cellulaire et l'activation du point de contrôle suite à des stress génotoxiques. Il reste à déterminer s'il s'agit d'une redondance des fonctions des cyclines de type G de mammifère, ou si elles exercent des rôles complémentaires, chacune étant spécifique d'un type cellulaire ou d'un type de stress.

4.2 Cycline G de *Drosophila melanogaster*, un régulateur du cycle cellulaire

4.2.1 Cycline G, homologue des cyclines de type G chez la drosophile

Le génome de *Drosophila melanogaster* ne comporte qu'un seul gène codant une cycline de type G, *CycG*. Ce gène code pour une protéine de 566 acides aminés, contre 295 et 344 acides aminés pour les Cyclines G1 et G2 humaines, respectivement. La cyclin box de Cycline G présente 42% et 46% d'identité avec celles des Cyclines G1 et G2 (Salvaing et al., 2008a). Cycline G diffère de ses homologues mammifères par la présence d'un long domaine en N-terminal du domaine cycline, qui semble spécifique des diptères, et en particulier des mouches vraies (Faradji et al., 2011).

Tout comme Cycline G2 de mammifère, Cycline G contient un domaine PEST en C-terminal, suggérant qu'elle pourrait être dégradée par la voie ubiquitine protéasome. La quantité de Cycline G aux différentes phases du cycle cellulaire a été analysée dans des cellules en culture d'origine embryonnaire, les cellules S2, triées par FACS. Cette analyse a montré que le niveau de Cycline G est constant durant le cycle cellulaire. De plus, aucune variation de l'ARNm *CycG* n'a été observée dans ces cellules (Faradji et al., 2011). Ces observations suggèrent que le niveau de Cycline G n'est pas régulé au cours du cycle cellulaire dans des cellules S2, mais nous ne pouvons pas exclure qu'il en soit autrement dans d'autres types cellulaires. Par ailleurs, une analyse bio-informatique de la séquence de Cycline G a identifié des sites potentiels de phosphorylation, et un traitement d'extraits cellulaires totaux avec la phosphatase lambda a montré l'existence de formes phosphorylées de Cycline G (équipe de F. Peronnet, données non publiées). L'activité de Cycline G pourrait ainsi être régulée au niveau post-traductionnel.

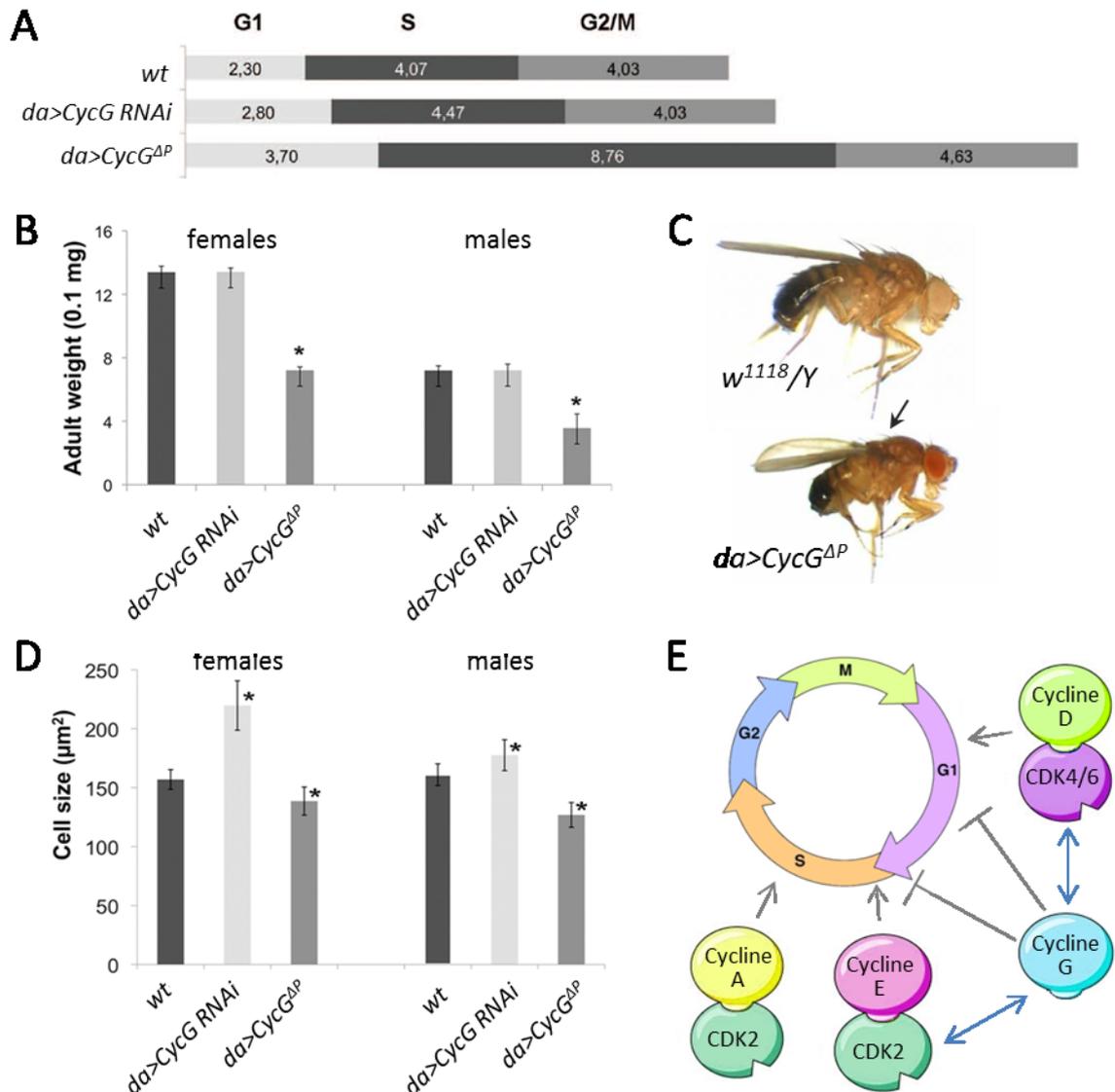


Figure 20. Cycline G régule la croissance cellulaire et la prolifération

- (A) Durée des différentes phases du cycle cellulaire, issues de comptage de cellules de disque imaginal d'aile séparées par FACS en fonction de leur contenu en ADN. La surexpression de *CycG^{ΔP}* allonge la durée des phases G1 et S du cycle cellulaire.
- (B) La surexpression de *CycG^{ΔP}* diminue significativement le poids des drosophiles. Test de student, * $p < 0,0001$ ($n=100$). Les barres d'erreur représentent la déviation standard.
- (C) Les drosophiles surexprimant ubiquitairement *CycG^{ΔP}* présentent une taille réduite et des soies fines (flèche).
- (D) L'inactivation de *CycG* par ARNi augmente la taille moyenne des cellules dans l'aile adulte, tandis que la surexpression de *CycG^{ΔP}* entraîne une diminution. Les cellules ont été comptées pour 20 ailes par génotype, dans trois régions de 256 μm² localisées entre les veines 4 et 5. Test de Mann Whitney, $p < 0,001$.
- (E) Modèle : Cycline G pourrait réguler négativement les phases G1 et S du cycle cellulaire en interagissant avec CDK4/6 et CDK2 (doubles flèches bleues).

(D'après Faradji et al., 2011)

4.2.2 Rôle de Cycline G au cours du cycle cellulaire

L'inactivation ubiquitaire de *CycG* par RNAi tout au long du développement de la drosophile induit une forte létalité, indiquant que *CycG* est un gène essentiel de *Drosophila melanogaster* (Salvaing et al., 2008a). Ce résultat contraste avec la viabilité et la fertilité des souris KO *CCNG1* ou *CCNG2* (Zimmermann et al., 2012; Naito et al., 2012).

L'équipe de Frédérique Peronnet a montré que Cycline G de drosophile régule négativement la croissance cellulaire. En effet, l'inactivation de *CycG* tout au long du développement de la drosophile entraîne une augmentation significative de la taille des cellules dans les ailes adultes (Figure 20D). De plus, une analyse des cellules de disque imaginal d'aile de fin de troisième stade larvaire a permis d'estimer la durée des différentes phases du cycle cellulaire, révélant que l'inactivation de *CycG* rallonge légèrement les phases G1 et S du cycle cellulaire (Figure 20A). Ces données suggèrent que Cycline G est un régulateur négatif de la croissance qui serait impliqué durant les phases G1 et S (Faradji et al., 2011).

La surexpression ubiquitaire de *CycG* ne semble avoir aucune conséquence majeure sur la croissance ou la prolifération cellulaire (équipe de F. Peronnet, données non publiées). Cependant, la surexpression de *CycG* délété de la séquence codant le domaine PEST dans le territoire d'expression de *daughterless* (*da>CycG^{ΔP}*) induit une forte létalité à 25°C (45% pour les femelles et 72% pour les mâles), un retard de développement de plus de 24h et une diminution importante du poids des individus qui arrivent au stade adulte, de 54% pour les femelles et 63% pour les mâles (Faradji et al., 2011) (Figure 20B et C). Ces différences de phénotype entre les mouches présentant une surexpression de *CycG* ou de *CycG^{ΔP}* suggèrent fortement une importance fonctionnelle du domaine PEST dans la régulation de Cycline G. Afin de mieux comprendre les différences entre ces deux contextes génétiques, il sera important de déterminer si Cycline G est dégradée par la voie ubiquitine protéasome et si la délétion du domaine PEST induit une augmentation de la stabilité de la protéine.

Il est intéressant de noter que la surexpression de *CycG^{ΔP}* induit une diminution de la taille des mouches, ce qui indique que ce contexte génétique altère la croissance. L'analyse des cellules du tissu d'œil adulte indique que *CycG^{ΔP}* induit une diminution de la taille et du nombre d'ommatidies. Des résultats similaires sont observés dans l'aile adulte, avec une diminution significative de la taille des cellules (Figure 20D). Dans le disque imaginal d'aile, la surexpression de *CycG^{ΔP}* induit un allongement de la durée du cycle cellulaire, avec une augmentation très importante de la durée des phases G1 et S, ainsi qu'une légère augmentation de la durée des phases G2/M (Faradji et al., 2011). D'après ces données, *CycG^{ΔP}* ralentit fortement le cycle cellulaire, en agissant principalement sur la durée des phases G1 et S (Figure 20A et E).

Cycline G de drosophile pourrait donc exercer un rôle à l'interface entre les mécanismes de contrôle de la prolifération et de la croissance cellulaire. De façon intéressante, des analyses d'interaction protéiques par double hybride suggèrent que, à l'instar de Cycline G1 murine, Cycline G interagit avec CDK1, CDK2, CDK4/6 et CDK5 (Giot et al., 2003; Stanyon et al., 2004). L'interaction physique de Cycline G avec CDK2 et CDK4/6 a été confirmée par coimmunoprécipitation (Faradji et al., 2011), ouvrant la possibilité que Cycline G contrôle la croissance et la prolifération en régulant l'activité de ces CDK, par exemple en les inhibant ou en empêchant leur interaction avec les Cyclines D et E (Figure 20E).

4.2.3 Rôle de Cycline G dans la réparation des cassures double brin induites par la recombinaison méiotique

Un allèle nul de *CycG*, *CycG^{HR7}*, a été récemment généré par mutagenèse dirigée, en délétant précisément le locus de *CycG* par recombinaison homologue (Nagel et al., 2012; Rong et al., 2002). Cet allèle induit une forte létalité à l'état homozygote (50% de létalité pour les femelles, 60% pour les mâles). Les femelles homozygotes qui atteignent le stade adulte sont stériles, et produisent des embryons ventralisés présentant une fusion des appendices dorsaux. Une analyse approfondie a montré que ce phénotype était une conséquence de l'activation anormale d'un point de contrôle méiotique en présence de lésions de l'ADN (Figure 21), *via* les kinases Mei-41 et DmChk2, les homologues des kinases

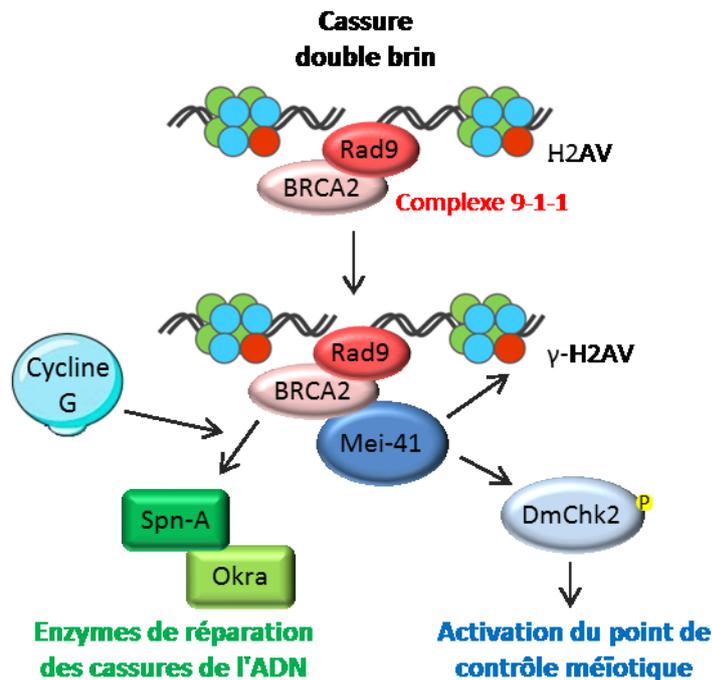


Figure 21. Rôle de Cycline G dans la réparation des cassures double brin de l'ADN induites par la recombinaison méiotique

Les cassures double brin sont détectées par le complexe 9-1-1, composé de Rad9 et BRCA2 (Breast Cancer 2), qui recrute la kinase Mei-41/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related).

Mei-41 phosphoryle le variant d'histone H2AV (γ H2AV), marquant ainsi les cassures non réparées. Mei-41 active également la kinase Chk2, responsable de l'activation du point de contrôle méiotique et de l'arrêt de la méiose permettant la réparation des cassures de l'ADN.

Enfin, le complexe 9-1-1 est également impliqué dans le recrutement des enzymes de réparation Spn-A (spindle-A) et Okra au point de cassure de l'ADN.

Nagel et al., 2012 propose un rôle précoce de Cycline G dans la réparation des cassures induites pendant la recombinaison homologue en méiose, en amont de Mei-41. Cycline G interagit avec le complexe 9-1-1 et avec Spn-A, et pourrait ainsi réguler le recrutement des enzymes de réparation par le complexe 9-1-1.

(D'après Nagel et al., 2012)

ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related) et Chk2 (codée chez la drosophile par le gène *loki*). Les femelles mutantes pour *CycG* présentent une accumulation dans leurs cellules germinales d'une forme phosphorylée du variant d'histone H2A (γ -H2AV) qui témoigne d'un défaut de réparation des cassures double brin de l'ADN induites lors de la recombinaison homologe pendant la méiose (Nagel et al., 2012).

De manière intéressante, Cycline G interagit physiquement avec BRCA2 et Rad9, deux composants du complexe 9-1-1 impliqué dans la reconnaissance des cassures double brin et dans le recrutement des enzymes de réparation telles que Okr et Spn-A (Kooistra et al., 1997; Staeva-Vieira et al., 2003). De plus, un crible double hybride suggère que Cycline G interagit également avec Spn-A (Stanyon et al., 2004). L'ensemble de ces données suggère un rôle précoce de Cycline G dans la réparation des cassures double brin de l'ADN induites pendant la recombinaison homologe en méiose, en régulant l'activité du complexe 9-1-1.

Aucun rôle de Cycline G similaire à celui décrit pour les Cyclines G1 et G2 de mammifère (Figure 19) n'a été démontré dans la réponse aux lésions de l'ADN dans des cellules somatiques. Cependant, des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe de Frédérique Peronnet suggèrent que la surexpression de *CycG^{ΔP}* pourrait favoriser l'apoptose induite par des irradiations aux rayons X dans des disques imaginaires d'aile de troisième stade larvaire (Faradji, 2010), le rapprochant ainsi de ce qui est décrit pour *CCNG1* et *CCNG2* de mammifère (Okamoto and Prives, 1999; Zimmermann et al., 2012). Par ailleurs, une interaction entre Cycline G et WDB (Widerborst, la sous-unité régulatrice B' de PP2A) a été rapportée par deux cribles double-hybride (Giot et al., 2003; Stanyon et al., 2004), suggérant que l'interaction des cyclines de type G avec PP2A B' est conservée chez la drosophile, et que Cycline G pourrait également être impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN dans les cellules somatiques.

L'ensemble de ces données suggère que Cycline G de *D. melanogaster* exercerait des rôles similaires à ceux des cyclines de type G de mammifère, dans la régulation du cycle cellulaire comme dans la réparation des cassures de l'ADN.

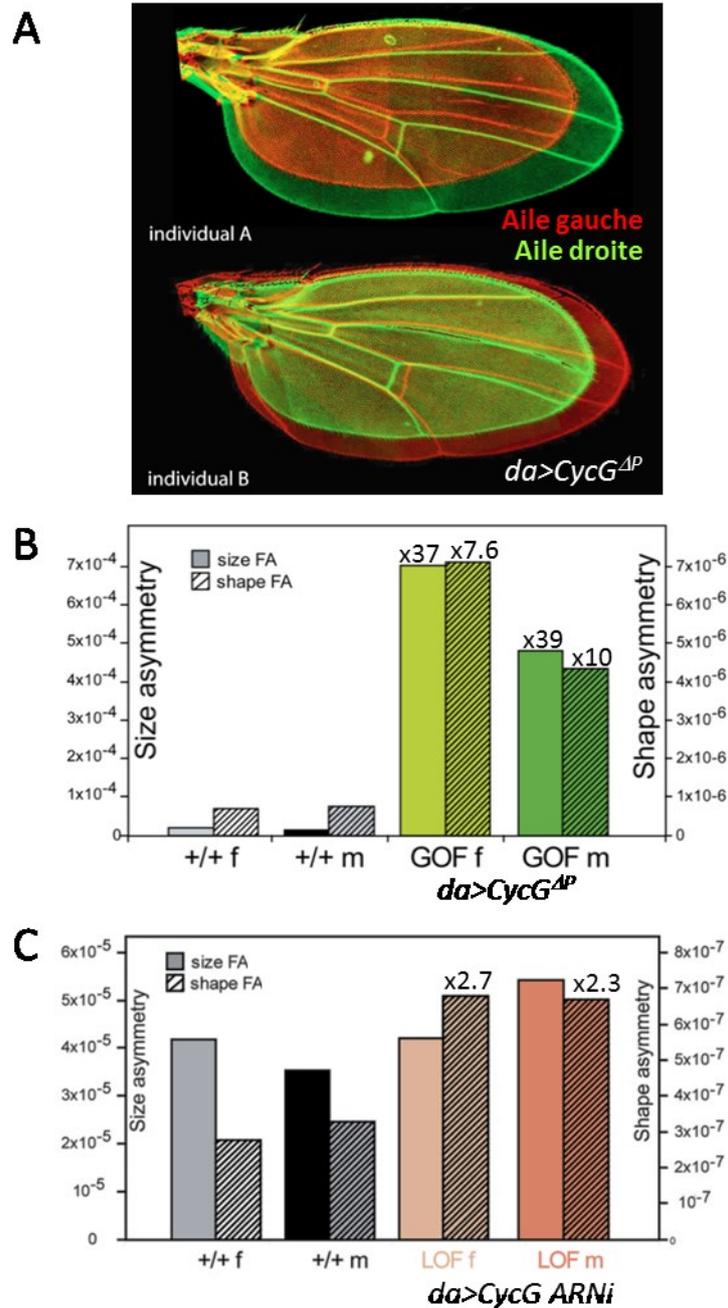


Figure 22. Cycline G, un acteur de la stabilité du développement

(A) La surexpression ubiquitaire de *CycG^{ΔP}* à l'aide du pilote *daughterless (da)* peut induire une asymétrie remarquable des ailes, visible sur ces superpositions des ailes gauche (en rouge) et droite (en vert) d'un même individu.

(B,C) Ces graphiques représentent le niveau d'asymétrie fluctuante (FA) de taille et de forme des ailes (en hachuré) dans des lignées isogénisées. (B) La surexpression de *CycG^{ΔP}* (GOF) induit une forte augmentation de FA de taille et de forme des ailes par rapport au témoin (+/+), chez les mâles comme chez les femelles. (C) L'inactivation de *CycG* par ARNi (LOF) augmente également la FA de forme des ailes. Ces résultats suggèrent que *CycG* est impliqué dans la stabilité du développement chez *D. melanogaster*.

(D'après Debat et al., 2011)

4.3 Cycline G, un acteur majeur de la stabilité du développement

Comme mentionné précédemment, *CycG* est un des rares gènes de *D. melanogaster* connus pour jouer un rôle dans la stabilité du développement.

Des drosophiles surexprimant *CycG*^{ΔP} ubiquitairement à l'aide du système UAS/Gal4 présentent une forte asymétrie des ailes, visible à l'œil nu (Figure 22A). Cette étonnante asymétrie a été analysée en collaboration avec Vincent Debat, spécialiste en morphométrie géométrique qui travaille actuellement à l'Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris). Il s'agit d'une augmentation sans précédent de l'asymétrie fluctuante de taille des ailes, avec une variance augmentée de plus de 30 fois par rapport au témoin (Debat et al., 2011) (Figure 22B). Une analyse plus récente montre que la surexpression de *CycG* entière induit une augmentation faible mais significative de l'AF de taille des ailes (Dardalhon-Cuménal et al., en préparation). L'inactivation de *CycG* par RNAi n'a pas d'effet sur l'AF de taille des ailes, mais elle induit une augmentation significative de l'AF de leur forme (Figure 22C), indiquant que *CycG* exerce un rôle dans la stabilité du développement.

L'augmentation d'AF induite par la surexpression de *CycG*^{ΔP} a été observée dans deux fonds génétiques différents, et en utilisant différents pilotes (*Act*, *da*, *sd*). De plus, la surexpression d'autres facteurs contrôlant la prolifération ou la croissance (*s6k*, *dm*, *Cdk4*, *CycD*) n'entraîne pas d'augmentation d'AF. Ces résultats montrent que ce phénotype n'est pas dû à une variabilité du système de surexpression utilisé, et semble spécifique de *CycG*. Par ailleurs, cet effet de *CycG*^{ΔP} n'est pas spécifique du tissu d'aile. En effet, ce contexte génétique augmente aussi significativement l'AF de longueur des fémurs, un autre caractère quantitatif continu. Il est intéressant de noter l'absence de corrélation entre la symétrie des ailes et des fémurs chez un même individu, ce qui est cohérent avec le caractère stochastique du bruit développemental.

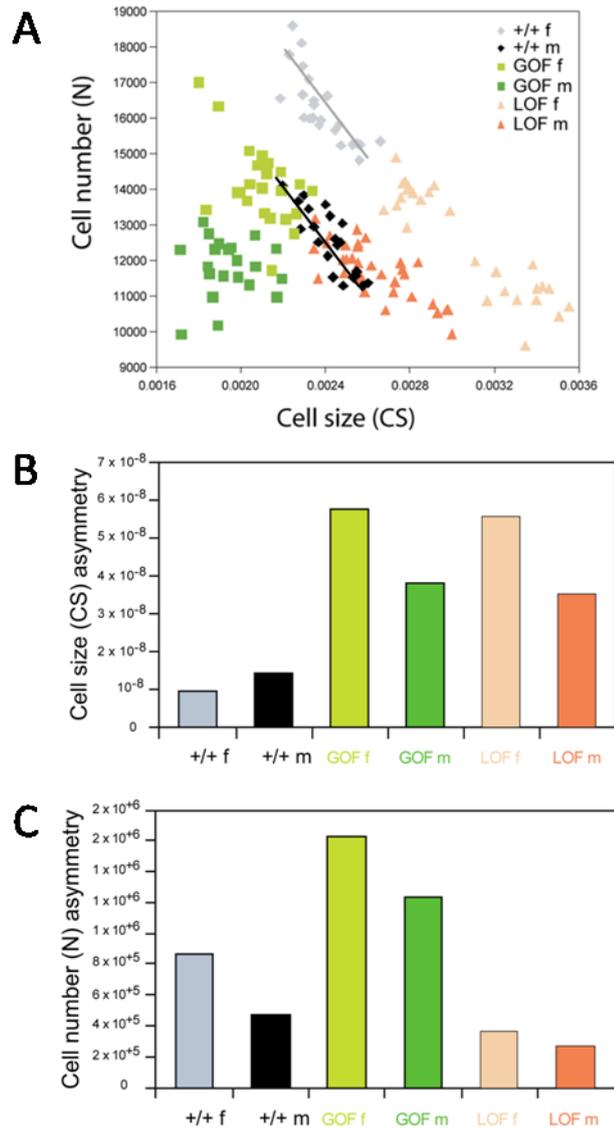


Figure 23. Bases cellulaires de l'asymétrie fluctuante (AF) induite par la surexpression de $CycG^{\Delta P}$

(A) Relation entre la taille des cellules (CS) et le nombre de cellules (N) dans une même aile. Chaque point du graphique représente une aile. Les ailes contrôle (+/+), en gris et noir) présentent une corrélation négative entre ces deux paramètres, qui est altérée par la surexpression de $CycG^{\Delta P}$ (GOF, en vert).

(B-C) AF de la taille des cellules (B) et du nombre de cellules (C) dans l'aile, dans le même échantillon que (A). (B) L'AF de taille des cellules est fortement augmentée par la surexpression de $CycG^{\Delta P}$ et par l'inactivation de $CycG$ par ARNi (LOF). L'AF de nombre de cellules dans l'aile est augmentée par la surexpression de $CycG^{\Delta P}$.

(D'après Debat et al., 2011)

Afin de mieux comprendre les bases cellulaires de cette AF élevée, le nombre et la taille des cellules dans l'aile adulte ont été quantifiés (Figure 23). Dans une population de mouches contrôle, on observe une forte corrélation négative entre ces deux paramètres, c'est-à-dire que les variations de taille des cellules sont compensées par des variations du nombre de cellules dans l'aile, permettant une taille des ailes constante. De façon intéressante, cette corrélation négative est fortement perturbée lorsque *CycG^{ΔP}* est surexprimé, suggérant qu'une compensation entre le nombre et la taille des cellules contribue à assurer la stabilité du développement de l'aile. Lorsque *CycG^{ΔP}* est surexprimé, tout comme lorsque *CycG* est inactivé par RNAi, on observe une augmentation forte de l'AF de taille des cellules, et un effet moindre sur l'AF du nombre de cellules. De plus l'asymétrie de taille des ailes est corrélée à l'asymétrie de taille des cellules, pour un même individu. Il semble donc que les variations de taille des cellules contribuent majoritairement à l'augmentation d'AF de taille des ailes (Debat et al., 2011).

Ainsi la dérégulation de *CycG* perturbe l'homéostasie de la formation des organes au cours du développement, ce qui se traduit notamment par un défaut de la régulation fine de la taille et de la forme des ailes. L'augmentation d'AF de taille des ailes pourrait provenir d'un découplage entre croissance et prolifération cellulaire, associée à une augmentation de la variabilité de croissance cellulaire.

4.4 Cycline G, un partenaire de l'Enhancer de Trithorax et Polycomb Corto

Une autre particularité de Cycline G est son interaction avec le facteur chromatinien de la famille des Enhancers de Trithorax et Polycomb Corto. Cycline G a en effet été isolée au cours d'un crible double-hybride destiné à identifier des partenaires de Corto. Cycline G et Corto interagissent physiquement *via* leurs domaines N-terminaux (Salvaing et al., 2008a). Des immunomarquages de chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves de troisième stade montrent que Cycline G se lie à la chromatine en de nombreux loci, et qu'elle partage 30 à 40% de ces sites de fixation avec Corto. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre Cycline G et Corto pourrait avoir lieu sur la chromatine (Salvaing et al., 2008a).

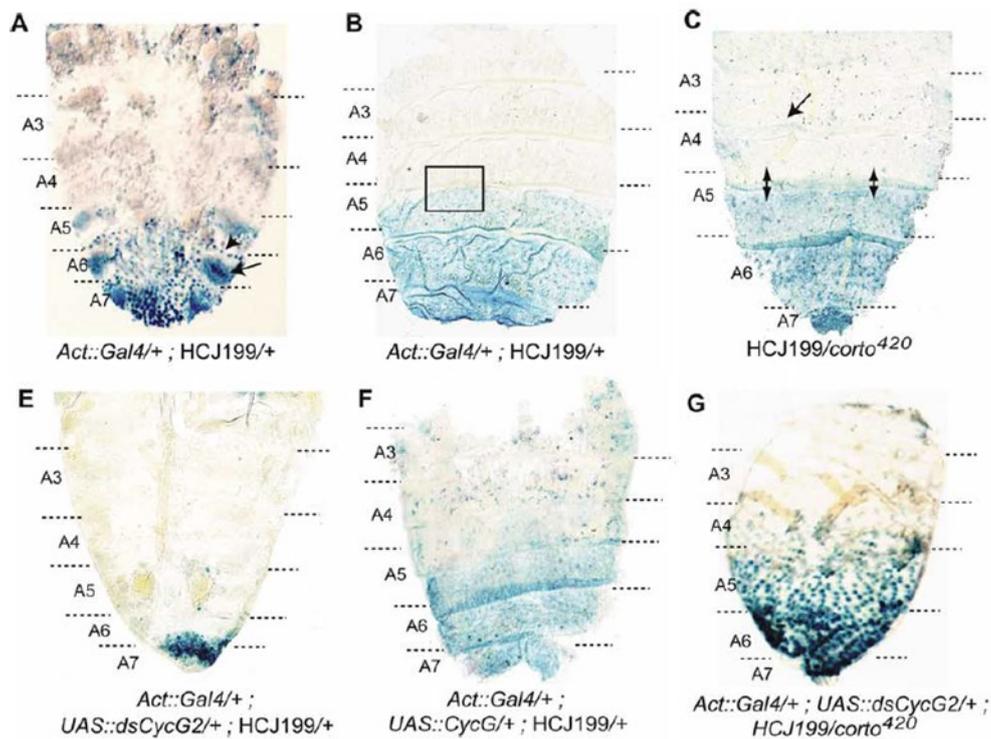


Figure 24. Cycline G et Corto s'opposent dans la régulation de l'expression du gène *Abd-B* dans les épithéliums abdominaux de pupe.

Expression du gène *Abd-B* dans des épithéliums abdominaux de pupes femelles, visualisée grâce à un rapporteur *lacZ* (*HcJ199*) inséré dans les séquences *cis*-régulatrices du gène. Marquage β -galactosidase des épithéliums abdominaux 24h après formation de la pupe (APF) (A) ou 48h APF (B-G).

(A-B) Pupes contrôles *Act::Gal4/+; HcJ199/+*. *Abd-B* est exprimé du segment A4 au segment A7 selon un gradient croissant.

(C) La mutation *corto*⁴²⁰ (*HcJ199/corto*⁴²⁰), induit une augmentation du marquage dans une partie du segment A4. Certaines cellules du compartiment postérieur du segment A3 expriment aussi *Abd-B* (flèches).

(E) L'inactivation de *CycG* par ARNi (*Act::Gal4/+; UAS::dsCycG2/+; HcJ199/+*), supprime l'expression d'*Abd-B* dans le segment A5 et dans une grande partie du segment A6.

(F) La surexpression de *CycG* (*Act::Gal4/+; UAS::CycG/+; HcJ199/+*) induit une expansion antérieure du domaine d'expression de *Abd-B*.

(G) L'association de *corto*⁴²⁰ et de l'inactivation de *CycG* par ARNi (*Act::Gal4/+; UAS::dsCycG2/+; HcJ199/corto*⁴²⁰) restaure l'expression normale d'*Abd-B*. Cependant le développement des histoblastes est affecté, comme en témoigne la taille augmentée des noyaux.

(Salvaing et al., 2008b)

De plus, *CycG* participe avec *corto* au contrôle de l'expression du gène homéotique *Abd-B* dans l'épithélium abdominal au cours de la métamorphose. L'expression d'*Abd-B* a été analysée dans des épithéliums abdominaux de pupes femelles, en utilisant un rapporteur *lacZ* de l'activité des séquences *cis*-régulatrices d'*Abd-B* (HCJ99). Dans des pupes contrôle, *Abd-B* est exprimé selon un gradient croissant, du segment abdominal 4 (A4) au segment A7. Il a été observé que, tandis que la mutation *corto*⁴²⁰ étend le domaine d'expression d'*Abd-B*, l'inactivation de *CycG* par ARNi (*Act>dsCycG2*) supprime l'expression d'*Abd-B* dans le segment A5 et dans une grande partie du segment A6. Ces résultats suggèrent que Corto agit comme un répresseur d'*Abd-B*, alors que Cycline G agirait comme un activateur (Salvaing et al., 2008b) (Figure 24). Cette régulation transcriptionnelle pourrait être directe puisque Cycline G et Corto se fixent au niveau du PRE (Polycomb Response Element) *iab-7* et du promoteur d'*Abd-B* en embryon (Salvaing et al., 2008a). Une hypothèse intéressante serait que Cycline G régulerait l'activité de Corto, par exemple en modifiant son niveau de phosphorylation. Néanmoins, la perte de fonction de *corto* ne semble pas modifier le profil de fixation de Cycline G sur les chromosomes polytènes. Corto n'est donc pas indispensable au recrutement de Cycline G à la chromatine. Ainsi, la présence de Cycline G sur la chromatine ne serait pas réduite à un rôle de Cycline G dans une modification post-traductionnelle de Corto.

L'ensemble de ces données suggère que Cycline G est impliquée dans le contrôle de la transcription par les protéines de mémoire cellulaire. Le rôle de Cycline G dans ces processus reste encore à explorer.

5 Présentation du projet de thèse

Lorsque j'ai commencé mon travail de thèse, il avait été montré que Cycline G de *Drosophila melanogaster* régulait négativement la croissance cellulaire et le cycle cellulaire (Faradji et al., 2011). D'autres études avaient montré que l'activité de Cycline G est importante pour la stabilité du développement et pour la régulation fine de la taille finale des organes (Debat et al., 2011). Par ailleurs, Cycline G participerait à la régulation transcriptionnelle en interagissant avec des facteurs chromatinien qui maintiennent la mémoire épigénétique de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires (Salvaing et al., 2008a, 2008b). Ainsi Cycline G exercerait des rôles divers qui convergeraient vers un rôle général dans la régulation de l'homéostasie des tissus.

Mes travaux de thèse visent à améliorer la compréhension du rôle de Cycline G dans le maintien de l'homéostasie du développement. Pour cela, l'objectif de ma thèse était double. Il s'agissait dans un premier temps d'éclaircir le rôle de Cycline G dans le contrôle épigénétique de la transcription par les protéines des groupes Polycomb (PcG), Trithorax (trxG) et ETP. J'ai ainsi montré que Cycline G interagit avec un autre membre du groupe des ETP, ASX (Additional sex combs). L'analyse des interactions génétiques entre *CycG* et des gènes des groupes PcG, trxG et ETP montre que Cycline G participe avec ces protéines chromatinien à la régulation de l'expression des gènes homéotiques *Scr* et *Ubx*. Cycline G semble exercer alternativement un rôle dans l'activation et dans la répression des gènes, à l'instar des protéines du groupe ETP. Ces résultats seront présentés dans la Partie 1 du chapitre Résultats.

Par ailleurs, je me suis intéressée au rôle de Cycline G dans le contrôle du bruit développemental, et à l'asymétrie fluctuante (AF) accrue induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}*. Ce phénotype reflète une perturbation de la stabilité du développement, mais les processus cellulaires sous-jacents sont peu connus. Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle du bruit développemental, j'ai recherché par une approche par gènes candidats des modificateurs de l'AF induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}*. Les résultats obtenus, présentés dans la Partie 2, suggèrent que des gènes impliqués dans des processus tels que la régulation de la prolifération, de la croissance, de la survie et le maintien des identités cellulaires seraient également requis pour le contrôle du bruit

développemental. Parmi les gènes identifiés lors de ce crible se trouvaient différents acteurs de la compétition cellulaire, un mécanisme *via* lequel des cellules entraînent l'apoptose de cellules voisines de moindre capacité proliférative, et qui intervient dans les processus de cancérisation. Les rôles de la compétition cellulaire au cours du développement sont peu connus. Les résultats obtenus par la recherche de modificateurs de l'AF induite par *CycG^{ΔP}* suggèrent que la compétition cellulaire pourrait participer au contrôle du bruit développemental. J'ai donc débuté une série d'expériences visant à mieux comprendre les liens potentiels entre Cycline G, stabilité du développement et compétition cellulaire. Les résultats préliminaires de cette étude seront présentés dans la Partie 3.

II RESULTATS

1 Cycline G et le maintien des identités cellulaires au cours du développement

1.1 Présentation de l'article

Au début de ma thèse, un ensemble de données suggéraient que Cycline G de *Drosophila melanogaster* était impliquée dans le contrôle de la transcription par les protéines de mémoire cellulaire. Les travaux précédents avaient notamment montré que Cycline G était présente sur la chromatine de glandes salivaires larvaires, où elle colocalise en plusieurs sites avec l'Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP) Corto et la protéine du groupe Polycomb PH. De plus, Cycline G interagit physiquement avec Corto, et ces deux protéines participent ensemble à la régulation de l'expression du gène Hox *Abd-B* (Salvaing et al., 2008a, 2008b). Par ailleurs, un crible double hybride réalisé dans le laboratoire de Hugh Brock (Dietrich et al., 2001) avait montré une interaction entre Cycline G et ASX, un autre membre de la famille des ETP. Dans une première partie de mon travail de thèse, j'ai donc analysé les relations de Cycline G avec les protéines assurant le maintien épigénétique de l'expression des gènes au cours du développement.

J'ai dans un premier temps confirmé l'interaction physique entre Cycline G et ASX par coimmunoprécipitation, en cellules S2 exprimant des formes étiquetées des deux protéines, mais également *in vivo* dans des larves L3 exprimant *Myc-CycG*. Ces interactions de Cycline G avec deux membres du groupe des ETP renforcent l'idée de l'existence des liens étroits entre Cycline G et les mécanismes de maintien des identités cellulaires par les complexes Polycomb (PcG) et trithorax (*trxG*). Afin d'explorer ces liens, j'ai mené une étude des interactions entre *CycG* et des gènes des groupes PcG (*Pc*, *ph*, *E(z)*, *esc*, *mx*, *crm*), *trxG* (*ash1*, *brm*, *trx*) et ETP (*Asx*, *corto*, *dsp1*). L'ensemble des données obtenues lors de cette étude a montré que la surexpression ubiquitaire de *CycG^{AP}* supprime des transformations homéotiques de mutants PcG et augmente des transformations de mutants *trxG*, tandis que l'inactivation de *CycG* par ARNi a des effets opposés. J'ai ensuite réalisé des immunomarquages de disques imaginaux de larve de fin de troisième stade, qui ont montré

que ces changements phénotypiques sont corrélés à une modification du profil des protéines SCR et UBX. Ensemble, ces données suggèrent un rôle de *CycG* dans la répression des gènes homéotiques *Scr* et *Ubx* au cours du développement. Dans ce contexte, *CycG* se comporte donc génétiquement comme un répresseur de type *Polycomb*.

Par ailleurs, nous avons observé que Cycline G est présente majoritairement au niveau des interbandes de DAPI, riches en gènes activement transcrits, sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires larvaires. De plus, Cycline G co-localise en de nombreux sites avec l'ARN Polymérase II phosphorylée sur la sérine 2 de son domaine C-terminal, une forme généralement associée à l'élongation de la transcription. Ainsi, la fixation de Cycline G sur la chromatine semble préférentiellement couplée à un état transcriptionnel actif. Ceci est en accord avec le rôle de *CycG* comme activateur du gène *Abd-B*, décrit lors de travaux antérieurs (Salvaing et al., 2008b).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que *CycG* pourrait se comporter alternativement comme un activateur ou un répresseur, en fonction de la cible transcriptionnelle, du type cellulaire ou du stade développemental. *CycG* exercerait ainsi un rôle similaire à celui d'un ETP dans le maintien des identités cellulaires au cours du développement.

Ces données ont été publiées dans l'article suivant :

Dupont, C.A., Dardalhon-Cuménal, D., Kyba, M., Brock, H.W., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2015) *Drosophila* Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development. *Epigenetics & Chromatin*, 8, 18.

1.2 Article : *Drosophila* Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development

2 Cycline G, homéostasie tissulaire et stabilité du développement

Nous avons vu que *CycG* est impliqué dans la stabilité du développement, qui désigne l'ensemble des mécanismes qui assurent le contrôle des variations stochastiques pouvant affecter les processus développementaux, autrement dit les mécanismes contrôlant le bruit développemental. La surexpression de *CycG^{ΔP}* induit une forte asymétrie fluctuante, particulièrement remarquable au niveau des ailes (Debat et al., 2011). Ce phénotype reflète une augmentation du bruit développemental et traduit une altération des mécanismes de régulation fine de la taille des organes, notamment un défaut de compensation entre le nombre et la taille des cellules dans l'aile. Afin de mieux comprendre cet effet de la surexpression de *CycG^{ΔP}* et son rôle dans le maintien de l'homéostasie des tissus, nous avons réalisé plusieurs cribles visant à identifier les gènes impliqués dans la stabilité du développement.

2.1 Bases génétiques de la stabilité du développement

Deux cribles à grande échelle précédemment publiés ont révélé que la délétion de certaines régions du génome peut affecter la stabilité du développement, perturbant soit la symétrie de taille, soit la symétrie de forme des ailes (Breuker et al., 2006; Takahashi et al., 2011). Ces cribles n'ont cependant pas mené à l'identification de gènes impliqués dans cette perte de symétrie. La surexpression de *CycG^{ΔP}* fournit un contexte génétique qui affecte fortement la stabilité du développement. Nous avons tiré parti de ce contexte potentiellement plus adapté à révéler des perturbations de la stabilité du développement afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle du bruit développemental. Nous avons pour cela recherché des modificateurs (enhancers ou suppresseurs) du phénotype d'AF élevée de la taille des ailes induit par la surexpression de *CycG^{ΔP}*, au cours de cribles par gène candidat d'une part, et d'un crible à l'échelle du génome d'autre part.

Je décrirai dans un premier temps l'approche par gènes candidats, qui a fait l'objet de mon travail de thèse, et les résultats obtenus grâce à cette approche. Puis je présenterai le crible à l'échelle du génome, dans lequel j'ai été impliquée durant la phase de mise au point.

2.1.1 Crible de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats

Au cours de ce crible par gènes candidats, nous avons testé l'implication dans la stabilité du développement d'acteurs de l'homéostasie des tissus, présentés en introduction. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des gènes des groupes PcG, trxG et ETP impliqués dans le maintien des identités cellulaires. Puis nous avons étudié des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire et l'organisation du disque imaginal d'aile (*wg* et *dpp*), ainsi que des gènes qui contrôlent la croissance (*dm*, des gènes des voies Hippo et Insuline/TOR). Enfin, nous avons testé les gènes déjà connus pour être impliqués dans la stabilité du développement *dilp8* et *Hid*, ainsi que des gènes impliqués dans un processus de maintien de l'homéostasie tissulaire : la compétition cellulaire.

- **Mode opératoire du crible**

Ce crible consiste à comparer l'AF de plusieurs populations de mouches élevées strictement dans les mêmes conditions : des mouches témoins de la souche de référence *w¹¹¹⁸*, des mouches hétérozygotes pour une mutation (ou un variant) d'un gène candidat, des mouches surexprimant *CycG^{ΔP}*, et des mouches associant surexpression de *CycG^{ΔP}* et la mutation (ou le variant) du gène candidat. D'un côté, des femelles portant la mutation d'intérêt ont été croisées avec des mâles de la souche de référence *w¹¹¹⁸*. Dans les cas de surexpression et d'inactivation de gènes candidats par ARNi, les femelles ont été croisées avec des mâles apportant le pilote ubiquitaire *da::Gal4* dans le fond génétique de référence. Les gènes candidats, ainsi que les allèles et différents outils de dérégulation utilisés lors de ce crible sont présentés dans les [Tableaux 1 à 4](#). Afin de surexprimer *CycG^{ΔP}*, nous avons utilisé un chromosome recombinant, noté *CycG GOF*, qui porte les transgènes *da::Gal4* et *UAS::CycG^{ΔP}* dans le fond génétique de référence. Pour tester l'effet de chaque mutation d'intérêt sur l'AF induite par *CycG^{ΔP}*, nous avons croisé des femelles portant cette mutation avec des mâles *CycG GOF*.

Gène	Allèle/ARNi	Classe de mutation	Mutagène	Lignée	Nature de la lésion	Référence	
trxG	<i>ash1</i>	<i>ash1[B1]</i>	hypomorphe	BL 5045		Gindhart and Kaufman, 1995	
	<i>brm</i>	<i>brm[Z]</i>	amorphe	BL 3619		Tamkun et al., 1992	
	<i>kis</i>	<i>kis[1]</i>	perte de fonction	BL 431		Daubresse et al., 1999	
	<i>osa</i>	<i>osa[308]</i>	perte de fonction	BL 5949		Treisman et al., 1997	
	<i>trx</i>	<i>trx[E2]</i>	amorphe	BL 3621		Kennison and Tamkun, 1988	
PcG	<i>esc</i>	<i>esc[21]</i>	amorphe	BL 3623	Mutation ponctuelle S301F	Gindhart and Kaufman, 1995	
	<i>E(z)</i>	<i>E(z)[63]</i>	amorphe	-	Mutation ponctuelle M11 qui élimine le codon d'initiation de la traduction	Carrington and Jones, 1996	
	<i>Pc</i>	<i>Pc[1]</i>	amorphe	BL 1728		Capdevila et al., 1986	
	<i>ph-p</i>	<i>ph-p[410]</i>	perte de fonction	BL 5813	Inversion dans la répétition proximale de <i>ph</i>	Dura et al., 1987	
	<i>Psc</i>	<i>Psc[1]</i>	hypomorphe	BL 4200		Jürgens, 1985	
	<i>Scm</i>	<i>Scm[D1]</i>	amorphe	BL 2406	Décalage du cadre de lecture entraînant la délétion du domaine SPM	Breen and Duncan, 1986	
	<i>corto</i>	<i>corto[420]</i>	amorphe	Excision élément P	-	complète	Kodjabachian et al., 1998
		<i>corto[11]</i>	perte de fonction	EMS	BL 4788		Rougeot et al., 2013
		<i>crm[7]</i>	perte de fonction	Rayons X	BL 4281		Shannon et al., 1972
	<i>Dsp1</i>	<i>Dsp1[1]</i>	perte de fonction	Excision élément P	-	Rétention de 17bp de la séquence de l'élément P et délétion de l'ORF de <i>Dsp1</i> jusqu'à la position +4346	Mosrin-Huaman et al., 1998
<i>mxc</i>	<i>mxc[G46]</i>	hypomorphe	EMS	BL 32114	Mutation ponctuelle Q1643@	Santamaria and Randscholt, 1995	
<i>Trl</i>	<i>Trl[13c]</i>	hypomorphe	Insertion élément P	BL 58473	Insertion de P[bluetail] dans le premier intron	Farkas et al., 1994	

Tableau 1. Allèles de gènes des groupes Polycomb (PcG), trithorax (trxG) et Enhancer de Polycomb et Trithorax (ETP) utilisés lors du criblage de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats.

Dans le but de réduire les variations environnementales pouvant affecter le développement, les croisements ont été réalisés dans des conditions standardisées. Les croisements ont été réalisés en 5 répliquats, en utilisant 6 femelles et 5 mâles âgés de 2 à 4 jours. Les croisements ont été réalisés à 25°C, et les parents ont été transvasés dans un nouveau tube tous les deux jours afin d'éviter la surpopulation. Les descendants de ces croisements, portant la mutation d'intérêt à l'état hétérozygote, seule ou associée à *CycG GOF*, ont été collectés.

Les ailes d'un échantillon de 30 femelles, sélectionnées au hasard dans cette descendance, ont été montées entre lame et lamelle par Valérie Ribeiro, technicienne de l'équipe. Les lames ont été scannées de manière automatisée à l'aide d'un Nanozoomer (Hamamatsu). La longueur de chaque aile est évaluée en mesurant la distance séparant la jonction entre les veines longitudinales L4 et L5, et la jonction entre la veine L3 et la marge de l'aile, c'est-à-dire la distance entre les points de repères 3 et 13 (Figure 13B) à l'aide du logiciel ImageJ. Pour chaque série expérimentale, les ailes sont mesurées deux fois par le même expérimentateur afin d'estimer l'erreur de mesure. L'AF de longueur des ailes a ensuite été analysée en collaboration avec Vincent Debat (MNHN, Paris). La significativité des résultats a été évaluée par des tests F de comparaison de variance.

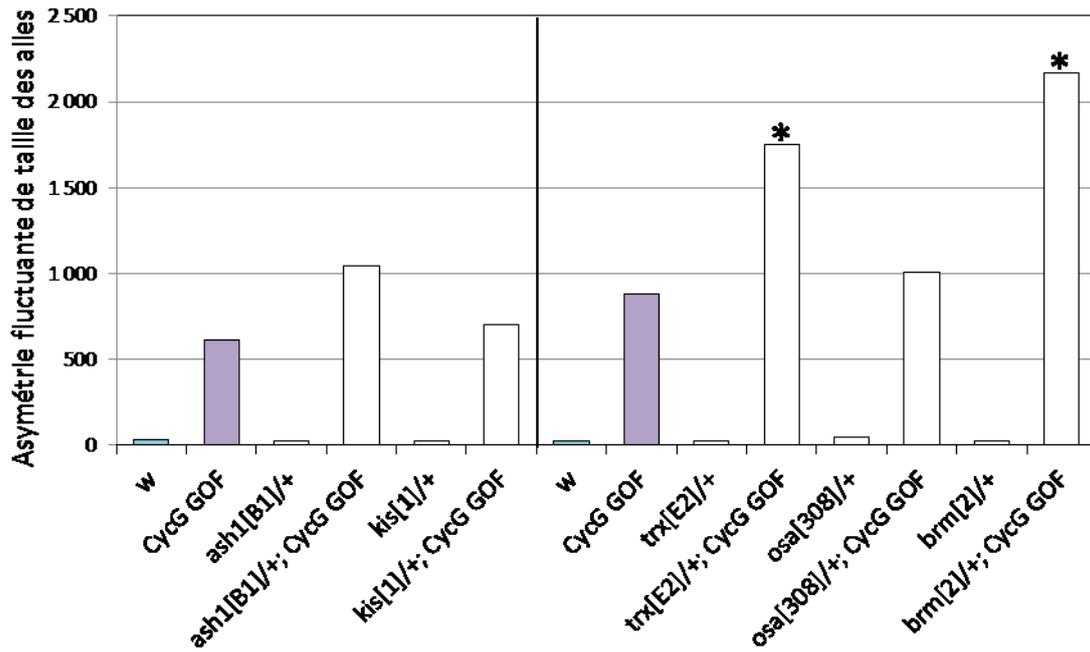


Figure 25. Effet de mutations de gènes du groupe trithorax sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* (*da>CycG^{ΔP}*, en violet). * $p < 0,05$, Test F.

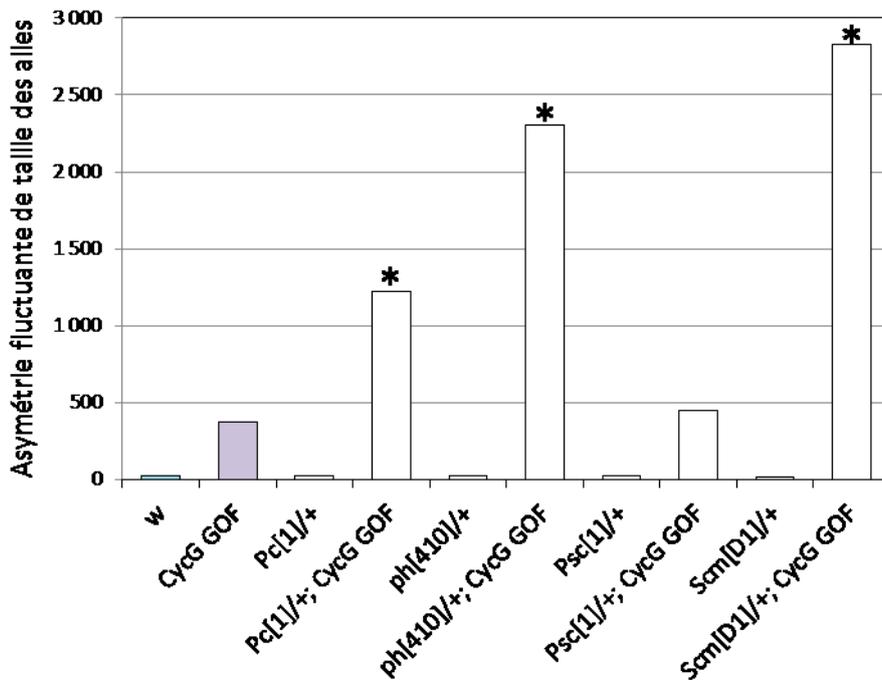


Figure 26. Effet de mutations de gènes du groupe Polycomb, codant des composants du complexe PRC1, sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. *CycG GOF* : *da>CycG^{ΔP}*. * $p < 0,05$, Test F.

- **Gènes des groupes PcG, trxG et ETP impliqués dans le maintien des identités cellulaires**

Nous avons montré une implication de *CycG* dans le maintien des identités cellulaires en interaction avec les gènes des groupes PcG, trxG et ETP. Ces gènes régulent l'expression d'un grand nombre de gènes cibles, qui sont impliqués dans des processus variés. On peut donc poser l'hypothèse que Cycline G pourrait également interagir avec les gènes de mémoire cellulaire dans la régulation de gènes impliqués dans la stabilité du développement. Nous avons testé si la perte de fonction de gènes des groupes PcG, trxG et ETP modifie le phénotype d'AF élevée induit par la surexpression de *CycG^{ΔP}*.

Nous avons dans un premier recherché si des mutations perte de fonction de gènes du groupe trxG (*ash1*, *kis*, *trx*, *osa* et *brm*) (Tableau 1) avaient un effet sur l'amplitude de l'AF de taille des ailes par comparaison avec un témoin *w¹¹¹⁸*. Aucune des mutations testées n'affecte l'AF à l'état hétérozygote (Figure 25). Cependant, en association avec la surexpression de *CycG^{ΔP}*, la perte de fonction de *trx*, ainsi que celle de *brm* (allèles amorphes *trx^{E2}* et *brm²*), qui codent des composants des complexes TAC1 et SWI/SNF, augmentent significativement le phénotype d'AF élevée associé à la surexpression de *CycG^{ΔP}* (Figure 25). Ces résultats suggèrent que ces facteurs qui assurent le maintien de l'état activé des gènes sont impliqués dans la stabilité du développement, et donc dans des processus contrôlant le bruit développemental.

Nous avons testé si des allèles perte de fonction de gènes du groupe PcG codant des composants du complexe PRC1 (PC, PSC, PH et SCM) avaient un effet sur l'AF, seul ou en association avec la surexpression de *CycG^{ΔP}* (Tableau 1). Alors qu'aucun des allèles testés n'affecte l'AF à l'état hétérozygote, tous à l'exception de *Psc¹* augmentent fortement l'AF en association avec *CycG^{ΔP}* (Figure 26), suggérant que le complexe PRC1 est impliqué dans la stabilité du développement. A l'inverse, des allèles amorphes de *E(z)* et *esc*, qui codent deux protéines du complexe PRC2, n'ont pas d'effet sur l'AF de taille des ailes, seuls ou en association avec la surexpression de *CycG^{ΔP}* (Figure 27).

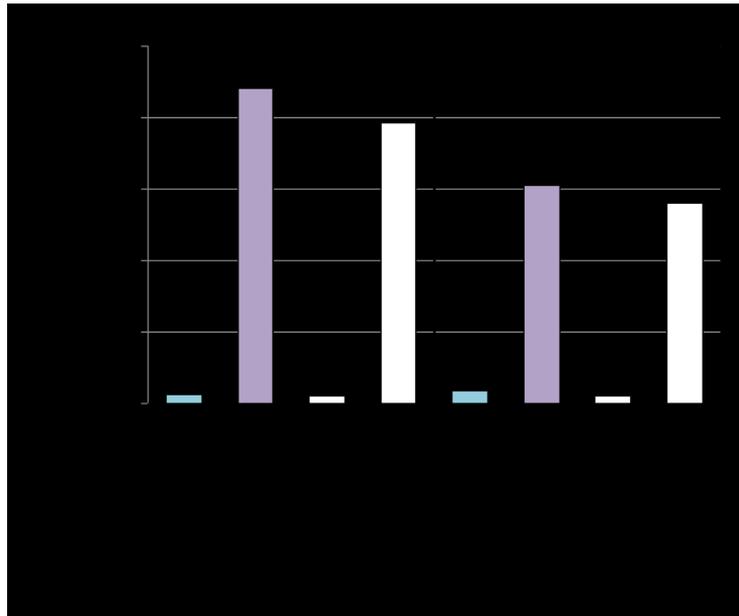


Figure 27. Effet de mutations de gènes du groupe Polycomb codant des sous-unités du complexe PRC2 sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* (*da>CycG^{ΔP}*, en violet).

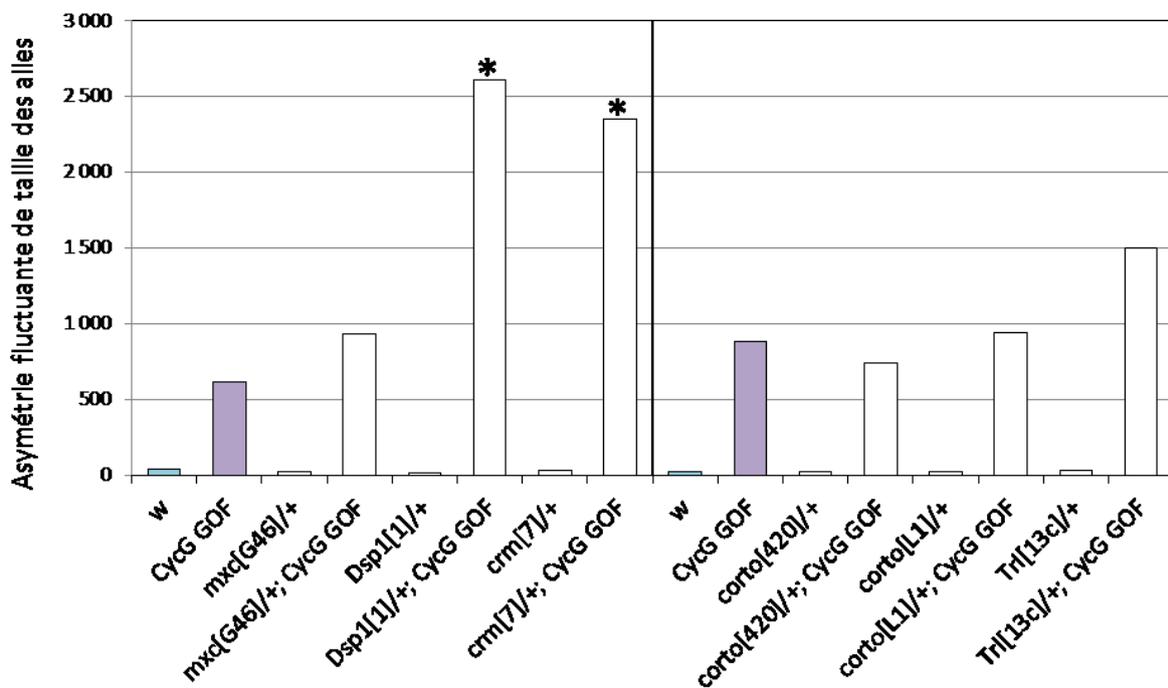


Figure 28. Effet de mutations de gènes du groupe ETP sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* (*da>CycG^{ΔP}*, en violet). * $p < 0,05$, Test F.

Enfin nous avons analysé l'effet de mutations perte de fonction de différents gènes du groupe ETP (*mxo*, *Dsp1*, *crm*, *corto* et *Trl*) sur l'AF induite par *CycG^{AP}* (Tableau 1). Les résultats présentés dans la Figure 28 suggèrent que CRM et DSP1, une protéine potentiellement impliquée dans le recrutement des complexes PcG et TrxG au niveau de leurs gènes cible grâce à son domaine de liaison à l'ADN, pourraient être importantes pour le contrôle du bruit développemental.

Ces résultats, dont une partie sera sera intégrée à une publication (Dardalhon-Cuménal et al., en préparation), suggèrent que le complexe Polycomb PRC1 et les complexes Trithorax contenant TRX et BRM seraient importants pour assurer la stabilité du développement. On peut émettre l'hypothèse que parmi les nombreux gènes cibles de ces complexes, se trouveraient des gènes impliqués dans le contrôle du bruit développemental.

Stabilité du développement	Gène	Allèle/ARNi	Classe de mutation	Mutagène	Lignée	Nature de la lésion	Référence
		<i>dilp8</i>	<i>dilp8[M100727]</i>	perte de fonction	Insertion Mi{MIC}	BL 33079	Insertion de Mi{MIC} dans le premier intron
gènes RHG		<i>Df(3L)H99</i>	amorphe	Rayons Y	BL 1576	Déletion 75C1-75C2	Abbott and Lengyel, 1991
		<i>hid[M106452]</i>		Insertion Mi{MIC}	BL 43065	Insertion de Mi{MIC} dans le premier intron	Venken et al., 2011
		<i>hid[05014]</i>	amorphe	Insertion élément P	-	Insertion de P{PZ} dans la séquence codante, entre les codons 105 et 106	Grether et al., 1995
Morphogènes	<i>dpp</i>	<i>dpp[5]</i>		Rayons X	BL 2071	Délétion qui affecte les séquences régulant l'expression de <i>dpp</i> dans les disques	St Johnston et al., 1990
		<i>dpp[12]</i>	hypomorphe	Rayons X	BL 2070	Délétion qui affecte les régions 3' UTR contrôlant l'expression de <i>dpp</i> dans les disques imaginaires	St Johnston et al., 1990
				Insertion élément P	BL 12379	Insertion de P{PZ} dans région 5' UTR	Karpen and Spradling, 1992
	<i>wg</i>		amorphe	EMS	BL 5351		van den Heuvel et al., 1993
		<i>wg[1-17]</i>	amorphe	Rayons X	BL 2980	Délétion de 2,7kb qui enlève le premier exon	van den Heuvel et al., 1993

Tableau 2. Allèles des gènes impliqués dans la stabilité du développement, et des morphogènes *dpp* et *wg*, utilisés lors du criblage de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats.

- **Interactions de *hid* et *dilp8* avec *CycG*^{AP} pour maintenir la stabilité du développement ?**

Les seuls gènes montrés comme étant impliqués dans la stabilité du développement sont *CycG*, *dilp8* et le gène pro-apoptotique *hid* (Debat et al., 2011; Garelli et al., 2012; Neto-Silva et al., 2009). Il était donc particulièrement intéressant de déterminer comment l'association entre la surexpression de *CycG*^{AP} et les pertes de fonctions de *dilp8* et *hid* pouvait affecter l'AF de taille des ailes. Nous avons pour cela testé un allèle perte de fonction de *dilp8*, deux allèles de *hid* et la délétion *Df(3L)H99* qui découvre les gènes *reaper*, *hid*, *grim* et *sickle*, codant les facteurs pro-apoptotiques de la famille RHG (Tableau 2, Figure 29).

Nous n'avons pas détecté d'effet sur l'AF de l'allèle *dilp8* en contexte hétérozygote mutant, ni seul ni en association avec le contexte de surexpression de *CycG*^{AP} (Figure 29). Ce point sera discuté en détail dans le chapitre Discussion et perspectives.

Un allèle de *hid*, *hid*^{M106452}, ainsi que la délétion *Df(3L)H99* augmentent significativement l'AF induite par *CycG*^{AP} (Figure 29). Cependant un autre allèle, *hid*⁰⁵⁰¹⁴, décrit comme amorphe, n'a pas d'effet à l'état hétérozygote sur l'amplitude de l'AF due à la surexpression de *CycG*^{AP}. L'allèle *hid*^{M106452} est causé par l'insertion dans le premier intron d'un transgène Mi{MIC} (*Minos*-mediated integration cassette). Cette cassette comporte un site accepteur suivi de codons STOP dans les trois phases de lecture et d'un site de polyadénylation. Par conséquent, l'insertion de ce transgène dans des introns entraîne une interruption de la transcription et de la traduction (Venken et al., 2011). L'allèle *hid*^{M106452} provoque donc vraisemblablement la production d'une protéine tronquée, qui pourrait avoir un effet plus fort qu'un allèle amorphe, en agissant comme un dominant négatif. Par ailleurs, l'effet fort de la délétion *Df(3L)H99* pourrait s'expliquer par un effet combiné de la délétion de *hid* et des autres gènes codant des protéines RHG.

Ces résultats semblent confirmer que le contrôle de la survie cellulaire par les gènes pro-apoptotiques de la famille RHG serait important pour la stabilité du développement.

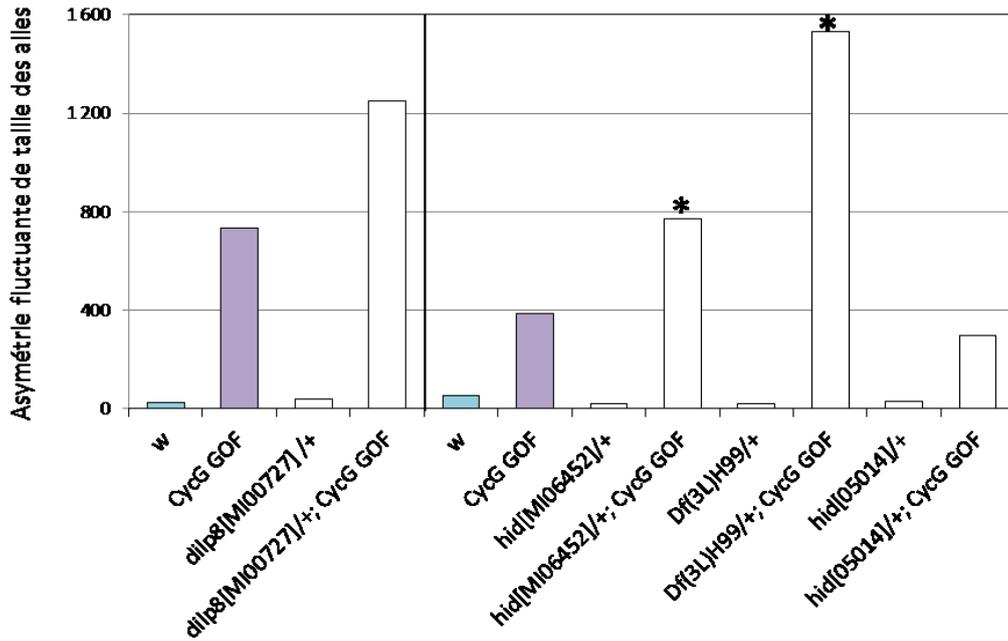


Figure 29. Effet de la perte de fonction des gènes *dilp8* et *hid* impliqués dans la stabilité du développement, sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* ($da > CycG^{\Delta P}$, en violet). * $p < 0,05$, Test F.

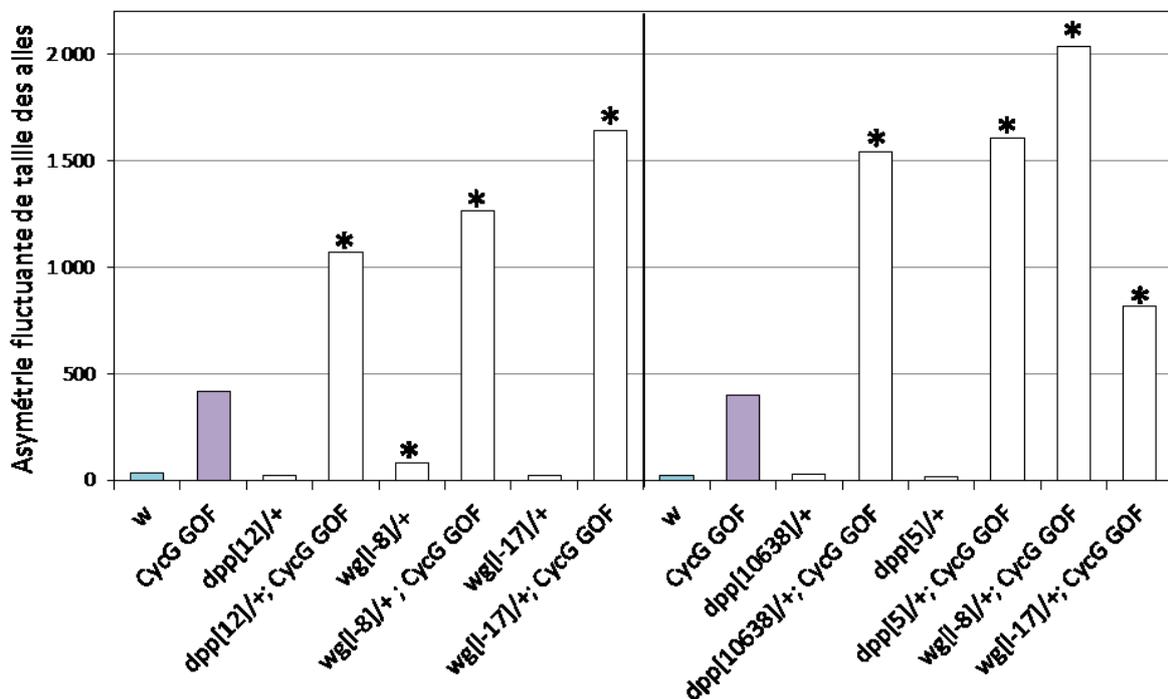


Figure 30. Effet de mutations des gènes *dpp* et *wg* sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* ($da > CycG^{\Delta P}$, en violet). * $p < 0,05$, Test F.

- **Des mutants des morphogènes *dpp* et *wg*, impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire affectent-ils le contrôle du bruit développemental ?**

La régulation de la prolifération cellulaire est un composant majeur de l'homéostasie du développement. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la régulation fine de la taille des organes, nécessaire pour la stabilité du développement, impliquerait des gènes qui contrôlent la prolifération. Les morphogènes *Wg* et *Dpp* contrôlent à la fois la prolifération et l'organisation du disque imaginal d'aile. Nous avons donc analysé l'implication des gènes *wg* et *dpp*, dont l'activité est cruciale pour le développement de l'aile, dans la stabilité du développement. Nous avons testé trois allèles de *dpp* (un allèle hypomorphe, *dpp*¹², et deux allèles non caractérisés, *dpp*⁵ et *dpp*¹⁰⁶³⁸, qui affectent potentiellement les séquences régulatrices de *dpp*) et deux allèles amorphes de *wg*, *wg*^{l-8} et *wg*^{l-17} (Tableau 2). De manière intéressante, l'allèle *wg*^{l-8} induit en lui-même une augmentation d'un facteur 2,3 de l'AF de longueur des ailes par rapport au témoin *w*¹¹¹⁸. De plus, tous les allèles de *wg* et de *dpp* que nous avons testés augmentent significativement l'amplitude de l'AF induite par la surexpression de *CycG*^{ΔP} (Figure 31).

Ces résultats soulèvent l'intéressante possibilité d'une implication majeure de *wg* et *dpp* dans la stabilité du développement de l'aile, soit *via* leur rôle de mitogène, soit *via* leur rôle dans l'organisation de l'aile au cours du développement.

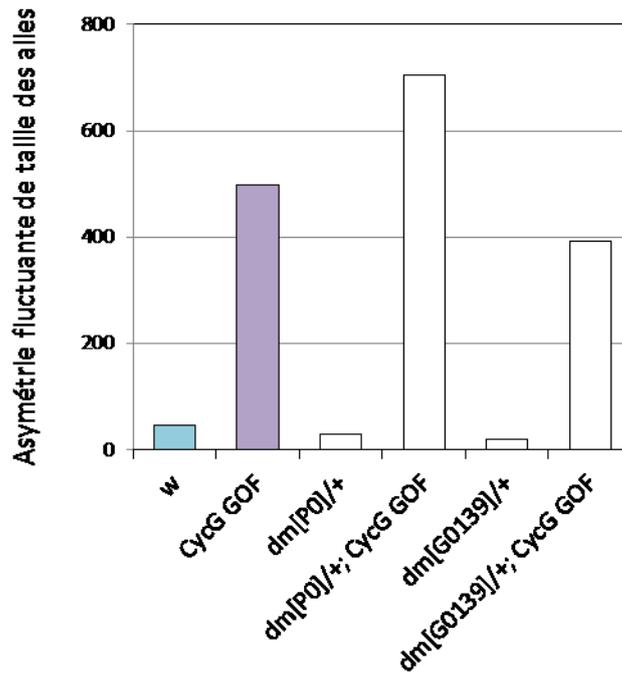


Figure 32. Effet de mutations du gène *dm* sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. *CycG GOF* : $da > CycG^{\Delta P}$.

- **Certains gènes impliqués dans la régulation de la croissance des organes participeraient au contrôle du bruit développemental**

L'AF très importante de la taille des ailes induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}* est le reflet d'un défaut de compensation entre la taille des cellules et le nombre de cellules composant le tissu. De plus, une analyse approfondie a révélé que l'AF de taille des cellules est majoritairement responsable de l'AF de taille des ailes (Debat et al., 2011) (Figure 23). Cette observation suggère une implication des mécanismes de régulation de la croissance cellulaire dans la stabilité du développement. Nous avons donc testé si des mutants de différents facteurs participant aux mécanismes de contrôle de la croissance, tels que Myc, la voie Insuline/TOR et la voie Hippo, affectent également l'AF de taille des ailes, soit seuls, soit en association avec la surexpression de *CycG^{ΔP}*.

Nous avons dans un premier temps étudié le rôle de Myc, régulateur positif de la croissance, en testant l'effet de deux allèles hypomorphes du gène *dm*, *dm^{P0}* et *dm^{G0139}* (Tableau 3). Aucun de ces allèles n'affecte l'AF de taille des ailes, seul ou en association avec de *CycG^{ΔP}* (Figure 32). Ces résultats suggèrent soit que *dm* n'est pas essentiel pour assurer la stabilité du développement, soit qu'une dose de *dm* serait suffisante pour contrôler le bruit développemental.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la voie Insuline/TOR, impliquée dans l'adaptation de la croissance en réponse à l'environnement. D'une part, nous avons testé deux allèles du gène *Tor*, qui code une kinase régulant positivement la biogenèse des ribosomes et l'initiation de la traduction, *Tor^{k17004}* et *Tor^{ΔP}* (Tableau 3).

	Gène	Allèle/ARNi	Classe de mutation	Mutagène	Lignée	Nature de la lésion	Référence
Myc	<i>dm</i>	<i>dm[G0139]</i>		Insertion élément P	BL 11935	Insertion de P{lacW} dans la région 5'UTR	Peter et al., 2002
		<i>dm[P0]</i>	hypomorphe	Insertion élément P	BL 11298	Insertion de P{P-Sal} 99nt en amont des séquences codantes	Johnston et al., 1999
Voie InR/Tor	<i>foxo</i>	<i>foxo[M102660]</i>		Insertion Mi{MIC}	BL 37585	Insertion de Mi{MIC} en amont du site d'initiation de la traduction	Venken et al., 2011
		<i>foxo[Delta94]</i>	perte de fonction	Excision élément P	BL 42220	Délétion de 20kb, qui enlève une partie du promoteur et de la séquence codante	Slack et al., 2011
	<i>Tor</i>	<i>Tor[k17004]</i>		Insertion élément P	BL 11218	Insertion de P{lacW} dans la région 5'UTR, 211bp en amont du site d'initiation de la traduction.	Zhang et al., 2000
		<i>Tor[DeltaP]</i>		Excision élément P	BL 7014	Délétion des 902 premiers codons.	Zhang et al., 2000
	<i>ex</i>	<i>ex[k12913]</i>		Insertion élément P	BL 11067	Insertion de P{lacW} dans la région 5'UTR	Bellen et al., 2004
	<i>fat</i>	<i>fat[4]</i>	hypomorphe	EMS	BL 5405		Garola et al., 2000
Voie Hippo	<i>fat</i>	<i>fat[8]</i>	perte de fonction	Insertion élément P	BL 5406	Mutation ponctuelle S981@	Bryant et al., 1988
		<i>hippo</i>	<i>hippo[KC202]</i>	perte de fonction	FLPase, EMS	BL 25090	Substitution Leu en Val entre le domaine kinase et les domaines d'auto-régulation
	<i>hippo</i>	<i>hpo[K5240]</i>	perte de fonction	FLPase, EMS	BL 25085	Mutation ponctuelle W518@	Udan et al., 2003
		<i>kibra</i>	<i>kibra[EY03746]</i>		Insertion élément P	BL 19909	Insertion de P{EPgy2} dans la région 5'UTR
	<i>mats</i>	<i>mats[e03077]</i>	perte de fonction	Insertion piggyBac	BL 18115	Insertion de P{Bac{RB}} dans le premier intron	He et al., 2005
	<i>Merlin</i>	<i>Mer[4]</i>	amorphe	EMS	BL 9104	Mutation ponctuelle Q170@	Lalouesse et al., 1998
	<i>yorkie</i>	<i>yki[B5]</i>	amorphe	Recombinaison homologue	BL 36290		Huang et al., 2005

Tableau 3. Allèles de gènes impliqués dans la croissance utilisés lors du criblage de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats.

De manière intéressante, nous avons observé une augmentation de l'AF de taille des ailes d'un facteur 4, chez les femelles $Tor^{AP}/+$ (Figure 33). De plus, les deux allèles de *Tor* que nous avons testés augmentent significativement l'AF induite par $CycG^{\Delta P}$. D'autre part, nous avons analysé l'effet de deux allèles du gène *foxo*, qui code un facteur de transcription contrôlé par la voie InR (Tableau 3). Un allèle perte de fonction, $foxo^{\Delta 94}$, augmente significativement l'AF induite par $CycG^{\Delta P}$ (Figure 33) et l'allèle $foxo^{M102660}$, non caractérisé, pourrait également augmenter l'AF ($p=0,051$, $n=1$). L'ensemble de ces résultats suggère que la voie Insuline/TOR serait importante pour maintenir la symétrie des organes et la stabilité du développement.

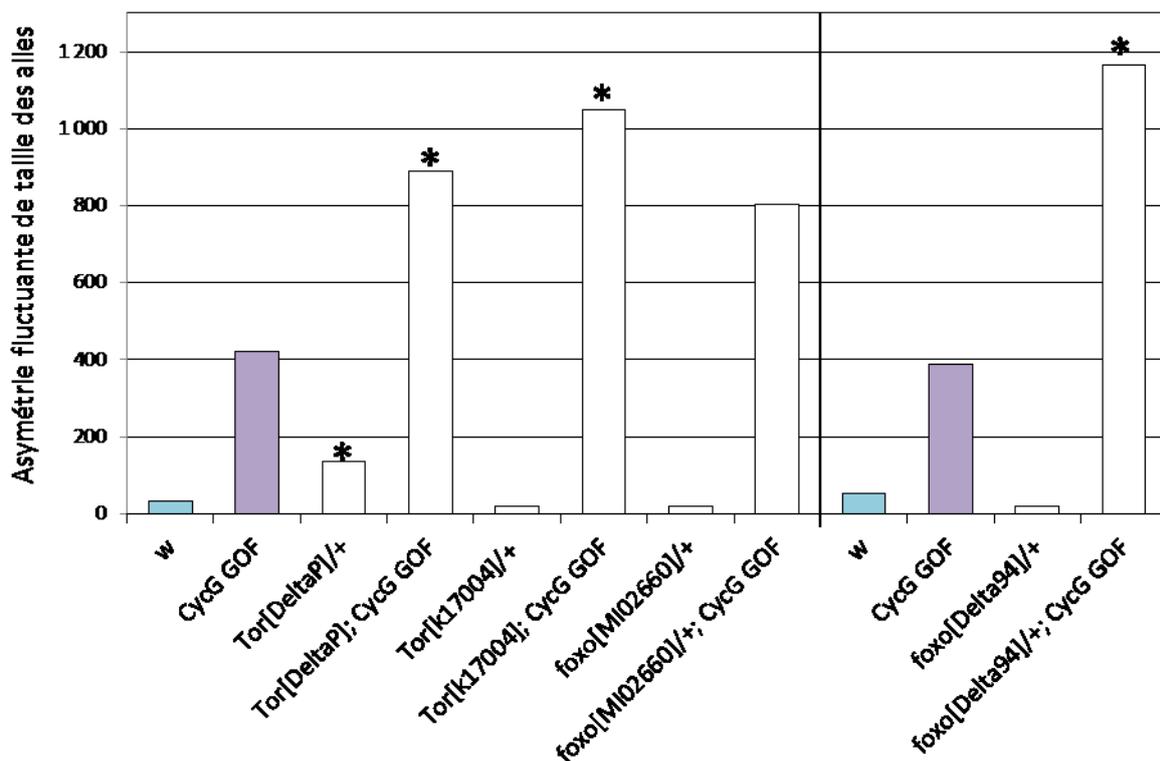


Figure 33. Effet de mutations de gènes impliqués dans la voie InR/TOR sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* ($da>CycG^{\Delta P}$, en violet). * $p<0,05$, Test F.

Gène	Allèle/ARNi	Classe de mutation	Mutagène	Lignée	Nature de la lésion	Référence	
<i>bsk</i>	<i>bsk</i> [1]		EMS	BL 3088	Substitution G225E qui affecte les sous-domaines kinase IX et X, région de reconnaissance du substrat	Sluss et al., 1996	
	<i>bsk</i> [2]		EMS	BL 5283	Substitution K316@ : protéine tronquée après le sous-domaine kinase XI	Sluss et al., 1996	
<i>hep</i>	<i>hep</i> [GD208]		Insertion élément P	BL 6761	Insertion de P{lacW} dans les séquences régulatrices	Peter et al., 2002	
	<i>hep</i> [r75]	hypomorphe	Excision élément P	BL 12229		Glise et al., 1995	
<i>puc</i>	<i>puc</i> [A251]		Insertion élément P	BL 11173	Insertion de P{ArB} dans le deuxième intron	Martin-Bianco et al., 1998	
	<i>puc</i> [E69]	perte de fonction	Insertion élément P	DGRC 109029	Insertion de P{A92} dans le deuxième intron	Martin-Bianco et al., 1998	
Compétition cellulaire	<i>fwe</i>	<i>fwe</i> [GD4616]	ARNi	VDRRC 39596	-	Rhiner et al., 2010	
		<i>fwe</i> [KK109356]	ARNi	VDRRC 104993	-	Rhiner et al., 2010	
	SPARC	SPARC[M100329]		Insertion Mi{MIC}	BL 30711	Insertion de Mi{MIC} dans la région 5' UTR	Venken et al., 2011
		SPARC[KK108185]	ARNi	-	VDRRC 100566	-	Portela et al., 2010
	SPARC[GD5660]	ARNi	-	VDRRC 16677	-	Portela et al., 2010	

Tableau 4. Allèles de gènes impliqués dans la voie JNK et dans la compétition cellulaire, utilisés lors du cribble de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement par gènes candidats.

Enfin, nous avons étudié l'effet de mutations d'acteurs de la voie Hippo, qui régule négativement la croissance (Tableau 3). Parmi les différents allèles testés, *ft⁴*, un allèle hypomorphe du gène *ft*, qui code une cadhérine en amont de la voie, augmente significativement l'AF induite par *CycG^{ΔP}* (Figure 34). Par ailleurs, *hpo^{KC202}*, un allèle perte de fonction du gène *hpo* qui code la kinase constituant le cœur de cette voie, et *ex^{k12913}*, un allèle non caractérisé du gène *ex* qui code un régulateur négatif de la voie, induisent une forte augmentation de l'AF induite par *CycG^{ΔP}* (d'un facteur 3,2 et 6,8 respectivement) (Figure 34). Ces résultats suggèrent que la voie Hippo, essentielle pour la régulation de la taille finale des organes, est également très importante pour la stabilité du développement et le maintien de la symétrie des organes.

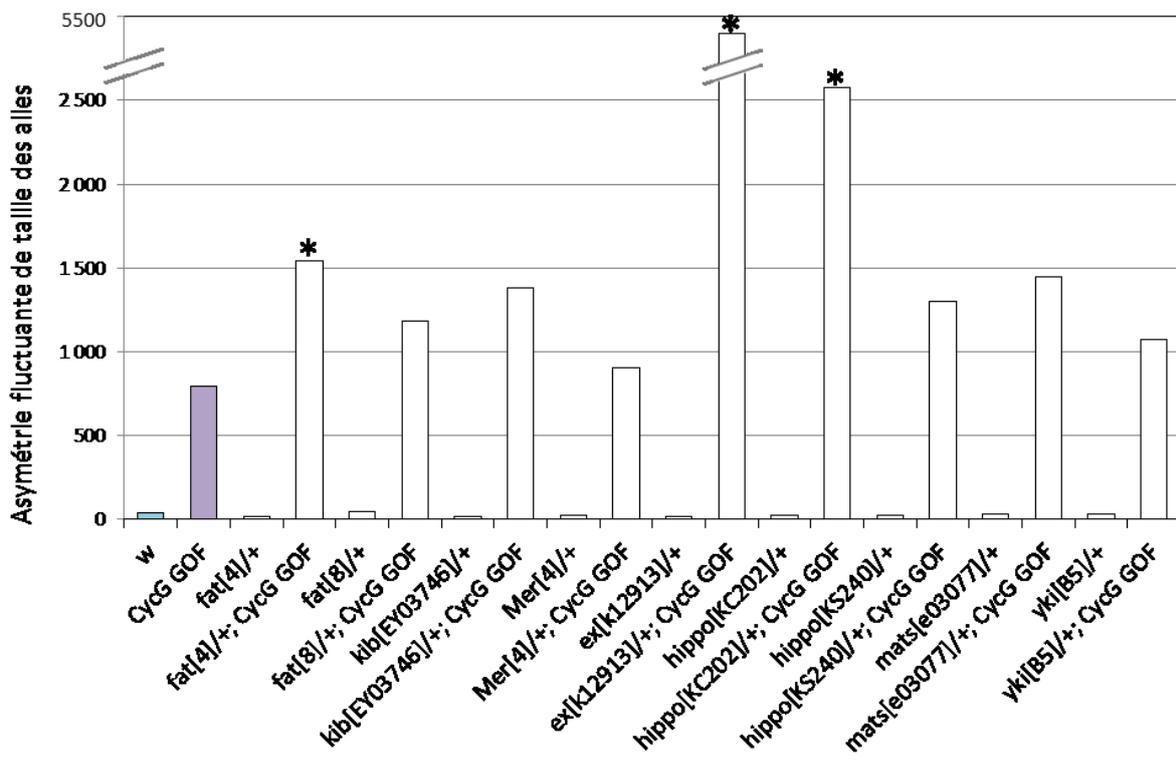


Figure 34. Effet de mutations de gènes impliqués dans la voie Hippo sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. *CycG GOF* : *da>CycG^{ΔP}*. **p*<0,05, Test F.

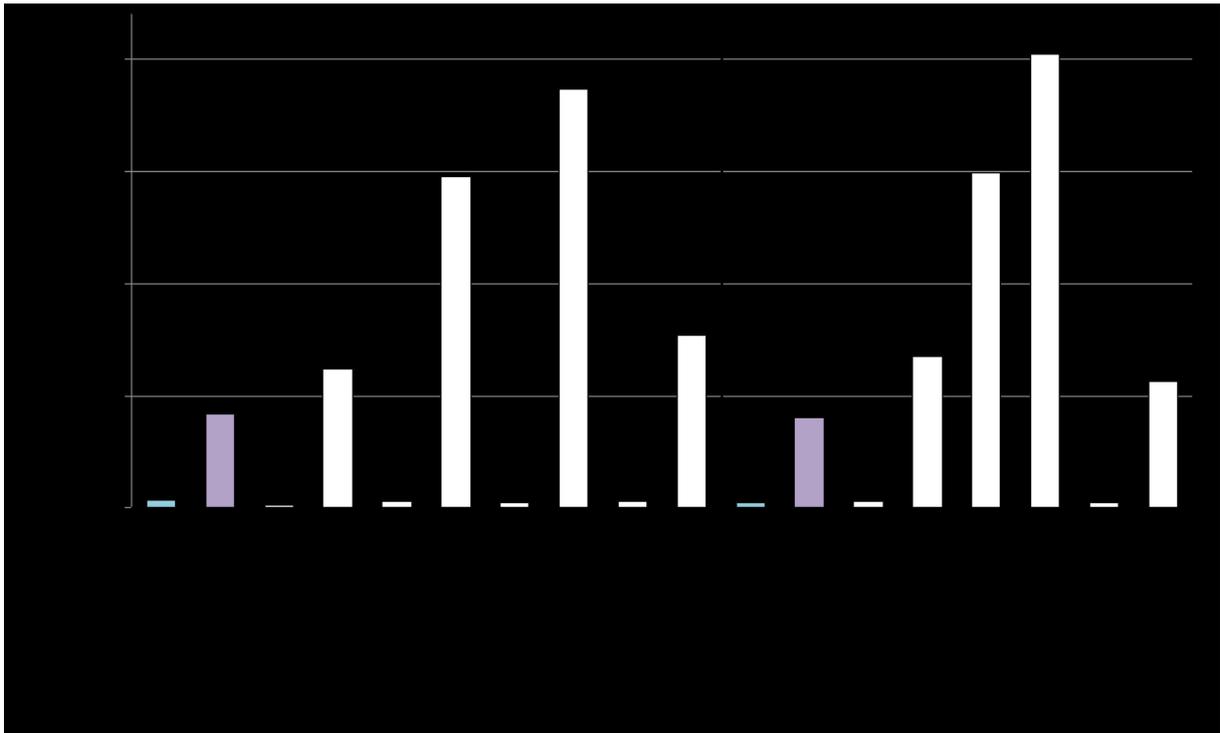


Figure 35. Effet de mutations de gènes impliqués dans la voie JNK sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. Deux séries expérimentales sont présentées avec leurs contrôles *w* (en bleu) et *CycG GOF* (*da>CycG^{ΔP}*, en violet). **p*<0,05, Test F.

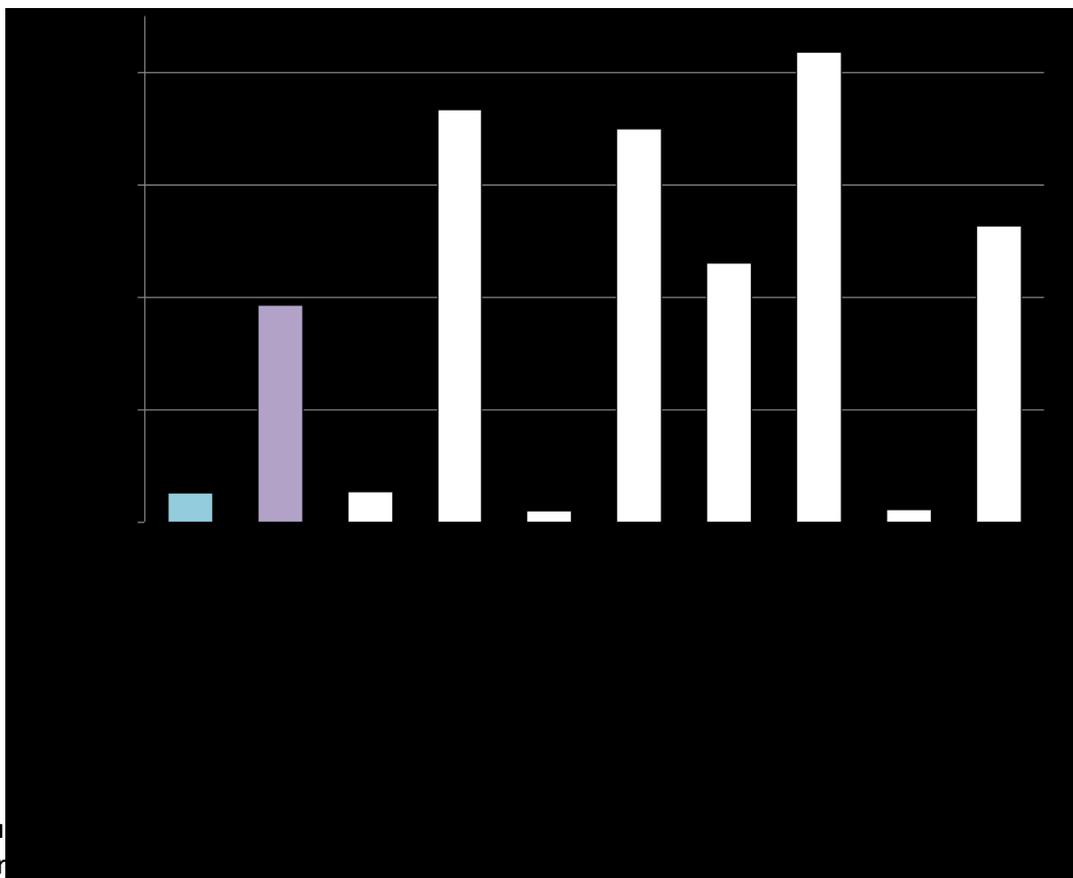


Figure 36. Effet de *CycG GOF* (*da>CycG^{ΔP}*) sur l'asymétrie fluctuante de taille des ailes. *CycG GOF* : *da>CycG^{ΔP}*. **p*<0,05, Test F.

- **Voie JNK impliquée dans la réponse au stress et dans l'homéostasie des tissus**

La voie JNK est un acteur majeur de l'homéostasie des tissus, en régulant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Elle est activée au cours de différents mécanismes tels que la régénération ou la compétition cellulaire. Nous avons testé l'implication dans la stabilité du développement de *bsk*, *hep* et *puc*, qui codent respectivement l'unique JNK de *D. melanogaster*, une JNKK et un régulateur négatif de l'activité de Bsk (Tableau 4). Parmi les allèles que nous avons testés, seul les allèles de *bsk*, *bsk*¹ et *bsk*² augmentent significativement l'AF induite par *CycG*^{ΔP} (Figure 35). Nous n'avons pas observé d'effet des allèles du gène *hep*, *hep*^{G0208} ou de l'allèle hypomorphe *hep*^{r75}. Ces résultats suggèrent soit que Hep n'est pas la JNKK requise pour réguler l'activité de Bsk dans la stabilité du développement, soit que les allèles testés ont un effet trop faible à l'état hétérozygote sur l'activité de la voie pour pouvoir avoir un effet détectable sur l'AF. Il serait intéressant de tester des contextes de perte de fonction plus forte de *hep*, ainsi que la perte de fonction de *MKK4*, une autre JNKK, afin de déterminer quels sont les acteurs de la voie JNK qui sont requis en amont de Hep pour son rôle dans le contrôle du bruit développemental.

- **Des effecteurs de la compétition cellulaire contrôleraient la stabilité du développement**

Nous avons également testé si des effecteurs de la compétition cellulaire, un des mécanismes qui participent au maintien de l'homéostasie des tissus, interviennent aussi dans la stabilité du développement. J'ai décrit précédemment les effets sur l'AF induite par *CycG*^{ΔP} de différents gènes impliqués dans l'homéostasie tissulaire, dont certains agissent également à différents niveaux dans les mécanismes de compétition cellulaire, tels que *dpp*, *wg*, *hid* ou la voie JNK. Pour compléter ces résultats, nous avons analysé si la perte de fonction des gènes *fwe* et *SPARC*, qui codent des facteurs spécifiques des cellules perdantes, affecte l'AF de taille des ailes. Nous ne disposions pour cette étude que de lignées permettant l'inactivation par ARNi de *fwe* et de *SPARC*, ainsi que d'un allèle non caractérisé de *SPARC*, *SPARC*^{M100329} (Tableau 4). Les résultats préliminaires montrent que l'inactivation de ces gènes par ARNi peut augmenter significativement l'AF induite par *CycG*^{ΔP} (Figure 36). Cependant les effets diffèrent en fonction des lignées ARNi testées ; il sera donc nécessaire

de confirmer ces résultats et de vérifier l'efficacité des différents outils d'inactivation de *fwe* et de *SPARC* afin de pouvoir conclure sur leur implication dans la stabilité du développement. Ces résultats suggèrent cependant que *Fwe* et *SPARC* pourraient exercer un rôle dans le contrôle du bruit développemental et de la symétrie des organes.

L'utilisation de la surexpression de *CycG^{AP}* nous a donc permis de mettre en évidence une possible implication de différents acteurs du maintien de l'homéostasie des tissus dans la régulation fine de la taille des organes et dans la stabilité du développement. En effet, les résultats obtenus au cours de ce crible par gènes candidats suggèrent que des gènes impliqués dans des processus tels que la régulation de la prolifération (*wg*, *dpp*), de la croissance (*Tor*, *foxo*, voie Hippo), de la survie (*hid*, *bsk*) et le maintien des identités cellulaires (gènes PcG, *trxG* et ETP) seraient également requis pour le contrôle du bruit développemental.

2.1.2 Crible à l'échelle du génome pour rechercher des gènes impliqués dans la stabilité du développement

Nous avons décidé de rechercher, à l'échelle du génome, de nouveaux gènes requis pour le contrôle du bruit développemental, au-delà de ceux que nous avons testés lors de l'approche par gènes candidats. J'ai participé aux premières étapes de ce crible génétique à grande échelle. Comme pour le crible décrit précédemment, la stabilité du développement a été perturbée en surexprimant *CycG^{ΔP}*. Nous avons recherché des délétions qui modifient (enhancers ou suppresseurs) le phénotype d'AF élevée de la taille des ailes lié à cette surexpression. Le crible consiste à tester une collection de 467 lignées portant des délétions chevauchantes, qui découvrent 98,3% des gènes euchromatiques de *Drosophila melanogaster* (Bloomington Deficiency Kit) complétée par une trentaine de délétions supplémentaires. Nous avons mesuré l'AF de taille des ailes de mouches femelles présentant l'une de ces délétions associée à la surexpression de *CycG^{ΔP}*, et nous l'avons comparée à l'AF induite par *CycG^{ΔP}* seule, selon le protocole décrit dans la partie 2.1.1 des Résultats.

Lors de l'expérience pilote à laquelle j'ai participé, nous avons testé l'effet de 85 délétions découvrant différentes régions du chromosome 2L, soit environ 20% du génome de la drosophile. Les résultats de cette partie du crible montrent que parmi les déficiences du chromosome 2L testées, 16 ont un effet modificateur significatif sur l'AF induite par *CycG^{ΔP}*, dont 8 enhancers et 8 suppresseurs (Tableau 5). Nous avons regardé quels sont les gènes découverts par ces différentes délétions modificatrices. Parmi eux se trouvent par exemple des gènes impliqués dans la régulation de la structure chromatinienne et de la transcription (*Su(var)205*, *Utx*, *Taf11*) ou dans des voies de régulation de l'homéostasie décrites précédemment (*Tor*, *Pten*, *chico*), qui seront des candidats intéressants à tester.

Il est intéressant de noter que, parmi les délétions qui augmentent l'AF induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}*, se trouvent une délétion découvrant le gène *dpp*, et une découvrant les gènes *wg*, *Wnt4*, *Wnt6* et *Wnt10*. Or l'implication des gènes *wg* et *dpp* dans la stabilité du développement a aussi été montrée *via* l'effet de mutations de ces gènes sur l'AF élevée induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}* (voir partie 2.1.1). De plus, une des délétions qui augmente l'AF induite par *CycG^{ΔP}* découvre le gène *Med20*, qui code la sous-unité 20 du complexe coactivateur transcriptionnel Médiator.

Délétion	Localisation	Taille (kb)	Asymétrie fluctuante (AF)	AF Délétion AF CycG GOF	Gènes
<i>Df(2L)ED50001</i>	21A1;21B1	?	778.89	1.34	
<i>Df(2L)ED5878</i>	21B1;21B3	94	568.59	0.98	
<i>Df(2L)BSC454</i>	21B7;21B8	36	631.57	1.34	
<i>Df(2L)BSC106</i>	21B7;21C2	126	431.07	0.68	
<i>Df(2L)al</i>	21B8-C1;21C8-D1	250-300	létal	-	
<i>Df(2L)BSC107</i>	21C2;21E2	144	812.81	1.72	
<i>Df(2L)ast2</i>	21D1-2;22B2-3	1200	973.50	1.53	
<i>Df(2L)ED105</i>	21E2;22A1	568	1404.01	2.42	
<i>Df(2L)ED94</i>	21E2;21E3	468	708.24	1.22	
<i>Df(2L)Exel6005</i>	22A3;22B1	182	911.50	1.93	
<i>Df(2L)BSC688</i>	22B1;22D6	535	951.80	2.01	
<i>Df(2L)BSC455</i>	22D5;22E1	132	283.12	0.60	<i>Axud1, Ser12</i>
<i>Df(2L)Exel7011</i>	22E1;22F3	129	2023.40	4.28	<i>Axud1, dpp</i>
<i>Df(2L)ED136</i>	22F4;23A3	261	1072.02	1.85	
<i>Df(2L)Exel6277</i>	23A2;23B1	130	1031.29	2.18	
<i>Df(2L)BSC692</i>	23B3;23B7	38	létal	-	
<i>Df(2L)BSC180</i>	23B7;23C3	89	476.83	1.01	
<i>Df(2L)drm-P2</i>	23F3-4;24A1-2	200	788.11	1.24	
<i>Df(2L)BSC292</i>	23F6;24A2	116	690.95	1.46	
<i>Df(2L)ED247</i>	24A2;24C3	139	727.57	1.25	
<i>Df(2L)jed1</i>	24A2;24D4	400	495.68	0.78	
<i>Df(2L)Exel6009</i>	24C3;24C8	117	641.67	1.36	
<i>Df(2L)BSC165</i>	24D4;24D8	163	1456.00	3.08	<i>ed</i>
<i>Df(2L)M24F-B</i>	24E1-2;24F6-7	400	673.13	1.06	
<i>Df(2L)ED250</i>	24F4;25A7	344	405.48	0.70	
<i>Df(2L)ED7853</i>	25A3;25B10	299	592.23	1.02	
<i>Df(2L)tkv3</i>	25A4-5;25D5	600	826.17	1.30	
<i>Df(2L)BSC172</i>	25B10;25C1	36	676.85	1.43	
<i>Df(2L)BSC110</i>	25C1;25C4	35	852.35	1.80	
<i>Df(2L)BSC109</i>	25C4;25C8	72	982.28	2.08	
<i>Df(2L)Exel6011</i>	25C8;25D5	158	létal	-	
<i>Df(2L)Exel6012</i>	25D5;25E6	249	849.28	1.80	
<i>Df(2L)BSC169</i>	25E5;25F3	192	658.21	1.39	
<i>Df(2L)ED334</i>	25F2;26B2	341	létal	-	
<i>Df(2L)ED385</i>	26B1;26D7	485	létal	-	
<i>Df(2L)BSC6</i>	26D3-E1;26F4-7	200	400.89	0.63	
<i>Df(2L)BSC354</i>	26D7;26E3	92	1602.00	3.39	<i>eya, Daxx, Sec61α</i>
<i>Df(2L)BSC188</i>	26F1;27A2	130	1883.42	3.99	<i>cort, cup, Spn27a</i>
<i>Df(2L)BSC291</i>	27D6;27F2	323	1542.67	3.26	<i>wg, Wnt4, Wnt6, Wnt10, Mnn1</i>
<i>Df(2L)ED489</i>	27E4;28B1	372	989.82	1.71	
<i>Df(2L)Exel7034</i>	28E1;28F1	133	2470.36	5.23	<i>MED20, Trf</i>
<i>Df(2L)BSC227</i>	28E8;29B1	191	240.74	0.22	<i>Su(var)205</i>
<i>Df(2L)BSC111</i>	28F5;29B1	122	852.44	0.79	

Tableau 5. Effet de délétions du chromosome 2L sur l'AF induite par CycG^{ΔP}.
En bleu, délétions ayant un effet significatif (Test F, p<0,05 après correction de Holm-Bonferroni)
(suite du tableau page 112)

Nous avons montré qu'un allèle perte de fonction de *Med20*, *Med20*^{CGR20}, reproduit l'effet de cette délétion, suggérant que ce gène est important pour la stabilité du développement. Cette observation conforte l'idée que ce crible génomique par délétions permettra d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la stabilité du développement.

A ce jour, l'ensemble des délétions de la collection a été testé. Pour 452 d'entre elles l'AF a pu être mesurée. Parmi les délétions restantes, certaines se sont avérées létales en association avec la surexpression de *CycG*^{ΔP}, d'autres induisaient des phénotypes d'aile rendant la mesure de longueur de l'aile impossible. Nous avons identifié 37 délétions qui entraînent une diminution significative de l'AF induite par *CycG*^{ΔP}, et 17 qui augmentent significativement l'amplitude de l'AF due à *CycG*^{ΔP}. A présent, l'effet sur l'AF de ces délétions qui sont sorties du crible primaire est en train d'être confirmé lors d'un crible secondaire. Au cours de celui-ci, l'AF de mouches portant ces délétions à l'état hétérozygote est également analysé. A plus long terme, pour les délétions dont l'effet sur l'AF sera confirmé, des pertes de fonction des différents gènes découverts seront testées en association avec la surexpression de *CycG*^{ΔP}, afin de déterminer quels gènes sont responsables de la modification d'AF observée lors du crible.

Ce crible permettra donc, à terme, d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la stabilité du développement. L'avantage d'une telle approche est de permettre d'identifier, sans a priori, de nouveaux gènes et processus importants pour contrôler le bruit développemental.

Délétion	Localisation	Taille (kb)	Asymétrie fluctuante (AF)	AF Délétion AF CycG GOF	Gènes
<i>Df(2L)BSC204</i>	29D5;29F8	496	534.28	0.49	
<i>Df(2L)ED678</i>	29F5;30B12	623	902.31	1.55	
<i>Df(2L)ED690</i>	30B3;30E4	481	606.13	1.04	
<i>Df(2L)BSC17</i>	30C3--5;30F1	261	217.68	0.34	<i>Taf11, Rps2</i>
<i>Df(2L)BSC240</i>	30C7;30F2	216	216.90	0.20	<i>Taf11, Rps2, Srp54, Etl1</i>
<i>Df(2L)BSC50</i>	30F4--5;31B1--4	300	306.84	0.48	<i>Pten</i>
<i>Df(2L)BSC689</i>	30F5;31B1	214	313.10	0.29	<i>chico, Pten, Utx</i>
<i>Df(2L)BSC143</i>	31B1;31D9	124	626.38	0.58	
<i>Df(2L)J39</i>	31C-D;32D-E	750	493.58	0.77	
<i>Df(2L)BSC208</i>	31D7;31D11	60	718.53	0.66	
<i>Df(2L)BSC209</i>	31D7;31E1	100	létal	-	
<i>Df(2L)ED8142</i>	31E1;32A4	271	811.44	1.40	
<i>Df(2L)BSC214</i>	31F5;32B4	397	446.18	0.41	
<i>Df(2L)BSC213</i>	32B1;32C1	192	721.19	0.67	
<i>Df(2L)BSC145</i>	32C1;32C1	34	785.65	0.72	
<i>Df(2L)BSC241</i>	32C1;32F2	439	909.66	0.84	
<i>Df(2L)ED761</i>	33A2;33E5	629	644.51	1.11	
<i>Df(2L)ED775</i>	33B8;34A3	965	1209.68	2.08	
<i>Df(2L)BSC277</i>	34A1;34B2	425	140.31	0.13	<i>Tor, Sfmt, Sir2</i>
<i>Df(2L)BSC892</i>	34A5;34B9	322	853.80	1.34	
<i>Df(2L)BSC159</i>	34B4;34C4	246	916.85	0.85	
<i>Df(2L)BSC812</i>	34B11;34E1	457	létal	-	
<i>Df(2L)BSC252</i>	34D1;34F1	194	447.75	0.41	
<i>Df(2L)ED793</i>	34E4;35B4	755	847.23	1.46	
<i>Df(2L)ED1050</i>	35B8;35D4	765	1131.32	1.95	
<i>Df(2L)r10</i>	35D1;36A6-7	1125	366.72	0.58	
<i>Df(2L)BSC690</i>	35D4;35D4	76	511.49	0.47	
<i>Df(2L)Exel6038</i>	35D6;35E2	130	987.26	2.09	
<i>Df(2L)BSC278</i>	35E1;35F1	536	1007.89	0.93	
<i>Df(2L)BSC781</i>	35F1;36A1	92	1223.97	1.13	
<i>Df(2L)ED1102</i>	35F12;36A10	334	652.64	1.12	
<i>Df(2L)BSC148</i>	36C8;36E3	483	776.58	0.72	
<i>Df(2L)Exel7070</i>	36E2;36E6	258	1577.50	3.34	<i>Socs36E, elfless, Pros65R2</i>
<i>Df(2L)BSC256</i>	36E3;36F2	259	létal	-	
<i>Df(2L)Exel8038</i>	36E5;36F5	332	létal	-	
<i>Df(2L)BSC149</i>	36F5;36F10	229	436.11	0.40	
<i>Df(2L)ED1315</i>	38B4;38F5	832	1058.48	1.66	
<i>Df(2L)ED1378</i>	38F1;39D2	574	381.65	0.60	<i>E2f2, Atg18b, crc, dimm</i>
<i>Df(2L)ED1473</i>	39B4;40A5	577	1350.20	2.12	
<i>Df(2L)BSC151</i>	40A5;40E5	400	448.88	0.41	
<i>Df(2L)lt109</i>	h35;h35	67	2321.80	3.64	<i>cta, lt</i>
<i>Df(2L)C'</i>	h35;h38L		1061.92	1.67	

Tableau 5. (suite)

2.2 La compétition cellulaire, un garant de la stabilité du développement ?

Comme l'ont montré les résultats des recherches de modificateurs d'AF par gène candidats, un contexte mutant pour différents acteurs de la compétition cellulaire augmente significativement l'AF due à la surexpression de *CycG^{AP}*. C'est notamment le cas pour des mutations ou des dérégulations affectant les gènes *dpp*, *wg*, *hid*, *fwe*, *dSPARC* et des gènes de la voie JNK. Il est par ailleurs avéré qu'un contexte de perte de fonction de *hid* augmente l'amplitude de l'AF de taille des ailes par rapport à un contexte sauvage (Neto-Silva et al., 2009). Nous avons également montré qu'une délétion découvrant *dpp*, et qu'un allèle amorphe de *wg* induisent une augmentation significative de l'AF de taille des ailes. L'ensemble de ces données suggèrent donc des liens entre les acteurs de la compétition cellulaire et le contrôle du bruit développemental.

Plus particulièrement, la surexpression de *CycG^{AP}*, qui augmente considérablement le bruit développemental, pourrait aussi conduire à une perturbation de la compétition cellulaire. J'ai entrepris une série d'expériences visant à mieux comprendre les liens éventuels entre Cycline G, stabilité du développement et compétition cellulaire. J'ai notamment entrepris de montrer si des clones de cellules surexprimant Cycline G sont soumises à de la compétition cellulaire dans un disque imaginal d'aile sauvage.

- **Des différences de niveau de Cycline G entraînent-elles un phénomène de compétition cellulaire ?**

La compétition cellulaire s'établit entre deux populations de cellules adjacentes qui présentent des capacités de prolifération et/ou de croissance différentes (Levayer and Moreno, 2013). Elle peut être artificiellement induite chez la drosophile, en induisant des clones mitotiques dans un tissu en prolifération, tel que le disque imaginal d'aile.

La surexpression de $CycG^{AP}$ induit chez l'adulte l'ensemble des phénotypes caractéristiques du syndrome « *Minute* » : taille réduite, retard de développement, soies courtes et fines. Floria Faradji avait observé que des clones de cellules surexprimant $CycG^{AP}$ dans des disques imaginaux d'aile étaient plus petits que des clones de cellules sauvages induits au même stade de développement. Cela indique que la surexpression de $CycG^{AP}$ confère aux cellules un désavantage de prolifération, de croissance et/ou de survie par rapport à leurs voisines sauvages. J'ai donc recherché si, à l'instar des clones *Minute*, des clones de cellules surexprimant $CycG^{AP}$ induits dans des disques imaginaux d'aile sauvages étaient soumis à une élimination par compétition cellulaire.

Pour cela, j'ai induit des clones surexprimant $CycG^{AP}$ en utilisant la méthode flip-out (Struhl and Basler, 1993), dans des larves de deuxième stade, du génotype suivant : $hs::flp;Act5C>FRT-CD2-FRT>GAL4;UAS::GFP;UAS::CycG^{AP}$. L'expression du gène *flp* (*flipase*), suite à un choc thermique de 30 minutes à 37°C, induit l'excision de la cassette *CD2* encadrée par des séquences FRT (*flipase recombination target*). Le facteur de transcription GAL4 est donc produit, sous contrôle du promoteur du gène *Act5C*. Les cellules du clone surexprimant $CycG^{AP}$ sont repérables grâce à la présence de GFP. Un contexte $hs::flp;Act5C>FRT-CD2-FRT>GAL4;UAS::GFP$ a fourni les clones contrôles, induits au même moment et composés de cellules sauvages produisant la GFP.

Afin de déterminer si le désavantage des clones surexprimant $CycG^{AP}$ reflète la mise en place d'un mécanisme de compétition cellulaire, j'ai utilisé des marqueurs permettant de visualiser des phénomènes caractéristiques de la compétition cellulaire. J'ai notamment voulu déterminer si les cellules des clones surexprimant $CycG^{AP}$ étaient soumises à de l'apoptose, en réalisant des immunomarquages de disques imaginaux d'aile de larves de fin de troisième stade avec un anticorps dirigé contre la forme activée de la Caspase 3 humaine, qui révèle chez *D. melanogaster* l'activité de la caspase activatrice Dronc. J'ai également recherché une éventuelle activation de la voie JNK ou du gène pro-apoptotique *hid* dans ces clones, à l'aide des rapporteurs *puc-lacZ* et *hid-lacZ*.

Les résultats préliminaires suggèrent une absence d'apoptose dans les clones surexprimant $CycG^{AP}$, observés à la fin du troisième stade larvaire, 48h après induction des

clones (n=16 clones). Je n'ai pas non plus observé d'activation de *hid* (n=4), ni de la voie JNK (n=9). Ces résultats suggèrent que les clones surexprimant *CycG^{ΔP}* ne présentent pas les caractéristiques des cellules perdantes soumises à de la compétition cellulaire. La petite taille de ces clones semble donc uniquement associée au défaut de prolifération induit par la surexpression de *CycG^{ΔP}* (Faradji et al., 2011). Cependant, je n'ai pu analyser qu'un faible nombre de clones, induits au cours du deuxième stade larvaires. Ces résultats devront donc être complétés en augmentant le nombre de clones, et en analysant des clones induits plus tôt au cours du développement.

- **Des différences de niveau de Cycline G perturbent-elles l'expression de *wg* et *dpp* , deux gènes impliqués dans la stabilité du développement et dans la compétition cellulaire ?**

Les gènes *wg* et *dpp* codent des morphogènes impliqués dans la prolifération des cellules dans le disque d'aile. Il a été montré que des défauts d'activation des voies Dpp et Wg dans des clones cellulaires entraînent l'élimination de ces clones par compétition cellulaire (Moreno and Basler, 2004; Vincent et al., 2011). Par ailleurs, les résultats de cribles par gènes candidats obtenus au cours de ma thèse (présentés dans la partie 2.1) suggèrent que ces deux gènes sont également impliqués dans la stabilité du développement. J'ai donc voulu établir si la surexpression de *CycG^{ΔP}* pouvait affecter le profil d'expression de ces deux gènes.

Il a été montré précédemment que la surexpression ubiquitaire de *CycG^{ΔP}* n'affecte pas le profil d'expression des gènes *wg* et *dpp* (équipe de Frédérique Peronnet, données non publiées). Cependant, les études de la compétition cellulaire montrent que les cellules d'un même contexte génétique peut avoir un statut qui diffère, selon qu'elles sont en contexte homotypique (surexpression ubiquitaire de *CycG^{ΔP}*) ou hétérotypique (clones surexprimant *CycG^{ΔP}* au sein d'un tissu sauvage).

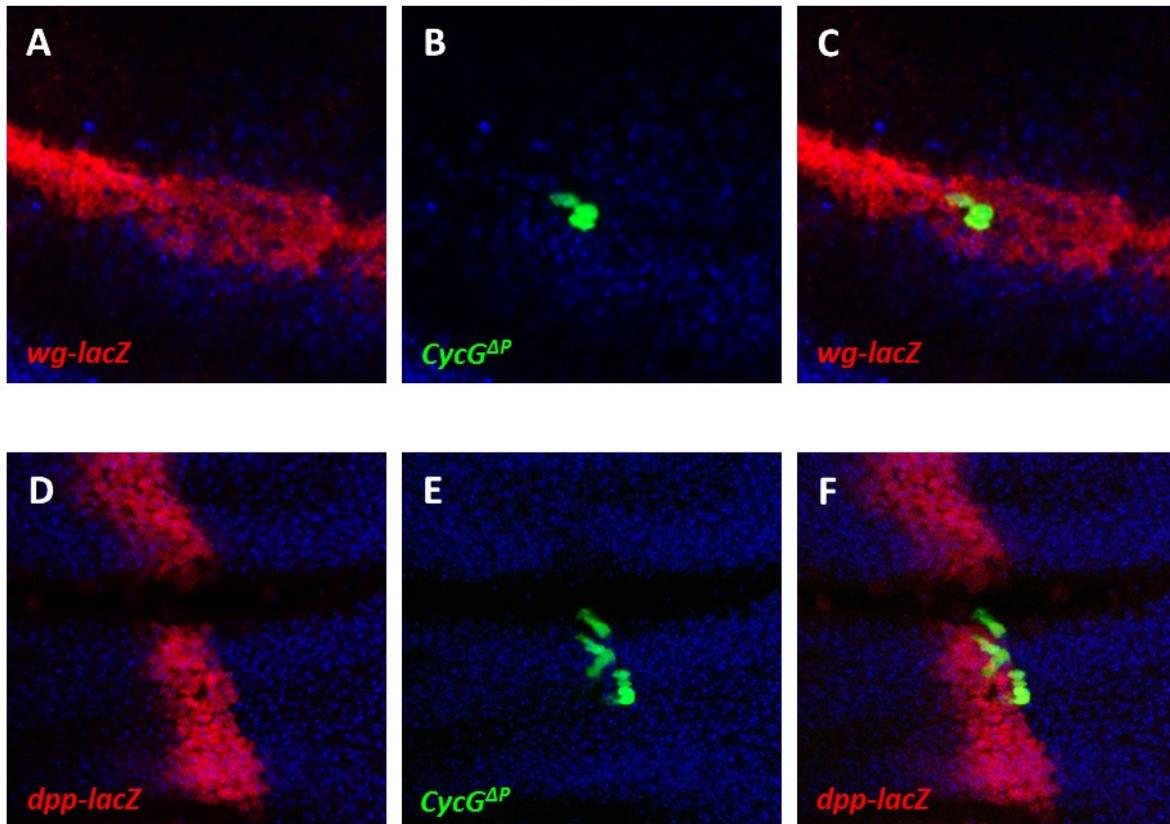


Figure 37. La surexpression de $CycG^{\Delta P}$ dans des clones mitotiques n'affecte pas le profil d'expression des gènes *wg* et *dpp*

(A-C) Clone $Act>CycG^{\Delta P}$ marqué par la GFP, induit 48h avant dissection dans des larves portant un transgène *wg-lacZ*. En rouge : immunomarquage anti β -galactosidase.

(D-F) Clone $Act>CycG^{\Delta P}$ marqué par la GFP, induit 48h avant dissection dans des larves portant un transgène *dpp-lacZ*. En rouge : immunomarquage anti β -galactosidase.

J'ai donc entrepris d'analyser si des clones de cellules surexprimant *CycG^{ΔP}* (obtenus par la méthode décrite précédemment), modifiaient le profil d'expression de *wg* ou *dpp*, à l'aide de rapporteurs *wg-lacZ* et *dpp-lacZ*. Des clones où *CycG^{ΔP}* est surexprimé, induits au deuxième stade larvaire dans des disques imaginaux sauvages, ne semblent pas présenter d'expression ectopique de *dpp* ou de *wg*, 48h après leur induction (n=4 et 17, respectivement). D'autre part, de tels clones localisés dans les domaines d'expression de ces deux morphogènes ne semblent pas modifier leur expression (Figure 37).

Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que les profils d'expression de *dpp* et *wg* ne sont pas affectés par des clones mitotiques surexprimant *CycG^{ΔP}* et que ni *dpp*, ni *wg* n'est induit par les clones (de façon autonome ou non-autonome cellulaire). Il est cependant envisageable que la surexpression de *CycG^{ΔP}* modifie l'activité de ces morphogènes ou la réponse aux signaux Dpp et Wg, en affectant des acteurs de ces voies de signalisation. Cette hypothèse pourra être testée en analysant des rapporteurs de l'activité de ces deux voies (*brk-lacZ* et anticorps dirigé contre Dll par exemple).

- **La surexpression de *CycG^{ΔP}* affecte-t-elle le phénomène de compétition cellulaire ?**

J'ai montré précédemment que l'AF induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}* est augmentée en contexte mutant pour différents acteurs de la compétition cellulaire (*dpp*, *wg*, gènes de la voie JNK, *hid*, *fwe*, *dSPARC*). De plus, le gène *hid* est un effecteur de la compétition cellulaire. De manière intéressante, sa perte de fonction inhibe la mort des cellules perdantes (la Cova et al., 2004), et induit une augmentation de l'AF de taille des ailes, donc une augmentation du bruit développemental (Neto-Silva et al., 2009). Ces observations suggèrent que la stabilité du développement pourrait être perturbée lorsque l'élimination des cellules perdantes est bloquée. Nous avons donc formulé l'hypothèse que l'AF élevée observée en condition de surexpression de *CycG^{ΔP}*, et le défaut de compensation entre la taille des cellules et le nombre des cellules des ailes de ces mouches, pouvaient être les conséquences phénotypiques d'un défaut de compétition cellulaire.

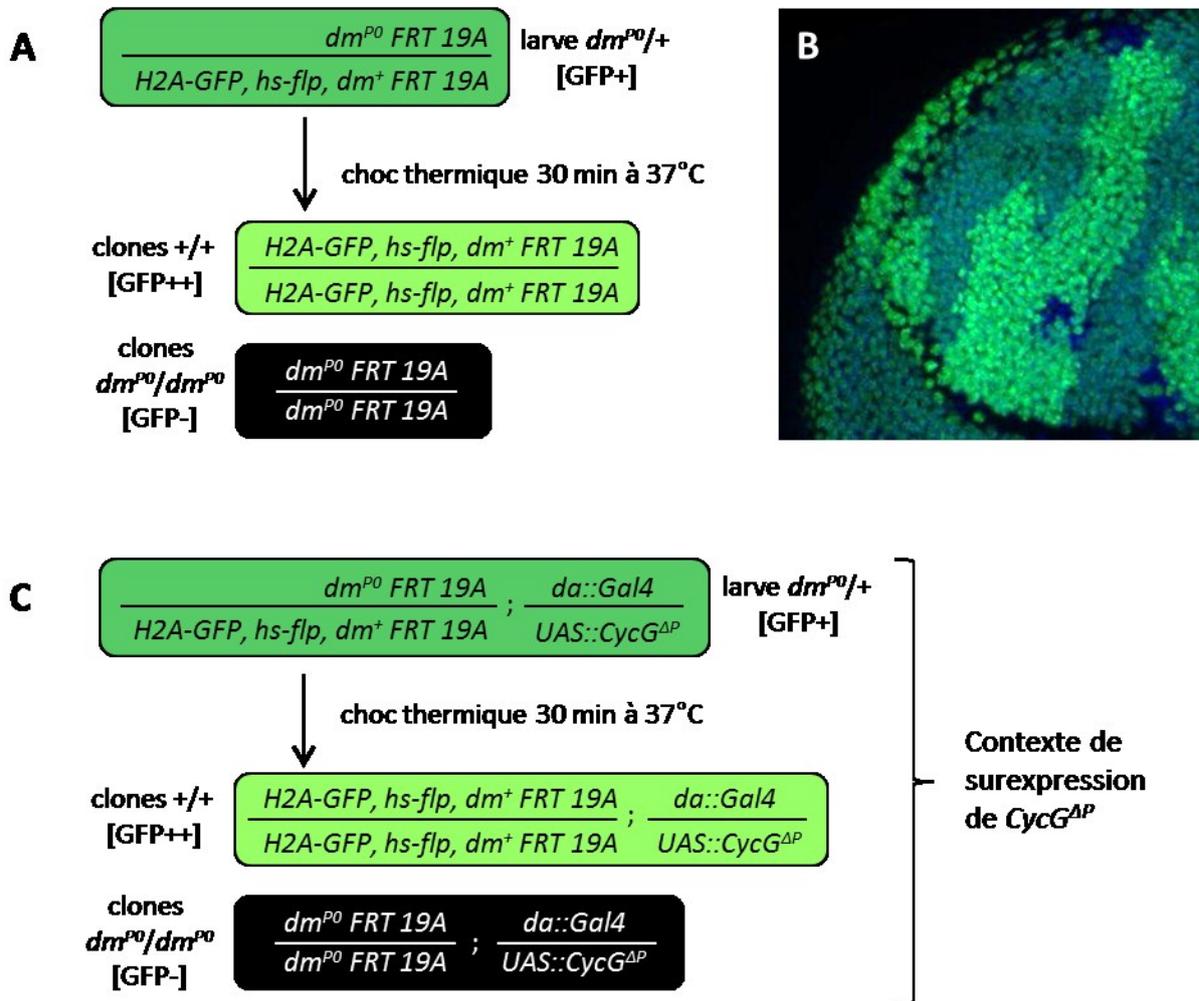


Figure 38. Représentation schématique de la technique d'induction de clones dm^{PO}/dm^{PO}

- (A) Induction de clones dm^{PO}/dm^{PO} et $+/+$ dans un contexte $dm^{PO}/+$
- (B) Clones dm^{PO}/dm^{PO} (GFP-) et $+/+$ (GFP++) induits 72h avant dissection dans un contexte $dm^{PO}/+$ (GFP+). Notez la taille réduite des clones dm^{PO}/dm^{PO} comparée à celle des clones frères $+/+$.
- (C) Induction de clones dm^{PO}/dm^{PO} et $+/+$ dans un contexte $dm^{PO}/+$, surexpression de $CycG^{\Delta P}$

Afin de tester cette hypothèse, j'ai entrepris d'analyser le devenir de clones dm^{P0}/dm^{P0} , (soumis à de la compétition cellulaire dans un contexte $dm^{P0}/+$ (Moreno and Basler, 2004)), dans des disques imaginaux d'aile $dm^{P0}/+$ où $CycG^{\Delta P}$ est surexprimé.

Des lignées de drosophile permettant l'induction à différents stades du développement de clones dm^{P0}/dm^{P0} et de clones frères $+/+$, en contexte $dm^{P0}/+$, ou en contexte $dm^{P0}/+$ où $CycG^{\Delta P}$ est surexprimé, grâce au système MARCM ont été construites (Figure 38). Des expériences pilote ont été réalisées, lors desquelles de tels clones ont été induits 72h avant dissection des larves de fin de troisième stade. Les clones dm^{P0}/dm^{P0} , induits 72h avant dissection en contexte $dm^{P0}/+$ étaient plus petits que les clones frères $+/+$, en accord avec les résultats précédents (Moreno and Basler, 2004).

Au cours de ces expériences pilote j'ai été confrontée au problème de la détermination du moment d'induction des clones dm^{P0}/dm^{P0} , dans les deux fonds génétiques différents. En effet, le contexte de surexpression de $CycG^{\Delta P}$ induit en lui-même un retard de développement, qui est d'environ 24h par rapport au témoin à la fin du troisième stade larvaire, c'est à dire au moment où les disques sont disséqués. Il faudra donc déterminer précisément le retard de développement des larves surexprimant $CycG^{\Delta P}$ par rapport aux larves contrôle pour chaque stade larvaire. Cela permettra d'induire des clones au même stade de développement pour les conditions contrôle et de surexpression de $CycG^{\Delta P}$. Cette étape de mise au point est indispensable afin de pouvoir comparer le devenir des clones dm^{P0}/dm^{P0} (nombre de cellules, activation ou non des caspases, de *hid* et de la voie JNK) dans les deux fonds génétiques. Cela nous permettra ensuite et de déterminer si le contexte de surexpression de $CycG^{\Delta P}$ empêche ou non l'élimination des cellules perdantes par compétition cellulaire.

Les résultats de cette expérience nous permettrons de déterminer si l'AF de taille des ailes induite par la surexpression de $CycG^{\Delta P}$ peut être la conséquence d'une altération du mécanisme de compétition cellulaire au cours du développement.

Plusieurs données indiquent que des mutations affectant la compétition cellulaire affectent aussi l'amplitude du bruit développemental. Ceci suggère que la compétition cellulaire pourrait participer au contrôle de ce bruit. Grâce au contexte de surexpression de *CycG^{ΔP}*, où le bruit développemental est amplifié, nous espérons, par les différentes expériences proposées ici, pouvoir conclure de manière définitive quant au rôle de la compétition cellulaire dans le contrôle du bruit développemental et dans la régulation fine de la taille des organes.

III DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1 Rôle de Cycline G dans le maintien des identités cellulaires

Les résultats publiés au cours de ma thèse, dans l'article « *Drosophila* Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development », montrent que Cycline G interagit physiquement avec ASX, et que *CycG* participe à la répression des gènes *Hox* *Scr* et *Ubx* dans les tissus où ils doivent être inactivés. Toutefois cette participation pourrait être indirecte, il sera donc intéressant de déterminer quelles sont les cibles transcriptionnelles directes de Cycline G. Une analyse par CHIP-seq du profil de fixation de cette protéine sur la chromatine, dans des disques imaginaux d'aile de larve de troisième stade de génotype *da>Myc-CycG^{ΔP}*, est en cours dans l'équipe de Frédérique Peronnet. Le profil de fixation de Cycline G sera comparé avec des résultats de RNA-seq, issus de disques d'aile où *CycG* est inactivée par ARNi ou surexprimée afin d'identifier les cibles directes de Cycline G.

Il sera aussi important de déterminer si, au-delà des gènes *Hox*, Cycline G participe globalement à la régulation de la transcription des gènes cibles des protéines de mémoire cellulaire. Pour cela, le profil de fixation de Cycline G sur la chromatine serait à comparer à celui d'autres facteurs chromatinien (en particulier ASX et Corto), à une résolution plus fine que celle des immunomarquages sur chromosomes polytènes, à l'échelle du génome ou au niveau de cibles particulières, telles que les gènes *Hox*. Ces expériences indiqueraient si Cycline G exerce un rôle général dans le maintien des identités cellulaires au cours du développement. Il serait également intéressant de comparer la présence de Cycline G sur la chromatine avec celle de différentes modifications post-traductionnelles d'histones ou avec les différentes formes phosphorylées de l'ARN polymérase II. Ces données informeraient sur l'état de la chromatine (active ou réprimée) au niveau des sites de fixation de Cycline G, ou encore sur l'état transcriptionnel de ses gènes cibles.

Une autre question soulevée par les résultats de cette étude est de savoir comment Cycline G participe à la régulation transcriptionnelle par les protéines de mémoire. Cycline G interagit physiquement avec ASX, un composant du complexe PR-DUB, contenant également l'histone déubiquitinase Calypso, qui déubiquitine spécifiquement H2AK119Ub. Le complexe PR-DUB antagonise ainsi le complexe Polycomb PRC1, qui contient dRing/Sce, l'ubiquitine

ligase spécifique de H2AK119 (Scheuermann et al., 2010 ; Schuettengruber et al., 2010). Comme nous le proposons dans l'article, Cycline G pourrait réguler l'activité du complexe PR-DUB, et donc jouer sur l'équilibre entre H2AK119ub et H2AK119, important pour la répression par les complexes PcG. Cycline G pourrait par exemple réguler l'activité des ETP ASX et Corto avec lesquels elle interagit physiquement, en modulant l'activité enzymatique d'une CDK non identifiée qui modifierait post-traductionnellement ces deux ETP. Afin de tester cette hypothèse il serait intéressant d'identifier les partenaires de Cycline G au niveau de la chromatine, tels que des CDK, ou d'autres protéines susceptibles de moduler l'activité des ETP, telles que GAK.

2 Apports des cribles de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement

La stabilité du développement est une composante de l'homéostasie tissulaire, qui assure la précision de la forme et de la taille des tissus en contrôlant le bruit développemental. Ce bruit, habituellement très faible, est difficile à évaluer. Les cribles de recherche de gènes impliqués dans la stabilité du développement réalisés au cours de ma thèse sont basés sur l'utilisation d'un contexte de surexpression de *CycG^{ΔP}*. Cette surexpression affecte le contrôle du bruit développemental et induit une forte asymétrie fluctuante (AF) de taille des ailes. Ce contexte déstabilisé nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'AF induite par *CycG^{ΔP}* par des mutants de différents gènes impliqués dans des processus de maintien de l'homéostasie des tissus.

Il est important de rappeler que l'AF ne reflète la stabilité du développement que lorsqu'on s'affranchit des variations génétiques et environnementales. Les résultats préliminaires obtenus lors de la première phase des cribles par gènes candidats et à l'échelle du génome demandent donc à être confirmés, après isogénéisation du fond génétique. Cette étape sera primordiale afin de s'assurer que les effets observés ne sont pas dûs à une hétérogénéité génétique entre les différentes populations considérées, et qu'ils sont bien spécifiques des gènes testés. Cependant, vu l'amplitude des effets observés dans certains cas d'interactions décrits dans ma thèse, comparée à l'amplitude très faible des variations

d'AF entre populations naturelles, nous sommes confiants que bon nombre des candidats retenus sont effectivement des modificateurs de la stabilité du développement.

D'autre part, il faut souligner que ces cribles, comme beaucoup d'autres, ne peuvent être exhaustifs. Certains gènes, pourtant impliqués dans la stabilité du développement, ne seront pas détectés. En effet le principe du crible ne permet de détecter que des effets forts, puisque nous testons, dans la plupart des cas, un effet en *trans* de mutations ou délétions à l'état hétérozygote. De plus, les délétions testées sont de tailles très hétérogènes, allant de quelques dizaines de kb à plus d'un Mb. Dans ces conditions, les effets observés peuvent refléter l'effet d'un gène et cacher celui d'un autre, et l'absence d'effet modificateur peut traduire deux effets opposés qui s'annulent.

Dans ces cribles, nous avons privilégié la mesure de la longueur de l'aile fondée sur 2 points repères. Cette mesure est plus rapide que la mesure de la taille centroïde des ailes, qui requiert l'acquisition des coordonnées de 15 points de repère. Par la suite, Il sera intéressant de voir si la sensibilité de détection de modificateurs de l'AF induite par *CycG^{ΔP}* peut être augmentée, en analysant par exemple l'AF de taille centroïde des ailes. L'utilisation de ce type de mesure à grande échelle requiert que l'acquisition des 15 points repères pour chaque aile soit automatisée. Les techniques d'automatisation sont actuellement en cours de mise au point, en collaboration avec Raphaël Marée (Unité d'Analyse d'Images Biologiques, Institut Pasteur, Paris), et pourront à terme servir pour réaliser une nouvelle analyse des images d'ailes issues des différents cribles réalisés au cours de ma thèse.

Les résultats prometteurs obtenus grâce aux cribles nous ont permis de détecter de nouveaux gènes et des processus potentiellement impliqués dans la stabilité du développement. L'AF induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}* est corrélée à une perte de compensation entre croissance et taille cellulaire dans les ailes, compensation importante pour la stabilité du développement (Debat et al., 2011). Pour les contextes génétiques qui diminuent significativement l'AF associée à la surexpression de *CycG^{ΔP}*, il sera intéressant d'établir si cet effet s'accompagne d'une restauration de la corrélation négative entre la taille et le nombre de cellules dans l'aile. La faisabilité d'une telle analyse dépend grandement de la mise au point de techniques d'acquisition automatisée du comptage du nombre de cellules dans l'aile.

- **Implication de gènes PcG, trxG et ETP dans le maintien de la stabilité du développement**

Les résultats du crible par gènes candidats suggèrent un lien entre stabilité du développement et maintien épigénétique de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires par les protéines des groupes PcG, trxG et ETP. En particulier, la fonction du complexe Polycomb PRC1 et des complexes Trithorax TAC1 et SWI/SNF, contenant TRX et BRM, respectivement, ainsi que des ETP DSP1 et CRM, pourrait assurer un contrôle des variations stochastiques des processus développementaux. Ces complexes étant impliqués dans la régulation de l'état transcriptionnel des gènes, un des mécanismes qui peut être envisagé serait un contrôle de la stochasticité de la transcription dépendant de l'état de la chromatine.

Etant donné que Cycline G interagit physiquement avec ASX, un composant du complexe PR-DUB, il est également important de déterminer si ce complexe est impliqué dans le contrôle du bruit développemental. Une analyse récente montre que des allèles perte de fonction d'*Asx* et de *calypso* augmentent significativement l'AF induite par *CycG^{ΔP}*, suggérant que le complexe PR-DUB est aussi impliqué dans le contrôle du bruit développemental (Dardalhon-Cuménal et al., en préparation).

De façon intéressante, une étude menée chez *C. elegans* suggère que des régulateurs chromatinien seraient impliqués dans le contrôle des variations génétiques, autrement dit dans la canalisation (Lehner et al., 2006). La distinction entre les concepts de canalisation et de stabilité du développement n'enlève pas la possibilité que certains mécanismes soient communs à la régulation des variations génétiques, environnementales, et stochastiques. De plus, il a été montré chez la levure *S. cerevisiae* et chez *C. elegans* que les complexes de remodelage de la chromatine participent au contrôle du bruit transcriptionnel (Raj et al., 2010; Raser and O'Shea, 2004). Si les résultats de ce crible liant stabilité du développement et maintien épigénétique de l'expression des gènes sont confirmés en fond isogénique, ils suggèreraient que le rôle des régulateurs chromatinien dans le contrôle du bruit développemental est conservé au cours de l'évolution. Par ailleurs, étant donné que Cycline G participe avec les protéines de mémoire cellulaire à la régulation de l'expression de gènes, Cycline G pourrait interagir avec ces protéines dans d'autres processus. On peut donc émettre l'hypothèse que Cycline G et les protéines de mémoire cellulaire agiraient

ensemble, soit dans le contrôle du bruit transcriptionnel, soit dans la régulation de l'expression de gènes importants pour le contrôle du bruit développemental.

- **Interactions de *dilp8* et *CycG^{ΔP}* pour maintenir la stabilité du développement ?**

Lors des cribles par gènes candidats, nous n'avons pas observé d'effet de la perte de fonction de *dilp8* sur l'AF induite par *CycG^{ΔP}*. Garelli et al. (2012) rapportent une augmentation d'un facteur 6 de l'AF de l'aire des ailes par rapport aux contrôles, mais pour des mutants *dilp8^{M100727}* à l'état homozygote. Nous ne pouvions analyser l'effet de cet allèle à l'état homozygote puisque les transgènes *da::Gal4* et *UAS::CycG^{ΔP}* permettant la surexpression de *CycG^{ΔP}* sont, comme *dilp8*, localisés sur le chromosome 3. Il sera nécessaire de réaliser une recombinaison pour faire cette analyse. D'autre part, l'effet de la perte de fonction de *dilp8* sur l'AF a été observé à 26,5°C, une température plus élevée que la température standardisée de 25°C utilisée pour nos cribles. De plus, Garelli et al. ont calculé l'AF pour l'aire des ailes, tandis que notre crible impliquait une estimation de l'AF de la longueur des ailes. Il sera donc intéressant de déterminer si une augmentation de l'AF de longueur des ailes d'individus homozygotes pour *dilp8^{M100727}* est détectable avec le protocole de notre crible.

- ***Tor* et *wg*, des acteurs de la stabilité du développement ?**

Parmi les contextes que nous avons testés, un allèle non caractérisé du gène *Tor* et un allèle amorphe de *wg* augmentent significativement l'AF de taille des ailes par rapport à la souche de référence. Ces résultats très intéressants nous ont conduits à rechercher si ces gènes sont découverts par des délétions qui augmentaient l'AF lors des cribles à l'échelle du génome menés par Breuker et al. (2006) et par Takahashi et al. (2011). Aucune délétion découvrant l'un de ces deux gènes n'a été utilisée lors du crible de Breuker et al. Cependant l'une des délétions remarquées par Takahashi et al. comme modifiant la forme des ailes, *Df(2L)ED778*, découvre le gène *Tor* (et 54 autres gènes). Lors de notre crible à l'échelle du génome, *Df(2L)BSC277*, une délétion qui découvre une région de 425 kb annotée comme contenant *Tor* (et 63 autres gènes), induit une diminution significative de l'AF due à la

surexpression de *CycG*^{ΔP} (Tableau 5). Cependant, les résultats obtenus par Takahashi et al. et lors des cribles par gènes candidats suggèrent que la perte de fonction de *Tor* entraîne un effet opposé, à savoir une augmentation de l'AF. Il est possible que la diminution d'AF observée pour *Df(2L)BSC277* soit induite par la perte de fonction d'un autre (ou de plusieurs) des 62 gènes découverts par cette délétion. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ainsi que ceux de Takahashi et al. suggèrent ainsi que le gène *Tor*, serait impliqué dans la stabilité du développement. Ce gène est connu pour son rôle dans la régulation de la traduction et dans la biogenèse des ribosomes. Il sera donc intéressant d'analyser le rôle de ces processus dans le contrôle du bruit transcriptionnel. De plus, des délétions qui découvrent deux gènes de la voie Insuline/Tor (*Pten*, qui code un régulateur négatif de la voie InR, et *chico*, qui code un adaptateur du récepteur de l'insuline) diminuent significativement l'AF induite par *CycG*^{ΔP}. Il sera donc intéressant de déterminer si ces effets sont confirmés lors du crible secondaire, et s'ils sont dus à la perte de fonction des gènes *Pten* et *chico*. Une hypothèse séduisante serait que *Tor* serait impliqué dans le contrôle des variations stochastiques de la traduction.

3 Compétition cellulaire et stabilité du développement

- **Des différences de niveau de Cycline G entraînent-elles un phénomène de compétition cellulaire ?**

Au cours de ma thèse, j'ai recherché si des clones cellulaires dans lesquels l'expression de *CycG* est dérégulée sont soumis à la compétition cellulaire, face aux cellules voisines sauvages. Les résultats préliminaires semblent indiquer que les clones surexprimant *CycG^{ΔP}* ne seraient pas soumis à de la compétition. En effet, 48h après l'induction des clones, je n'ai observé aucun des marqueurs classiques de la compétition cellulaire dans ces cellules (induction de *hid*, activation de la voie JNK, apoptose). Cependant, le faible nombre de clones observés et leur petite taille ne permet pas de conclure avec certitude. Ces premières observations doivent donc être complétées par une analyse d'un plus grand nombre de clones, et par l'étude du comportement de clones plus vieux (par exemple 72h après induction). Le système d'induction de clones utilisé au cours de mes travaux n'a permis d'observer qu'un faible nombre de clones 72h après leur induction. Une phase de mise au point sera donc nécessaire afin d'augmenter le nombre de clones analysables pour chaque contexte génétique. L'étude du devenir des clones où *CycG^{ΔP}* est surexprimé indiquera s'ils sont éliminés activement du tissu sauvage par un mécanisme de compétition, ou s'ils cessent simplement de proliférer.

- **La compétition cellulaire est-elle impliquée dans la stabilité du développement ?**

La compétition cellulaire est un phénomène observé lorsqu'on crée artificiellement des tissus composés de deux types cellulaires, qui diffèrent par leurs capacités de prolifération et/ou de croissance (Levayer and Moreno, 2013). De plus, il a été proposé que la compétition cellulaire pourrait être un mécanisme de défense, et de maintien de l'homéostasie des tissus (Meyer et al., 2014; Moreno et al., 2002). Elle permettrait d'éliminer des cellules « inaptes » et de les empêcher de contribuer au tissu final. Par exemple, des neurones endommagés pourraient être éliminés par compétition cellulaire afin de permettre la régénération du cerveau de drosophile suite à une lésion (Moreno et al.,

2015). Cependant, la compétition cellulaire pourrait à l'inverse favoriser la prolifération de tumeurs et l'envahissement de tissus par des métastases (Tamori and Deng, 2011).

Les rôles de la compétition cellulaire dans des conditions physiologiques restent peu connus. A ce jour, seuls quelques cas ont été décrits. Il a été proposé par exemple que la compétition cellulaire interviendrait dans l'élimination de neurones surnuméraires dans les ommatidies lors de la différenciation dans le disque imaginal d'œil de *D. melanogaster* (Merino et al., 2013). Un autre rôle physiologique de la compétition cellulaire pourrait être la régulation fine de la taille des organes, et la stabilité du développement. Les résultats obtenus lors des cribles par gènes candidats sont en accord avec cette hypothèse. En effet, nous avons montré que l'AF élevée induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}* est aggravée par des mutations de gènes impliqués au cours de la compétition cellulaire (*hid*, *bsk*, *wg*, *dpp*, *fwe*, *SPARC*), suggérant que ces gènes seraient aussi impliqués dans la stabilité du développement. Cependant, la plupart de ces facteurs impliqués dans la compétition cellulaire interviennent également dans un grand nombre d'autres processus. Il est donc difficile de conclure sur l'implication de la compétition cellulaire en tant que mécanisme de contrôle du bruit développemental. D'autres études seront nécessaires pour déterminer quelle(s) fonction(s) de ces gènes est/sont requise(s) pour contrôler le bruit développemental.

Il serait intéressant d'analyser si tous les contextes génétiques qui abolissent la compétition cellulaire induisent une diminution de la stabilité du développement et/ou un défaut de compensation entre la taille et le nombre de cellules dans l'aile adulte. C'est le scénario que nous souhaitons tester pour la surexpression de *CycG^{ΔP}*. On sait déjà que la perte de fonction de *hid*, qui supprime l'apoptose des cellules perdantes, augmente l'AF de taille des ailes (Neto-Silva et al., 2009). Cet effet sur l'AF est-il commun à tout contexte génétique abolissant la compétition cellulaire ? Dans le cas de *hid*, est-ce que l'augmentation de l'AF est associée à une perte de la corrélation négative entre la taille et le nombre de cellules dans l'aile, comme observée pour la surexpression de *CycG^{ΔP}*? Un autre contexte entraînant une forte suppression de l'élimination de clones de cellules perdantes par compétition cellulaire a été décrit récemment. En effet, des mutations des voies Toll et IMD (immune deficiency) suppriment la compétition cellulaire dans des clones de cellules perdantes présentant soit un niveau de Myc plus faible que leurs voisines, soit une mutation

Minute (Meyer et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer si des mutations perte de fonction de gènes codant différents composants de ces voies (1) induisent une augmentation de l'AF de taille et de forme des ailes, (2) augmentent l'AF induite par la surexpression de *CycG^{ΔP}*, (3) altèrent la corrélation négative entre taille et nombre de cellules dans l'aile adulte. Une telle étude permettrait de savoir si un défaut de compétition cellulaire peut affecter l'homéostasie des tissus (et en particulier la stabilité du développement) et se traduire par un défaut de régulation fine de la taille des organes. Une telle corrélation renforcerait l'hypothèse d'un rôle physiologique de la compétition cellulaire dans l'homéostasie des tissus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, M.K., and Lengyel, J.A. (1991). Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics* *129*, 783–789.
- Alexandre, C., Baena-Lopez, A., and Vincent, J.-P. (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature* *505*, 180–185.
- Alonso, A.G. de A., Gutiérrez, L., Fritsch, C., Papp, B., Beuchle, D., and Müller, J. (2007). A Genetic Screen Identifies Novel Polycomb Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* *176*, 2099–2108.
- Amoyel, M., and Bach, E.A. (2014). Cell competition: how to eliminate your neighbours. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 988–1000.
- Arachchige Don, A.S., Dallapiazza, R.F., Bennin, D.A., Brake, T., Cowan, C.E., and Horne, M.C. (2006). Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. *Exp. Cell Res.* *312*, 4181–4204.
- Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P., and Tamkun, J.W. (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.* *21*, 5245–5254.
- Baena-Lopez, L.A., Franch-Marro, X., and Vincent, J.-P. (2009). Wingless promotes proliferative growth in a gradient-independent manner. *Sci. Signal.* *2*, ra60.
- Baskind, H.A., Na, L., Ma, Q., Patel, M.P., Geenen, D.L., and Wang, Q.T. (2009). Functional conservation of *Asx12*, a murine homolog for the *Drosophila* enhancer of trithorax and polycomb group gene *Asx*. *PloS One* *4*, e4750.
- Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E., and Stocker, H. (2010). The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in *Drosophila*. *Dev. Cell* *18*, 309–316.
- Beck, S.A., Falconer, E., Catching, A., Hodgson, J.W., and Brock, H.W. (2010). Cell cycle defects in polyhomeotic mutants are caused by abrogation of the DNA damage checkpoint. *Dev. Biol.* *339*, 320–328.
- de Beco, S., Ziosi, M., and Johnston, L.A. (2012). New frontiers in cell competition. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *241*, 831–841.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., and Sauer, F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator *Ash1*. *Nature* *419*, 857–862.
- Bellen, H.J., Levis, R.W., Liao, G., He, Y., Carlson, J.W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P.R., Schulze, K.L., Rubin, G.M., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* *167*, 761–781.

Bennett, F.C., and Harvey, K.F. (2006). Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr. Biol.* *CB 16*, 2101–2110.

Bennin, D.A., Don, A.S.A., Brake, T., McKenzie, J.L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A.A., and Horne, M.C. (2002). Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* *277*, 27449–27467.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* *97*, 865–875.

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* *20*, 1123–1136.

Breen, T.R., and Duncan, I.M. (1986). Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *118*, 442–456.

Breuker, C.J., Patterson, J.S., and Klingenberg, C.P. (2006). A single basis for developmental buffering of *Drosophila* wing shape. *PLoS One* *1*, e7.

Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M., and Edgar, B.A. (2002). *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev. Cell* *2*, 239–249.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* *CB 11*, 213–221.

Brumby, A.M., Zraly, C.B., Horsfield, J.A., Secombe, J., Saint, R., Dingwall, A.K., and Richardson, H. (2002). *Drosophila* cyclin E interacts with components of the Brahma complex. *EMBO J.* *21*, 3377–3389.

Bryant, P.J., Huettnner, B., Held, L.I., Ryerse, J., and Szidonya, J. (1988). Mutations at the fat locus interfere with cell proliferation control and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *129*, 541–554.

Burgering, B.M.T. (2008). A brief introduction to FOXology. *Oncogene* *27*, 2258–2262.

Byrd, K.N., and Shearn, A. (2003). ASH1, a *Drosophila* trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11535–11540.

Campbell, S.D., Sprenger, F., Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1995). *Drosophila* Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates *Drosophila* Cdc2 in vitro. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1333–1347.

- Capdevila, M.P., Botas, J., and García-Bellido, A. (1986). Genetic interactions between the Polycomb locus and the Antennapedia and Bithorax complexes of *Drosophila*. *Roux Arch. Dev. Biol.* *195*, 417–432.
- Carrington, E.A., and Jones, R.S. (1996). The *Drosophila* Enhancer of zeste gene encodes a chromosomal protein: examination of wild-type and mutant protein distribution. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 4073–4083.
- Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.-W., Li, W., Hay, B.A., and Shi, Y. (2003). Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 892–898.
- Chen, C.-L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15810–15815.
- Clavería, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., and Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* *500*, 39–44.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J.M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* *10*, 1979–1990.
- Colombani, J., Andersen, D.S., and Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* *336*, 582–585.
- Courgeon, M., Konstantinides, N., and Desplan, C. (2015). Cell competition: dying for communal interest. *Curr. Biol. CB* *25*, R339–R341.
- la Cova, C. de, Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L.A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* *117*, 107–116.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* *111*, 185–196.
- Daubresse, G., Deuring, R., Moore, L., Papoulas, O., Zakrajsek, I., Waldrip, W.R., Scott, M.P., Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (1999). The *Drosophila* kismet gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development* *126*, 1175–1187.
- Debat, V., and David, P. (2001). Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* *16*, 555–561.
- Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-Terwengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2011). Developmental stability: a major role for cyclin G in *drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* *7*, e1002314.

Déjardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D., and Cavalli, G. (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* 434, 533–538.

Demay, Y., Perochon, J., Szuplewski, S., Mignotte, B., and Gaumer, S. (2014). The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model. *Cell Death Dis.* 5, e1452.

Denton, D., Aung-Htut, M.T., and Kumar, S. (2013). Developmentally programmed cell death in *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3499–3506.

Dietrich, B.H., Moore, J., Kyba, M., dosSantos, G., McCloskey, F., Milne, T.A., Brock, H.W., and Krause, H.M. (2001). Tantalus, a novel ASX-interacting protein with tissue-specific functions. *Dev. Biol.* 234, 441–453.

Van Dongen, S. (2006). Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *J. Evol. Biol.* 19, 1727–1743.

Duncan, I.M. (1982). Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 102, 49–70.

Dura, J.M., Randsholt, N.B., Deatrick, J., Erk, I., Santamaria, P., Freeman, J.D., Freeman, S.J., Weddell, D., and Brock, H.W. (1987). A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. *Cell* 51, 829–839.

Dura, J.-M., Brock, H.W., and Santamaria, P. (1985). Polyhomeotic: A gene of *Drosophila melanogaster* required for correct expression of segmental identity. *Mol. Gen. Genet. MGG* 198, 213–220.

Edgar, B.A. (2006). From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path. *Cell* 124, 267–273.

Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1989). Genetic Control of Cell Division Patterns in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 57, 177–187.

Faradji, F. (2010). Rôle de Cycline G de *Drosophila melanogaster* dans la régulation de la croissance et du cycle cellulaires. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie.

Faradji, F., Bloyer, S., Dardalhon-Cuménal, D., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2011). *Drosophila melanogaster* Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 805–818.

Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H., and Karch, F. (1994). The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 371, 806–808.

Foley, E., O'Farrell, P.H., and Sprenger, F. (1999). Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr. Biol. CB* 9, 1392–1402.

Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., and Kingston, R.E. (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell* 8, 545–556.

Gallant, P. (2006). Myc/Max/Mad in invertebrates: the evolution of the Max network. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 235–253.

Gao, X., Neufeld, T.P., and Pan, D. (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev. Biol.* 221, 404–418.

Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguela, V., Caparros, E., and Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336, 579–582.

Garoia, F., Guerra, D., Pezzoli, M.C., López-Varea, A., Cavicchi, S., and García-Bellido, A. (2000). Cell behaviour of *Drosophila* fat cadherin mutations in wing development. *Mech. Dev.* 94, 95–109.

Gildea, J.J., Lopez, R., and Shearn, A. (2000). A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* 156, 645–663.

Gindhart, J.G., and Kaufman, T.C. (1995). Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics* 139, 797–814.

Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., et al. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727–1736.

Glise, B., Bourbon, H., and Noselli, S. (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451–461.

Gopinathan, L., Ratnacaram, C.K., and Kaldis, P. (2011). Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results Probl. Cell Differ.* 53, 365–389.

Gordon, E.M., and Hall, F.L. (2010). Noteworthy clinical case studies in cancer gene therapy: tumor-targeted Rixin-G advances as an efficacious anti-cancer agent. *Int. J. Oncol.* 36, 1341–1353.

Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev.* 9, 1694–1708.

Grewal, S.S. (2009). Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1006–1010.

Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., and Edgar, B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat. Cell Biol.* 7, 295–302.

- Grewal, S.S., Evans, J.R., and Edgar, B.A. (2007). *Drosophila* TIF-IA is required for ribosome synthesis and cell growth and is regulated by the TOR pathway. *J. Cell Biol.* *179*, 1105–1113.
- Grossniklaus, U., and Paro, R. (2014). Transcriptional silencing by polycomb-group proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a019331.
- Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *350*, 255–266.
- Gutiérrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J.C., Gambetta, M.C., Ly-Hartig, N., and Müller, J. (2012). The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 117–127.
- Hafezi, Y., Bosch, J.A., and Hariharan, I.K. (2012). Differences in levels of the transmembrane protein Crumbs can influence cell survival at clonal boundaries. *Dev. Biol.* *368*, 358–369.
- Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 9–22.
- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., Jafar-Nejad, H., and Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 27–36.
- Hay, B.A., Huh, J.R., and Guo, M. (2004). The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 911–922.
- He, Y., Emoto, K., Fang, X., Ren, N., Tian, X., Jan, Y.-N., and Adler, P.N. (2005). *Drosophila* Mob family proteins interact with the related tricornered (Trc) and warts (Wts) kinases. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4139–4152.
- van den Heuvel, M., Harryman-Samos, C., Klingensmith, J., Perrimon, N., and Nusse, R. (1993). Mutations in the segment polarity genes wingless and porcupine impair secretion of the wingless protein. *EMBO J.* *12*, 5293–5302.
- Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 389–410.
- Horne, M.C., Goolsby, G.L., Donaldson, K.L., Tran, D., Neubauer, M., and Wahl, A.F. (1996). Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *J. Biol. Chem.* *271*, 6050–6061.
- Horne, M.C., Donaldson, K.L., Goolsby, G.L., Tran, D., Mulheisen, M., Hell, J.W., and Wahl, A.F. (1997). Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* *272*, 12650–12661.
- Hsieh, T.-F., Hakim, O., Ohad, N., and Fischer, R.L. (2003). From flour to flower: how Polycomb group proteins influence multiple aspects of plant development. *Trends Plant Sci.* *8*, 439–445.

Huang, J., and Raff, J.W. (2002). The dynamic localisation of the *Drosophila* APC/C: evidence for the existence of multiple complexes that perform distinct functions and are differentially localised. *J. Cell Sci.* *115*, 2847–2856.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* *122*, 421–434.

Hulf, T., Bellosta, P., Furrer, M., Steiger, D., Svensson, D., Barbour, A., and Gallant, P. (2005). Whole-genome analysis reveals a strong positional bias of conserved dMyc-dependent E-boxes. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3401–3410.

Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *14*, 1021–1028.

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* *21*, 3009–3018.

Ingham, P., and Whittle, R. (1980). Trithorax: A new homoeotic mutation of *Drosophila melanogaster* causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments. *Mol. Gen. Genet. MGG* *179*, 607–614.

Irvine, K.D., and Harvey, K.F. (2015). Control of Organ Growth by Patterning and Hippo Signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*.

Ito, Y., Yoshida, H., Uruno, T., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F., Kuma, K., et al. (2003). Decreased expression of cyclin G2 is significantly linked to the malignant transformation of papillary carcinoma of the thyroid. *Anticancer Res.* *23*, 2335–2338.

Janody, F., Martirosyan, Z., Benlali, A., and Treisman, J.E. (2003). Two subunits of the *Drosophila* mediator complex act together to control cell affinity. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 3691–3701.

Johnston, L.A., Prober, D.A., Edgar, B.A., Eisenman, R.N., and Gallant, P. (1999). *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* *98*, 779–790.

Jünger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J. Biol.* *2*, 20.

Jürgens, G. (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* *316*, 153–155.

Kal, A.J., Mahmoudi, T., Zak, N.B., and Verrijzer, C.P. (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* *14*, 1058–1071.

Kanaoka, Y., Kimura, S.H., Okazaki, I., Ikeda, M., and Nojima, H. (1997). GAK: a cyclin G associated kinase contains a tensin/auxilin-like domain. *FEBS Lett.* *402*, 73–80.

Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., and Miura, M. (2002). Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J. Biol. Chem.* *277*, 28372–28375.

Karpen, G.H., and Spradling, A.C. (1992). Analysis of subtelomeric heterochromatin in the Drosophila minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis. *Genetics* *132*, 737–753.

Kennison, J.A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of Drosophila: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* *29*, 289–303.

Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8136–8140.

Kim, Y., Shintani, S., Kohno, Y., Zhang, R., and Wong, D.T. (2004). Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer. *Cancer Res.* *64*, 8980–8986.

Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M., and Nojima, H. (2001). Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* *20*, 3290–3300.

Kingston, R.E., and Tamkun, J.W. (2014). Transcriptional regulation by trithorax-group proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a019349.

Klingenberg, C.P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 623–635.

Kodjabachian, L., Delaage, M., Maurel, C., Miassod, R., Jacq, B., and Rosset, R. (1998). Mutations in ccf, a novel Drosophila gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *EMBO J.* *17*, 1063–1075.

Kooistra, R., Vreeken, K., Zonneveld, J.B., de Jong, A., Eeken, J.C., Osgood, C.J., Buerstedde, J.M., Lohman, P.H., and Pastink, A. (1997). The Drosophila melanogaster RAD54 homolog, DmRAD54, is involved in the repair of radiation damage and recombination. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6097–6104.

Kuranaga, E., Matsunuma, T., Kanuka, H., Takemoto, K., Koto, A., Kimura, K., and Miura, M. (2011). Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in Drosophila male terminalia. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1493–1499.

Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E., and Green, M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* *370*, 477–481.

Kyba, M., and Brock, H.W. (1998). The Drosophila polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2712–2720.

LaJeunesse, D.R., McCartney, B.M., and Fehon, R.G. (1998). Structural Analysis of Drosophila Merlin Reveals Functional Domains Important for Growth Control and Subcellular Localization. *J. Cell Biol.* *141*, 1589–1599.

- Lane, M.E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y.N., Lehner, C.F., and Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 1225–1235.
- Lee, L.A., and Orr-Weaver, T.L. (2003). Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu. Rev. Genet.* 37, 545–578.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., and Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* 438, 234–237.
- Lee, T.V., Fan, Y., Wang, S., Srivastava, M., Broemer, M., Meier, P., and Bergmann, A. (2011). *Drosophila* IAP1-mediated ubiquitylation controls activation of the initiator caspase DRONC independent of protein degradation. *PLoS Genet.* 7, e1002261.
- Lehner, B., Crombie, C., Tischler, J., Fortunato, A., and Fraser, A.G. (2006). Systematic mapping of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* identifies common modifiers of diverse signaling pathways. *Nat. Genet.* 38, 896–903.
- Levayer, R., and Moreno, E. (2013). Mechanisms of cell competition: Themes and variations. *J. Cell Biol.* 200, 689–698.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Li, H., Okamoto, K., Peart, M.J., and Prives, C. (2009). Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B'alpha subunits of protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 29, 919–928.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3079–3093.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10532–10537.
- Liu, F., Gao, X., Yu, H., Yuan, D., Zhang, J., He, Y., and Yue, L. (2013). Effects of expression of exogenous cyclin G1 on proliferation of human endometrial carcinoma cells. *Chin. J. Physiol.* 56, 83–89.
- Lopez, A., Higuete, D., Rosset, R., Deutsch, J., and Peronnet, F. (2001). *corto* genetically interacts with *Pc-G* and *trx-G* genes and maintains the anterior boundary of *Ultrabithorax* expression in *Drosophila* larvae. *Mol. Genet. Genomics MGG* 266, 572–583.
- Ma, L., Liu, J., Shen, J., Liu, L., Wu, J., Li, W., Luo, J., Chen, Q., and Qian, C. (2010). Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 9, 554–561.
- Maeda, R.K., and Karch, F. (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1413–1422.

- Martín, F.A., and Morata, G. (2006). Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 4421–4426.
- Martín, F.A., Herrera, S.C., and Morata, G. (2009). Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* *136*, 3747–3756.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martínez-Arias, A. (1998). *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* *12*, 557–570.
- Martinez, A.-M., and Cavalli, G. (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 1189–1197.
- Martinez, A.-M., Colomb, S., Déjardin, J., Bantignies, F., and Cavalli, G. (2006). Polycomb group-dependent Cyclin A repression in *Drosophila*. *Genes Dev.* *20*, 501–513.
- Martinez, A.-M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C., and Cavalli, G. (2009) Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nature Genetics* *41*, 1076 - 1082.
- Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., et al. (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol.* *8*, R216.
- Menéndez, J., Pérez-Garijo, A., Calleja, M., and Morata, G. (2010). A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14651–14656.
- Merino, M.M., Rhiner, C., Portela, M., and Moreno, E. (2013). “Fitness fingerprints” mediate physiological culling of unwanted neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* *23*, 1300–1309.
- Meyer, S.N., Amoyel, M., Bergantiños, C., la Cova, C. de, Schertel, C., Basler, K., and Johnston, L.A. (2014). An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition. *Science* *346*, 1258236.
- Michelson, A.M. (2003). Running interference for hedgehog signaling. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2003*, PE30.
- Mills, A.A. (2010). Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 669–682.
- Moberg, K.H., Bell, D.W., Wahrer, D.C.R., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* *413*, 311–316.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1999). *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* *285*, 2126–2129.
- Morata, G., and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* *42*, 211–221.

- Moreno, E. (2008). Is cell competition relevant to cancer? *Nat. Rev. Cancer* 8, 141–147.
- Moreno, E., and Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117, 117–129.
- Moreno, E., Basler, K., and Morata, G. (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416, 755–759.
- Moreno, E., Fernandez-Marrero, Y., Meyer, P., and Rhiner, C. (2015). Brain regeneration in *Drosophila* involves comparison of neuronal fitness. *Curr. Biol.* CB 25, 955–963.
- Mosrin-Huaman, C., Canaple, L., Locker, D., and Decoville, M. (1998). DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev. Genet.* 23, 324–334.
- Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* 111, 197–208.
- Nagel, A.C., Fischer, P., Szawinski, J., La Rosa, M.K., and Preiss, A. (2012). Cyclin G is involved in meiotic recombination repair in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* 125, 5555–5563.
- Naito, Y., Shimizu, H., Kasama, T., Sato, J., Tabara, H., Okamoto, A., Yabuta, N., and Nojima, H. (2012). Cyclin G-associated kinase regulates protein phosphatase 2A by phosphorylation of its B'γ subunit. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 604–616.
- Naito, Y., Yabuta, N., Sato, J., Ohno, S., Sakata, M., Kasama, T., Ikawa, M., and Nojima, H. (2013). Recruitment of cyclin G2 to promyelocytic leukemia nuclear bodies promotes dephosphorylation of γH2AX following treatment with ionizing radiation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1773–1784.
- Neto-Silva, R.M., Wells, B.S., and Johnston, L.A. (2009). Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 197–220.
- Neto-Silva, R.M., de Beco, S., and Johnston, L.A. (2010). Evidence for a growth-stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the *Drosophila* homolog of Yap. *Dev. Cell* 19, 507–520.
- Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1996). Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing. *Dev. Camb. Engl.* 122, 1781–1789.
- Ng, J., Hart, C.M., Morgan, K., and Simon, J.A. (2000). A *Drosophila* ESC-E(Z) Protein Complex Is Distinct from Other Polycomb Group Complexes and Contains Covalently Modified ESC. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3069–3078.
- Nolo, R., Morrison, C.M., Tao, C., Zhang, X., and Halder, G. (2006). The bantam MicroRNA Is a Target of the Hippo Tumor-Suppressor Pathway. *Curr. Biol.* 16, 1895–1904.

de Nooij, J.C., Letendre, M.A., and Hariharan, I.K. (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**, 1237–1247.

O’Dor, E., Beck, S.A., and Brock, H.W. (2006). Polycomb group mutants exhibit mitotic defects in syncytial cell cycles of *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* **290**, 312–322.

Oh, H., and Irvine, K.D. (2010). Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol.* **20**, 410–417.

Okamoto, K., and Beach, D. (1994). Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* **13**, 4816–4822.

Okamoto, K., and Prives, C. (1999). A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene* **18**, 4606–4615.

Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M.C., and Beach, D. (1996). p53-dependent association between cyclin G and the B’ subunit of protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6593–6602.

Okamoto, K., Li, H., Jensen, M.R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S.S., and Prives, C. (2002). Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2. *Mol. Cell* **9**, 761–771.

Oktaba, K., Gutiérrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A.K., Furlong, E.E.M., and Müller, J. (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev. Cell* **15**, 877–889.

Oldham, S., and Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* **13**, 79–85.

Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G., and Hafen, E. (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* **14**, 2689–2694.

Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarlé, S.A., and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 3907–3920.

Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H.J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L.W.M., Cowley, S.M., Yost, C., et al. (2003). Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev.* **17**, 1101–1114.

Palmer, A.R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*, T.A. Markow, ed. (Springer Netherlands), pp. 335–364.

Palmer, A.R. (1996). Waltzing with Asymmetry. *BioScience* **46**, 518–532.

Palmer, A.R. (1999). Detecting Publication Bias in Meta-analyses: A Case Study of Fluctuating Asymmetry and Sexual Selection. *Am. Nat.* **154**, 220–233.

- Palmer, A.R., and Strobeck, C. (1986). Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *17*, 391–421.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* *19*, 491–505.
- Papoulas, O., Beek, S.J., Moseley, S.L., McCallum, C.M., Sarte, M., Shearn, A., and Tamkun, J.W. (1998). The *Drosophila trithorax* group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 3955–3966.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* *287*, 821–828.
- Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P., et al. (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* *3*, 34–38.
- Petrova, E., Soldini, D., and Moreno, E. (2011). The expression of SPARC in human tumors is consistent with its role during cell competition. *Commun. Integr. Biol.* *4*, 171–174.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M., and Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* *294*, 1331–1334.
- Piscopo, D.M., and Hinds, P.W. (2008). A role for the cyclin box in the ubiquitin-mediated degradation of cyclin G1. *Cancer Res.* *68*, 5581–5590.
- Portela, M., Casas-Tinto, S., Rhiner, C., López-Gay, J.M., Domínguez, O., Soldini, D., and Moreno, E. (2010). *Drosophila* SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition. *Dev. Cell* *19*, 562–573.
- Puig, O., and Mattila, J. (2010). Understanding Forkhead Box Class O Function: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 635–647.
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., and Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev.* *17*, 2006–2020.
- Raj, A., Rifkin, S.A., Andersen, E., and van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature* *463*, 913–918.
- Raser, J.M., and O’Shea, E.K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* *304*, 1811–1814.
- Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y., and Irvine, K.D. (2014). Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell* *158*, 143–156.
- Restrepo, S., Zartman, J.J., and Basler, K. (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol. CB* *24*, R245–R255.

Rhiner, C., López-Gay, J.M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martín, F.A., Lombardía, L., and Moreno, E. (2010). Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*. *Dev. Cell* *18*, 985–998.

Rodrigues, A.B., Zoranovic, T., Ayala-Camargo, A., Grewal, S., Reyes-Robles, T., Krasny, M., Wu, D.C., Johnston, L.A., and Bach, E.A. (2012). Activated STAT regulates growth and induces competitive interactions independently of Myc, Yorkie, Wingless and ribosome biogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 4051–4061.

Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G.M., and Golic, K.G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* *16*, 1568–1581.

Rougeot, J., Renard, M., Randsholt, N.B., Peronnet, F., and Mouchel-Vielh, E. (2013). The elongin complex antagonizes the chromatin factor Corto for vein versus intervein cell identity in *Drosophila* wings. *PLoS One* *8*, e77592.

Sadava, D.E., Hillis, D.M., Heller, H.C., and Berenbaum, M. (2009). *Life: the science of biology* (Macmillan).

Salvaing, J., Lopez, A., Boivin, A., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2003). The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res.* *31*, 2873–2882.

Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussi re, M., Daulny, A., Boldyreva, L., Zhimulev, I., Locker, D., and Peronnet, F. (2006). Corto and DSP1 interact and bind to a maintenance element of the *Scr* Hox gene: understanding the role of Enhancers of trithorax and Polycomb. *BMC Biol.* *4*, 9.

Salvaing, J., Nagel, A.C., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Maier, D., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008a). The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in *Drosophila*. *PLoS One* *3*, e1658.

Salvaing, J., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008b). Regulation of Abd-B expression by Cyclin G and Corto in the abdominal epithelium of *Drosophila*. *Hereditas* *145*, 138–146.

Sancho, M., Di-Gregorio, A., George, N., Pozzi, S., Sánchez, J.M., Pernaute, B., and Rodríguez, T.A. (2013). Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Dev. Cell* *26*, 19–30.

Santamaría, P., and Randsholt, N.B. (1995). Characterization of a region of the X chromosome of *Drosophila* including multi sex combs (*mx*), a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. *Mol. Gen. Genet.* *MGG* *246*, 282–290.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* *465*, 243–247.

- Scheuermann, J.C., Gutiérrez, L., and Müller, J. (2012). Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression: the missing pieces of the puzzle. *Fly (Austin)* 6, 162–168.
- Schwank, G., and Basler, K. (2010). Regulation of organ growth by morphogen gradients. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001669.
- Schwank, G., Restrepo, S., and Basler, K. (2008). Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Dev. Camb. Engl.* 135, 4003–4013.
- Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.-Y., Bourgon, R., Biggin, M., and Pirrotta, V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38, 700–705.
- Scott, M.P., Weiner, A.J., Hazelrigg, T.I., Polisky, B.A., Pirrotta, V., Scalenghe, F., and Kaufman, T.C. (1983). The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell* 35, 763–776.
- Shannon, M.P., Kaufman, T.C., Shen, M.W., and Judd, B.H. (1972). Lethality Patterns and Morphology of Selected Lethal and Semi-Lethal Mutations in the Zeste-White Region of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 72, 615–638.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98, 37–46.
- Shearn, A. (1989). The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* 121, 517–525.
- Simpson, P., and Morata, G. (1981). Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 85, 299–308.
- Skotzko, M., Wu, L., Anderson, W.F., Gordon, E.M., and Hall, F.L. (1995). Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res.* 55, 5493–5498.
- Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., and Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell* 10, 735–748.
- Sluss, H.K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D.C., Wilson, C., Davis, R.J., and Ip, Y.T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 2745–2758.
- Smith, M.L., Kontny, H.U., Bortnick, R., and Fornace, A.J. (1997). The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity. *Exp. Cell Res.* 230, 61–68.
- Smith, S.T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E., and Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 162–167.

- Srinivasan, S., Armstrong, J.A., Deuring, R., Dahlsveen, I.K., McNeill, H., and Tamkun, J.W. (2005). The *Drosophila trithorax* group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Dev. Camb. Engl.* 132, 1623–1635.
- Srinivasan, S., Dorighi, K.M., and Tamkun, J.W. (2008). *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet.* 4, e1000217.
- Staeva-Vieira, E., Yoo, S., and Lehmann, R. (2003). An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. *EMBO J.* 22, 5863–5874.
- Stanyon, C.A., Liu, G., Mangiola, B.A., Patel, N., Giot, L., Kuang, B., Zhang, H., Zhong, J., and Finley, R.L. (2004). A *Drosophila* protein-interaction map centered on cell-cycle regulators. *Genome Biol.* 5, R96.
- St Johnston, R.D., Hoffmann, F.M., Blackman, R.K., Segal, D., Grimaila, R., Padgett, R.W., Irick, H.A., and Gelbart, W.M. (1990). Molecular organization of the decapentaplegic gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 4, 1114–1127.
- Straßburger, K., Tiebe, M., Pinna, F., Breuhahn, K., and Teleman, A.A. (2012). Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. *Dev. Biol.* 367, 187–196.
- Struhl, G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7380–7384.
- Struhl, G., and Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527–540.
- Sun, G., and Irvine, K.D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev. Biol.* 350, 139–151.
- Swarup, S., and Verheyen, E.M. (2012). Wnt/Wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Tabata, T. (2001). Genetics of morphogen gradients. *Nat. Rev. Genet.* 2, 620–630.
- Takahashi, K.H., Okada, Y., Teramura, K., and Tsujino, M. (2011). Deficiency mapping of the genomic regions associated with effects on developmental stability in *Drosophila melanogaster*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 65, 3565–3577.
- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., and Kennison, J.A. (1992). *brhma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561–572.
- Tamori, Y., and Deng, W.-M. (2011). Cell competition and its implications for development and cancer. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 38, 483–495.

Tamura, K., Kanaoka, Y., Jinno, S., Nagata, A., Ogiso, Y., Shimizu, K., Hayakawa, T., Nojima, H., and Okayama, H. (1993). Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1. *Oncogene* 8, 2113–2118.

Tanaka, Y., Katagiri, Z.-I., Kawahashi, K., Kioussis, D., and Kitajima, S. (2007). Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 397, 161–168.

Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C.R., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467–478.

Teleman, A.A., Hietakangas, V., Sayadian, A.C., and Cohen, S.M. (2008). Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metab.* 7, 21–32.

Thakur, M. Das, Feng, Y., Jagannathan, R., Seppa, M.J., Skeath, J.B., and Longmore, G.D. (2010). Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Curr. Biol. CB* 20, 657–662.

Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E., and Harte, P.J. (2001). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* 128, 275–286.

Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3131–3141.

Tie, F., Banerjee, R., Saiakhova, A.R., Howard, B., Monteith, K.E., Scacheri, P.C., Cosgrove, M.S., and Harte, P.J. (2014). Trithorax monomethylates histone H3K4 and interacts directly with CBP to promote H3K27 acetylation and antagonize Polycomb silencing. *Dev. Camb. Engl.* 141, 1129–1139.

Tolhuis, B., de Wit, E., Muijrsers, I., Teunissen, H., Talhout, W., van Steensel, B., and van Lohuizen, M. (2006). Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38, 694–699.

Treisman, J.E., Luk, A., Rubin, G.M., and Heberlein, U. (1997). eyelid antagonizes wingless signaling during *Drosophila* development and has homology to the Bright family of DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 11, 1949–1962.

Tyler, D.M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B., and Baker, N.E. (2007). Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* 175, 643–657.

Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* 5, 914–920.

Venken, K.J.T., Schulze, K.L., Haelterman, N.A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J.W., Levis, R.W., Spradling, A.C., Hoskins, R.A., et al. (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat. Methods* 8, 737–743.

- Villa del Campo, C., Clavería, C., Sierra, R., and Torres, M. (2014). Cell competition promotes phenotypically silent cardiomyocyte replacement in the mammalian heart. *Cell Rep.* *8*, 1741–1751.
- Vincent, J.-P., Kolahgar, G., Gagliardi, M., and Piddini, E. (2011). Steep differences in wingless signaling trigger Myc-independent competitive cell interactions. *Dev. Cell* *21*, 366–374.
- Vincent, J.-P., Fletcher, A.G., and Baena-Lopez, L.A.I. (2013). Mechanisms and mechanics of cell competition in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 581–591.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1476–1481.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* *150*, 563–565.
- Wagstaff, L., Kolahgar, G., and Piddini, E. (2013). Competitive cell interactions in cancer: a cellular tug of war. *Trends Cell Biol.* *23*, 160–167.
- Wakimoto, B.T., and Kaufman, T.C. (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *81*, 51–64.
- Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Müller, H.A., and Hay, B.A. (1999). The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* *98*, 453–463.
- Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B.R., and Crabtree, G.R. (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* *10*, 2117–2130.
- Wartlick, O., Mumcu, P., Jülicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. (2011). Understanding morphogenetic growth control — lessons from flies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 594–604.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* *264*, 677–683.
- Willmore, K.E., and Hallgrímsson, B. (2005). Within individual variation: developmental noise versus developmental stability. *Var. Cent. Concept Biol.* 191–218.
- Xu, G., Bernaudo, S., Fu, G., Lee, D.Y., Yang, B.B., and Peng, C. (2008). Cyclin G2 is degraded through the ubiquitin-proteasome pathway and mediates the antiproliferative effect of activin receptor-like kinase 7. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4968–4979.
- Ye, X., Deng, Y., and Lai, Z.-C. (2012). Akt is negatively regulated by Hippo signaling for growth inhibition in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *369*, 115–123.
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.-M., and Pan, D. (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* *18*, 288–299.

- Yu, X., Wang, L., Acehan, D., Wang, X., and Akey, C.W. (2006). Three-dimensional Structure of a Double Apoptosome Formed by the *Drosophila* Apaf-1 Related Killer. *J. Mol. Biol.* *355*, 577–589.
- Yue, T., Tian, A., and Jiang, J. (2012). The cell adhesion molecule echinoid functions as a tumor suppressor and upstream regulator of the Hippo signaling pathway. *Dev. Cell* *22*, 255–267.
- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 2265–2278.
- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* *87*, 833–844.
- Zhang, Y., and Lai, Z.-C. (2013). Mob as tumor suppressor is regulated by bantam microRNA through a feedback loop for tissue growth control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *439*, 438–442.
- Zhang, H., Stallock, J.P., Ng, J.C., Reinhard, C., and Neufeld, T.P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* *14*, 2712–2724.
- Zhao, L., Samuels, T., Winckler, S., Korgaonkar, C., Tompkins, V., Horne, M.C., and Quelle, D.E. (2003). Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol. Cancer Res. MCR* *1*, 195–206.
- Zimmermann, M., Arachchige-Don, A.S., Donaldson, M.S., Dallapiazza, R.F., Cowan, C.E., and Horne, M.C. (2012). Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to doxorubicin. *J. Biol. Chem.* *287*, 22838–22853.
- Ziosi, M., Baena-López, L.A., Grifoni, D., Froidi, F., Pession, A., Garoia, F., Trotta, V., Bellosta, P., Cavicchi, S., and Pession, A. (2010). dMyc functions downstream of Yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant cells. *PLoS Genet.* *6*, e1001140.

Cycline G et le maintien de l'homéostasie des tissus au cours du développement chez *Drosophila melanogaster*

L'homéostasie des tissus et la formation d'organes fonctionnels au cours du développement mettent en jeu un équilibre entre prolifération, croissance, mort et différenciation des cellules. Cycline G de *D. melanogaster* est une protéine impliquée dans plusieurs de ces processus de maintien de l'homéostasie tissulaire.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que Cycline G est impliquée dans le maintien épigénétique des identités cellulaires au cours du développement. En effet, *CycG* interagit avec des gènes codant des facteurs chromatinien des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG), impliqués respectivement dans le maintien d'un état réprimé ou activé des gènes au cours des divisions cellulaires. Ces interactions corrént avec une modification du profil d'expression des gènes homéotiques *Scr* et *Ubx*, qui suggère un rôle de Cycline G dans la répression de ces gènes.

Je me suis également intéressée au rôle de *CycG* dans la stabilité du développement (SD), qui participe au maintien de l'homéostasie en contrôlant les variations stochastiques des processus développementaux. En effet, la surexpression de *CycG* induit une asymétrie visible de la taille des ailes des mouches, indiquant que la SD est altérée. L'étude des bases génétiques de ce processus par une analyse de gènes candidats suggère que des gènes PcG et *trxG* jouent un rôle dans la SD. Par ailleurs, l'asymétrie induite par *CycG* est aggravée par des mutations des effecteurs de la compétition cellulaire, un mécanisme *via* lequel des cellules entraînent l'apoptose de cellules voisines de moindre capacité proliférative. Ces résultats soulèvent l'intéressante possibilité d'une implication de la compétition cellulaire dans la SD.

Mots clés : Cycline G, homéostasie tissulaire, stabilité du développement, épigénétique, drosophile

Cyclin G and tissue homeostasis during development in *Drosophila melanogaster*

Tissue homeostasis and formation of functional organs during development require a precise balance between proliferation, growth, cell death and differentiation. *Drosophila* Cyclin G is involved in several of these processes.

During my PhD, I showed that Cyclin G is implicated in epigenetic maintenance of cell identities during development. Indeed *CycG* interacts with genes of the Polycomb (PcG) and trithorax (*trxG*) groups that encode chromatin factors involved in the maintenance through cell divisions of repressed or active transcriptional state of genes, respectively. These interactions correlate with a change of the homeotic genes *Scr* and *Ubx* expression profile, suggesting a role for Cyclin G in the repression of these genes.

I also addressed the role of *CycG* in developmental stability that participates in tissue homeostasis by buffering stochastic variations of developmental processes, also known as developmental noise. *CycG* overexpression induces a visible asymmetry of wing size, indicating that developmental stability is impaired. Genetic and cellular bases of this process are poorly understood. The results of a gene candidate approach suggest that PcG and *trxG* genes contribute to developmental stability. Besides, *CycG*-induced asymmetry is increased by mutating effectors of cell competition, a phenomenon through which cells induce apoptosis of less fit neighbour cells. These observations raise the question of a role for cell competition in developmental stability.

Keywords: Cyclin G, tissue homeostasis, developmental stability, epigenetics, drosophila