



HAL
open science

La régulation des cellules souches adultes intestinales de *drosophila melanogaster* : Comment SPEN influence un destin cellulaire

Mahéva Andriatsilavo Rakoto

► **To cite this version:**

Mahéva Andriatsilavo Rakoto. La régulation des cellules souches adultes intestinales de *drosophila melanogaster* : Comment SPEN influence un destin cellulaire. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066381 . tel-01272831

HAL Id: tel-01272831

<https://theses.hal.science/tel-01272831>

Submitted on 12 Feb 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

Ecole doctorale Complexité du Vivant, ED515

*Laboratoire de Génétique et Biologie du Développement
Equipe Cellules souches et homéostasie tissulaire, Institut Curie*

Thèse de doctorat de Génétique

Présentée par

Mahéva Andriatsilavo

**La régulation des cellules souches adultes intestinales
de *Drosophila melanogaster* :**

Comment SPEN influence un destin cellulaire.

Dirigée par Allison Bardin

Présentée et soutenue publiquement le 29 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Sophie Louvet-Vallée

Présidente

Dr. Florence Besse

Rapporteur

Dr. Thomas Mercher

Rapporteur

Dr. Cédric Maurange

Examineur

Dr. Thierry Jaffredo

Examineur

Dr. Allison Bardin

Directrice de Thèse

Résumé

Les cellules souches adultes sont des cellules non différenciées, essentielles au le renouvellement constant de nos tissus. Elles produisent des cellules différenciées nécessaires au fonctionnement de nos organes, tout en maintenant un réservoir de cellules souches dans le tissu. Cet équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire est crucial pour le maintien d'un état constant du tissu appelé homéostasie tissulaire.

Entre identité « souche » et différenciation : Quels programmes génétiques contrôlent ces états ? Cette question suscite un intérêt majeur tant pour la recherche dans le domaine des cellules souches que pour les perspectives thérapeutiques qui en découlent. Dans cette optique, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un nouveau rôle du gène *spen* dans le contrôle des cellules souches intestinales chez *Drosophila melanogaster*.

Les protéines de la famille SPEN sont conservées au cours de l'évolution (Métazoaires, Plantes). Elles sont impliquées dans des processus cellulaires clés comme la survie cellulaire, la différenciation ou encore la prolifération cellulaire, et sont associées à des processus moléculaires tels que la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Nous avons mis en évidence qu'une inactivation du gène *spen* est à l'origine d'une accumulation aberrante des cellules souches au sein de l'intestin de drosophile. Ainsi, en combinant des techniques de génétique et d'analyses *in vivo*, ce travail montre que Spen est un facteur clé du processus de spécialisation des cellules souches intestinales et de la régulation de leur prolifération.

Ces travaux s'inscrivent également dans l'effort commun de compréhension des programmes génétiques de l'établissement de l'identité cellulaire. Ainsi, la mise en place d'un protocole de purification par FACS des cellules souches et de leurs cellules filles, associé à un séquençage à grande échelle des ARN, a permis de mettre à jour les réseaux de gènes régulés par Spen dans les cellules souches. Plus généralement, cette étude participe à la compréhension de la fonction moléculaire des protéines de la famille SPEN dans les cellules souches et les dérégulations à l'origine des pathologies auxquelles elles sont associées.

Summary

Adult stem cells are non-differentiated cells that maintain tissue homeostasis by supplying differentiated cells while at the same time self-renewing. How is this balance between stem cell state and differentiated state controlled? This question became one of the major interests of the Stem cell research and Translation, mostly due to the potential therapeutic perspectives that it gives. Regarding this effort, this thesis work describes a new function of a gene call *split-ends/spen* in adult stem cell regulation in *Drosophila* intestine.

SPEN family is composed by essential genes, which codes conserved proteins from Plants to Metazoa. They are involved in key cellular processes such as cell death, differentiation or proliferation, and are associated with various molecular functions controlling transcriptional and post-transcriptional gene expression. We found that a *spen* inactivation in *Drosophila* intestine leads to an abnormal increase in adult stem cells. In this work, by combining genetics tools and *in vivo* stem cell analysis methods, we could show that Spen works as a key factor of intestinal stem cell commitment and plays a role in their proliferation control.

How does genetics programs control cellular identity? In order to investigate the molecular signature of intestinal stem cells and progenitor cells knockdowned for *spen*, we combined genetics, cell sorting and mRNA sequencing analysis to uncovered Spen target genes regulated in intestinal stem cells. Here, we provide a new function of *spen* in adult stem cell regulation, which may also shed light on its mode of action in other developmental and pathological contexts.

Remerciements

Les remerciements, les dernières pages écrites de ce manuscrit. C'est avec ces derniers mots que je souhaite clôturer ce processus d'écriture. Ce travail de thèse, condensé dans ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui sans les personnes côtoyées tout au long de ces 4 années, ces rencontres et ces échanges qui se sont créés.

Je souhaiterais commencer par remercier la Région Ile de France, la Fondation pour la Recherche Médical et l'Institut Curie d'avoir financé ce travail de thèse.

Je remercie les membres du jury Florence Besse, Sophie Louvet-Vallée, Cédric Maurange, Thierry Jaffredo et Thomas Mercher, d'avoir accepté de faire parti de ce jury et d'évaluer mon travail. Merci Florence et Thomas pour votre lecture pointilleuse de ce manuscrit et de votre disponibilité pour discuter de ce travail. Merci pour vos commentaires et suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Je souhaiterais également remercier les membres de mon comité de thèse, Alain Vincent, Agnès Audibert et Hervé Le Hir pour avoir accepté de suivre ce travail au fil des années.

Je tiens tout particulièrement à remercier Allison Bardin, ma directrice de thèse qui m'a enrôlée dans cette aventure de Spen et de Droso. Je me rappellerai toujours nos débuts dans ce laboratoire vide et nos déjeuners au soleil. Le laboratoire a bien grandi aujourd'hui. Durant toutes ces années, j'ai beaucoup appris. Merci d'avoir eu confiance en moi, pour ta présence dans le laboratoire, ta disponibilité, tes conseils, ton dynamisme et merci d'avoir été là pour les moments de joies et de m'avoir soutenue dans les moments plus difficiles.

Merci à l'équipe « Bardin » pour cette ambiance chaleureuse et conviviale, ces grands moments de rires, d'entre-aides et de science. Kasia, dziękuję za te chwile, w laboratorium, nasze małe przerywniki muzycznych po 18 godzin, to była przyjemność być twoim Labmate ! And let's take these last few months to do more Jazz concerts !! Louis, Jérémy, j'ai pu réviser ma culture geek grâce à vous, bien que je sois toujours un peu confuse sur les X-men... Patricia, ce fut un plaisir de partager le bureau avec toi. Tu auras été d'une grande aide au cours de ces années. Spen n'avait qu'à bien se tenir ! Ses 40kb n'ont pas pu résister à tes *Golden Hands* du clonage.

Merci au « 4th floor » de la BDD, avec les équipes de Jean-René Huynh et de Yohanns Bellaiche. La « Fly Room » is the place to be. I have learned a lot. Thanks for all the genetic tricks you gave to me and thanks to have shared with me your virgins. Many thanks to Ana Maria, Anahi, Jesus, Floris, Diana, Nico, Zhimmin, Maria, Stéphane, Boris.

Merci à Aurélien et Roberta de m'avoir permise de mettre du vent dans vos cordes. Que de bons moments ! Merci Alice de m'avoir accompagnée durant ces quelques années et d'avoir mis au défi mes capacités flûtistiques. Nos répét' ont été pour moi une évasion, de grands moments d'enrichissement personnel, de découvertes, d'amusement... Ces années auraient été bien vides sans cette musique et sans vous.

Merci à Clara qui a traversé la Manche. Ces premières années avec toi furent magiques ! Pleines de « Rigolades ». Merci d'avoir été là ! E você, Neuzinha, também um grande obrigado por seu apoio e sua cumplicidade. Obrigado por estar lá. Sophie, sua partida para outro continente não me faz esquecer como eu estava feliz em conhecê-lo. Obrigado por estar lá, seu apoio e seu conselho.

Je souhaite te remercier Alex pour être à mes côtés. Ta patience a été mise à rude épreuve pour m'apprendre les bases de Linux et des lignes de commande. Merci d'avoir accepté de te confronter au génome de *Drosophila melanogaster* en m'aidant dans l'analyse des mes données de séquençage.

Merci également à vous les Loulous, Sophie, Antoine, Vasco, Alex pour ces instants de décompresser, Lemon Tree, la Corse, Benon, les bonnes bouffes... Il me faudrait plus de lignes pour décrire tous ces moments !

Merci à ma Mère, Claude, Titinou, Papi. Merci de m'avoir permise de monter dans le Nord, et de réaliser cette thèse sur *Drosophila melanogaster*. Pour finir, merci à toi Droso de m'avoir fait aimer la génétique et de m'avoir fait prendre goût à tes croisements parfois alambiqués.

Merci

Table des matières

RESUME.....	3
SUMMARY.....	5
REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES.....	9
ABREVIATIONS.....	13
TABLE DES FIGURES	15
INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE 1. LE CONCEPT DES CELLULES SOUCHES : UNE VUE D'ENSEMBLE.....	19
I. L'EMERGENCE D'UN CONCEPT	19
II. LES CELLULES SOUCHES : DE NOS JOURS	21
III. LES CELLULES SOUCHES ADULTES : UNE COMBINAISON DE MECANISMES EXTRINSEQUES ET INTRINSEQUES DANS LA REGULATION DE LEUR DESTIN	25
Le concept de niche.....	27
Les cellules germinales de drosophile : le contrôle d'une division orientée	27
La crypte intestinale : une concentration des signaux de maintenance de l'état « souche »	29
La niche du follicule pileux : Un contrôle à distance des cellules souches.....	31
Une localisation asymétrique de facteurs moléculaires	32
Une maintenance de l'intégrité « souche » ?	33
CHAPITRE 2. L'INTESTIN DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>, UN MODELE D'ETUDE DES CELLULES SOUCHES ADULTES <i>IN VIVO</i>.....	35
I. LA CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES : LA NAISSANCE D'UN MODELE.....	35
L'auto-renouvellement et la multipotence.	35
Une origine commune pour les cellules différenciées de l'intestin de drosophile.....	37
L'Entéroblaste : un progéniteur post-mitotique.	39
L'identification de marqueurs moléculaires.	39
II. LA VOIE NOTCH ET LA REGULATION DU LIGNAGE INTESTINAL DE LA DROSOPHILE.....	40
Un signal primaire de spécification	40
Des variations dans le niveau d'activation de la voie Notch	41
Une activation et une expression unilatérale	43
Une redéfinition du lignage intestinal	46
III. LES CELLULES SOUCHES DANS LEUR CONTEXTE TISSULAIRE ET ENVIRONNEMENTAL.....	47
L'appareil digestif de Drosophile, une organisation simple mais structurée.....	47
Une niche intestinale ?.....	51
Le maintien de l'intégrité tissulaire.....	53
La régulation de la prolifération des cellules souches au cours du renouvellement naturel du tissu.....	54
Un mode de division Asymétrique vs. Symétrique.	55
IV. L'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX REGULATEURS DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES DE DROSOPHILE.....	57
Deux stratégies complémentaires dans l'identification de nouveaux régulateurs de l'homéostasie tissulaire.....	57
(i) Du gène au phénotype : à la recherche d'une fonction	57
(ii) Un phénotype associé à une mutation : à la recherche d'un gène	61
CHAPITRE 3. <i>SPEN</i> : UN GENE AUX MULTIPLES FACETTES.....	63
I. UNE FAMILLE DE GENES CONSERVEE CHEZ LES <i>METAZOAIRES</i> ET LES PLANTES.....	63
II. <i>SPEN</i> ET LA REGULATION DE PROCESSUS CELLULAIRES DIVERS	67
<i>spen</i> et la Neurogénèse : une implication dans l'axonogénèse et la survie cellulaire	67
<i>spen</i> : un gène important pour le maintien de l'intégrité tissulaire.....	72
<i>Spen</i> et la régulation du cycle cellulaire au cours du développement de l'œil de drosophile.....	73
<i>Spen</i> et la détermination cellulaire	77

III. SPEN A LA CROISEE DE MULTIPLES MECANISMES MOLECULAIRES.....	79
Une interface entre la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression génique	79
Une plateforme d'interaction pour les acides nucléiques et les protéines.	81
(i) Les domaines RRM de la famille SPEN.....	81
(ii) Le domaine SPOC au cœur des interactions protéiques	83
(iii) La prédiction d'une région riche en acide Glutamique et Lysine et d'une région riche en Glutamine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	85
(iv) La présence d'un domaine de liaison à la protéine RBPj au sein des protéines SPEN chez les mammifères.....	87
MATERIELS & METHODES	89
DISSECTION, FIXATION AU PARAFORMALDEHYDE (PFA) ET IMMUNO-MARQUAGE DES INTESTINS ADULTES DE DROSOPHILE.....	91
FIXATION AU METHANOL DES INTESTINS ADULTES DE DROSOPHILE	92
DISSECTION, FIXATION ET IMMUNO-MARQUAGE DES DISQUES IMAGINAUX DE LARVES DE DROSOPHILE.....	93
PURIFICATION DE CHROMOSOMES BACTERIE (BAC).....	94
PRODUCTION DE BACTERIES ELECTROCOMPETANTES	95
FACS ISOLATION & PURIFICATION OF DROSOPHILA INTESTINAL CELLS FOR RNA SEQUENCING	96
RESULTATS	99
PARTIE I. SPEN, UN NOUVEAU REGULATEUR DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES, CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER.	101
I. RESUME DE LA PREMIERE PARTIE	103
II. ARTICLE : SPEN LIMITE L'AUTO-RENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES.....	107
<i>Abstract</i>	108
<i>Introduction</i>	108
<i>Results</i>	112
spen limits intestinal stem cell number in the adult midgut.....	112
spen controls early stem cell commitment events.	114
Spn's role in stem cell fate is independent of proliferation.....	116
Identification of spen-dependent transcripts by RNAseq	117
<i>Discussion</i>	120
<i>Materials and Methods</i>	123
<i>Figures</i>	126
PARTIE II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LA FONCTION DE SPEN DANS LA REGULATION DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES DE DROSOPHILA MELANOGASTER.	137
I. LE GENE SPEN EST EXPRIME DANS LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES DE DROSOPHILE.	139
II. SPENITO NE SEMBLE PAS ETRE UN REGULATEUR MAJEUR DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES DE DROSOPHILE.....	141
III. HDAC3, UN COMPOSANT DU COMPLEXE SPEN/NCOR/HDACS LIMITE LA PRODUCTION DE CELLULES SOUCHES DANS LE TISSU.	143
IV. SPEN ET LA BIOGENESE DES ARN	145
<i>Etude de l'usage exonique dépendant de la fonction de Spn</i>	145
<i>Le cas de la régulation de la biogénèse des transcrits codant la Kinésine Unc-104/KIF1</i>	148
V. LARK : UN NOUVEAU REGULATEUR DE L'HOMEOSTASIE DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES.....	149
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	153
I. QUELS SONT LES PROCESSUS AFFECTES PAR UNE PERTE DE FONCTION DU GENE SPEN ?	155
L'identité moléculaire des cellules souches intestinales et de leurs progéniteurs	155
Une régulation de l'efficacité d'activation de la voie Notch.....	156
L'absence de spen : un état de stress intestinal et une perte de l'intégrité tissulaire ?	159
Les gènes cibles de Spn.....	161
La biosynthèse des ancrs GPI, un processus fondamental de l'homéostasie des cellules souches.	161

Un défaut de la biosynthèse des ancres GPI à l'origine d'une potentielle perturbation du réseau de molécules de signalisations ?	163
II. QUELLE EST LA FONCTION MOLECULAIRE DE SPEN DANS LA REGULATION DU LIGNAGE INTESTINAL ?	164
Spen, un potentiel répresseur de la transcription dans le contrôle de la production des cellules souches intestinales	165
Spen et la régulation des ARN dans l'intestin de drosophile	167
BIBLIOGRAPHIE	171
ANNEXES	197
REVUE : L'INTESTIN MOYEN DE DROSOPHILE : UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DES CELLULES SOUCHES ADULTES IN VIVO	199
LISTES DES ECHANTILLONS RECOLTES.....	207
ANALYSE AU BIOANALYSEUR DES ECHANTILLONS RECOLTES	208
APERÇU GLOBAL DES ANALYSES BIOINFORMATIQUES EFFECTUEES	209
COMMANDES UTILISEES POUR LES ANALYSES BIOINFORMATIQUES	211

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	MKL1 : « <i>Megakaryoblastic leukemia 1</i> »
AHS : « <i>After heat shock</i> »	Mu : <i>Mus musculus</i>
Anpt : « <i>Antennapedia</i> »	MV : Muscles viscéraux
apc : « <i>adenomatous polyposis coli</i> »	NCOR : « <i>Nuclear receptor corepressor</i> »
At : <i>Arabidopsis thaliana</i>	NECD : « <i>Notch Extracellular domain</i> »
ARN : Acide RiboNucléique	NICD : « <i>Notch Intracellular domain</i> »
ARNi : Acide RiboNucléique interférence	Neur : <i>Neuralized</i>
ARNnc : Acide RiboNucléique non-codant	NuRD : « <i>Nucleosome Remodeling Deacetylase complex</i> »
Ast : Allatostatine	PAR : « <i>Partitioning defect</i> »
Bmp : « <i>Bone morphogenetic protein</i> »	pH3 : phosphorylation de l'Histone 3 sur la sérine 10
CBC : « <i>Crypt basal cell</i> »	PHD : « <i>Plant Homeodomain</i> »
Ce : <i>Caenorhabditis elegans</i>	PHF3 : « <i>PHD finger protein 3</i> »
CSH : cellule(s) souche(s) hématopoiétique(s)	Pi3k : « <i>Phospho-inositide 3-kinase</i> »
CSI : cellule(s) souche(s) intestinale(s)	PRC2 : « <i>Polycomb Repressor Complexe 2</i> »
DH : Hormones Diurétiques	Pros : Prospero
DIDO-1 : « <i>Death inducer-obliterator 1</i> »	PvR : « <i>Platelet-derived Growth Factor-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-related</i> »
DiLP3 : « <i>Drosophila Insulin-like peptide 3</i> »	RBM15 : « <i>RNA-binding motif protein 15</i> »
DIO : « <i>Death inducer-obliterator</i> »	RBPID : « <i>RBP interaction domain</i> »
DI : Delta	RBPJ : « <i>recombination signal binding protein for immunoglobulin k J region</i> »
Dm : <i>Drosophila melanogaster</i>	RE : Réticulum Endoplasmique
Dpp : « <i>Decapentaplegic</i> »	RID : « <i>nuclear receptor interaction domain</i> »
E(spl)-C : Enhancer of split complexe	ROS : « <i>Reactive Oxygen Species</i> »
EB : Entéroblaste(s)	RRM : « <i>RNA Recognition motifs</i> »
EC : Entérocyte(s)	Sc : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EE : Entéroendocrine(s)	SHARP : « <i>SMRT/HDAC1-associated repressor protein</i> »
EGF : « <i>Epidermal Growth Factor</i> »	SMRT : « <i>silencing mediator for retinoid and thyroid receptors</i> »
EK : Acide Glutamique et Lysine	Spen : Split ends
EMS : Méthanesulfonate d'éthyle	SPOC : « <i>Spen paralog and ortholog C-terminal</i> »
esg : escargot	STAT : « <i>signal transducer and activator of transcription</i> »
FACS : « <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> »	Su(H) : Suppressor-of-Hairless
FGF : « <i>Fibroblast growth factor</i> »	TFIIS : « <i>Transcription factor S-II domain</i> »
GluR : Récepteur au glutamate	Tk : Tachykinine
GPI : Glycosyl-phosphatidylinositol	Upd3 : Unpaired 3
GPI-AP : Protéine liée à une ancre GPI	UTR : « <i>Untranslated region</i> »
HDAC : Histone Déacétylase	Wg : wingless
HES : « <i>Hairy/Enhancer of split</i> »	WTAP : « <i>Wilm's tumor 1 associated protein</i> »
Hh : Hedgehog	Xist : « <i>X Inactive Specific Transcript</i> »
Hm : <i>Homo sapiens</i>	ZM : Zone Marginale
InR : « <i>Insuline Receptor</i> »	
JAK : « <i>Janus kinase</i> »	
JNK : « <i>c-Jun N terminale Kinase</i> »	
Lch : Neurone chordotonal latéral	
Lgr5 : « <i>Leucine-rich repeat- containing G protein-coupled receptor 5</i> »	
MAPK : « <i>Mitogen-activated protein kinases</i> »	
miARN : micro Acide RiboNucléique	

Table des figures

Introduction

Figure 1. Représentations historiques des cellules souches et de leur lignage.	20
Figure 2. Un potentiel de différenciation hiérarchisé des cellules souches.	22
Figure 3. Schématisation des mécanismes du contrôle de la division asymétrique des cellules souches.	26
Figure 4. Les cellules souches intestinales et leur niche chez les mammifères.	28
Figure 5. Les différentes phases du cycle de régénération du follicule pileux.	30
Figure 6. Modèles de répartition des clones transitoires.	36
Figure 7. Le lignage intestinal de drosophile.	38
Figure 8. Représentation d'une division asymétrique à l'origine de la production d'un Entérocyte.	42
Figure 9. Modèle de régulation de la voie Notch dans le lignage intestinal.	44
Figure 10. Organisation structurelle de l'intestin moyen de drosophile.	48
Figure 11. Contrôle de la prolifération des CSI à l'état d'homéostasie tissulaire et en réponse à un stress.	50
Figure 12. Phénotypes criblés par Zeng et al. 2015.	58
Figure 13. Phénotypes criblés par A. Bardin lors du crible génétique issue d'une mutagenèse non-dirigée.	60
Figure 14. Les protéines de la famille SPEN.	62
Figure 15. Arbre phylogénétique des protéines de la famille SPEN.	64
Tableau 1. Récapitulatif des phénotypes liés à une perte de fonction du gène <i>spen</i>	65
Figure 16. <i>spen</i> est impliqué dans le développement du centre nerveux périphérique de l'embryon de drosophile.	66
Figure 17. Développement du système nerveux central dans l'embryon de drosophile.	68
Figure 18. Schématisation de l'implication des protéines de la famille SPEN au cours de l'hématopoïèse.	76
Figure 19. Interactions de SHARP/Spen chez les Mammifères.	80
Figure 20. Prédiction d'un domaine de type Atrophin "RE-Repeat" dans la séquence protéine de Spen chez <i>D. melanogaster</i>	84

Résultats : partie I.

Figure 1. <i>spen</i> inactivation leads to an accumulation of intestinal stem cell-like cells in the adult midgut.	126
Figure 2. <i>spen</i> controls early stem cell commitment event, prior or in parallel to Notch nuclear activity.	127
Figure 3. Stem cell-like cell accumulation upon <i>spen</i> inactivation is independent of proliferation.	128
Figure 4. <i>spen</i> knockdown in stem cell is sufficient to trigger stem cell expansion in the intestine.	129
Figure 5. RNAseq analysis from two-color FACS sorted ISC and EB.	130
Figure 6. Spen-dependent transcript identification by RNAseq.	131
Table 1. GO Term Enrichment in Intestinal Stem Cells and in Enteroblastes.	132
Figure S1. Spen inactivation leads to stem cell-like cells accumulation expressing several ISCs markers.	133
Figure S2. <i>spen</i> inactivation has no phenotype in the notum or the ovaries.	134
Figure S3. Delta protein accumulation upon <i>spen</i> inactivation occurs earlier than proliferation.	135
Figure S4. Spen-dependent transcripts.	136

Résultats : partie II.

Figure 1. <i>spen</i> gene is expressed in intestinal stem cells.	138
Figure 2. SPOC domain overexpression and <i>spenito</i> downregulation do not affect stem cell homeostasis.	141
Figure 3. <i>hdac3</i> loss-of-function leads to an accumulation of stem cell-like cells with an enrichment of Delta protein at the membrane.	142
Figure 4. Distribution of alternative events dependent of Spen function.	144
Figure 5. The Kinesin Unc-104/Klp53D/KIF1A is required for intestinal stem cell homeostasis.	147
Figure 6. The RNA binding protein Lark is required in stem cell and/or progenitor cells to limit stem cell production in the intestine.	150
Figure 7. <i>staufen</i> is required to limit stem cell proliferation and expansion.	151

Discussion & Perspectives

Figure 1. Schématisation de l'activation du récepteur Notch et de la régulation de son ligand Delta.	157
Figure 2. Les étapes de Biosynthèse des protéines liées aux ancras GPI.	162
Figure 3. Un modèle d'action de Spen sur la répression transcriptionnelle au cours de la spécification des cellules souches.	166
Figure 4. Couplage de la transcription et de la transcription.	168

INTRODUCTION

Chapitre 1 | Le concept des cellules souches : une vue d'ensemble

I. L'émergence d'un concept

De la rencontre entre deux gamètes (mâle et femelle) naît une cellule-œuf. Elle est à l'origine de l'ensemble des cellules qui forment notre organisme, nos tissus. Un long chemin constitué d'une série d'évènements de divisions et de spécifications sépare cette cellule unique de l'individu adulte que nous sommes.

La notion de cellule souche traduisant l'idée d'une origine commune à l'ensemble des types cellulaires est apparue avec Ernst Haeckel dans son livre « *Histoire de la création* » en 1868 (Haeckel, 1868). Elle fut influencée par Darwin qui à la même époque proposait sa théorie sur l'origine commune des espèces. Tel un arbre phylogénétique représentant l'ancêtre unicellulaire commun des organismes multicellulaires : dénommé la « cellule souche » (traduit de l'allemand « *Stammzelle* »), il reprendra ce terme pour définir la cellule-œuf à l'origine de l'ensemble des cellules d'un organisme (Haeckel, 1877). En 1892, avec Theodor Boveri et Valentin Haecker, le terme de « cellule souche » est étendu à ce que nous appelons aujourd'hui les cellules germinales primordiales (**Fig.1**) (Boveri, 1892; Haecker, 1892). Ceci est influencé par la théorie d'August Weismann sur la ségrégation précoce au cours du développement embryonnaire des tissus somatique et germinale (Weismann, 1885), et de l'observation chez les crustacés (les *Cyclops*) de l'existence d'une cellule se divisant de manière asymétrique pour générer une cellule fille à l'origine du mésoderme et une seconde cellule fille qui formera la lignée germinale, la cellule souche germinale. C'est ainsi qu'apparaissent dans la définition de « cellule souche », les notions de spécification et de lignage commun, ainsi que la notion d'auto-renouvellement, en référence à la lignée germinale qui est maintenue tout au long de la vie d'un individu et transmise à la génération suivante.

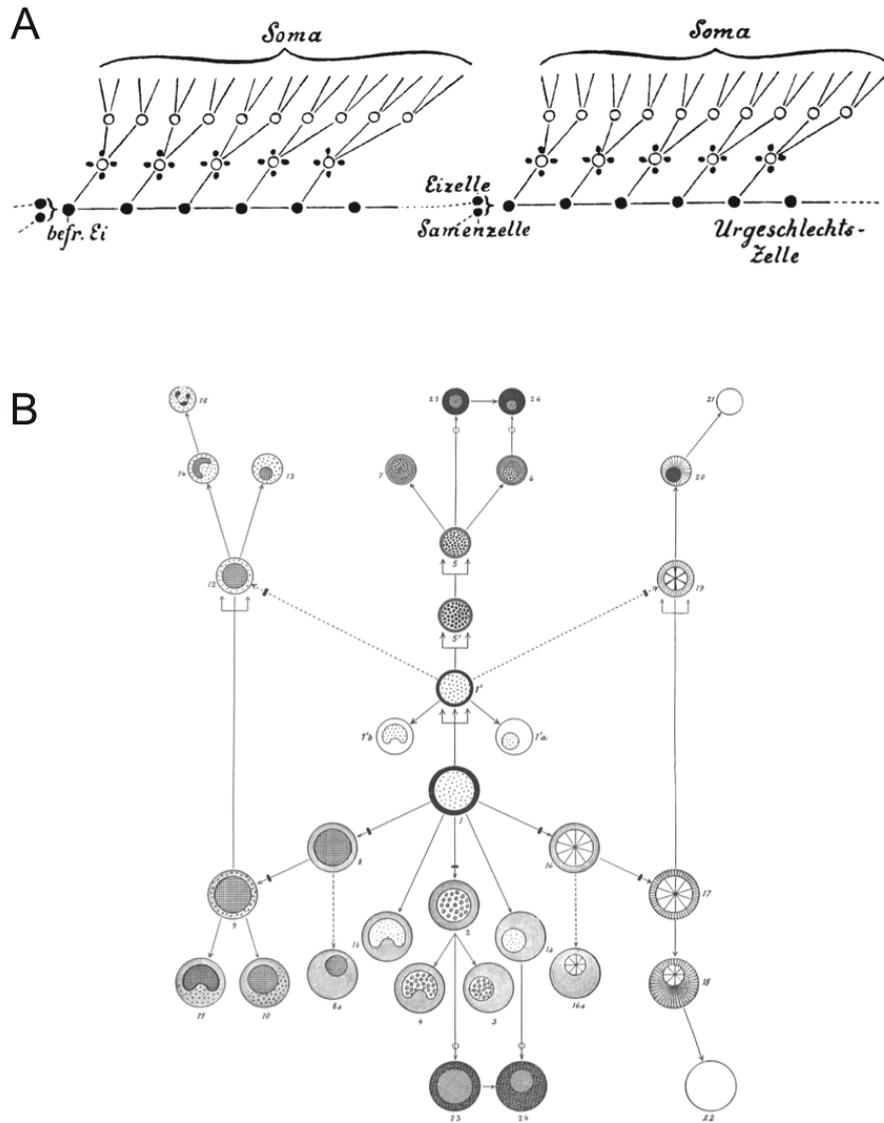


Figure 1. Représentations historiques des cellules souches et de leur lignage. A) Représentation de l’auto-renouvellement et de la différenciation au cours du développement embryonnaire de l’intestin de *Ascaris megalocephala* par Theodor Boveri (1892). La ligne horizontale reliant des cercles pleins noirs représente les « cellules souches » (Stammzellen), débutant à gauche par la cellule-œuf fertilisée, puis des cinq divisions de la « cellule souche germinale primordiale » (Urgeschlechtszelle). Le premier niveau de cercles blancs entourés de points noirs représentent les « cellules souches somatiques primordiales » (Ursomazellen), le second niveau de cercles blancs : les cellules souches somatiques. Deux générations sont représentées. **B)** Représentation de l’hématopoïèse par Artur Pappenheim (1905). La cellule centrale représente le potentiel progéniteur commun du système sanguin, dénommé la cellule souche par Pappenheim.

A la même époque, l'hématologue Pappenheim généralise le concept de cellule souche aux cellules hématopoïétiques (Pappenheim, 1896). Son hypothèse est que le fait que les cellules d'un individu aient une origine commune (la cellule œuf) implique que les cellules myéloïdes et lymphoïdes soient issues d'un même lignage cellulaire, c'est-à-dire d'une même cellule souche hématopoïétique. Cette dernière sera entre autres mise en évidence par les travaux de James Till, Ernest McCulloch et leurs collaborateurs dans les années 1960.

Une atmosphère de guerre froide en pleine ère atomique pourrait être considérée comme l'un des éléments déclencheurs de l'intérêt porté sur les effets des rayons ionisants sur nos tissus. En partant du fait que la moelle osseuse est l'un des organes le plus affecté lors d'une irradiation à dose létale, l'idée fut de voir si une greffe de moelle provenant d'un individu sain sur un individu irradié pouvait supprimer les effets délétères observés. En plus de contrecarrer les effets létaux des rayons ionisants, cette transplantation mit en évidence la présence d'éléments dans la moelle osseuse capable de repeupler le système sanguin d'individus irradiés (Ford et al, 1956). L'analyse de nodules lymphatiques au niveau de la rate (Till & McCulloch, 1961) montrera également que la moelle osseuse est le siège de cellules multipotentes à l'origine des deux lignages : les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Cette découverte fait du système hématopoïétique le modèle historique de la recherche moderne sur les cellules souches.

II. Les cellules souches : de nos jours

De nos jours, les cellules souches sont définies d'après leurs capacités d'auto-renouvellement, c'est-à-dire le fait de maintenir un nombre de cellules souches défini dans le tissu, et de production de cellules différenciées. Elles sont également caractérisées par leur état de cellules non-différenciées.

L'identité ou type cellulaire, est déterminée par les gènes et protéines qu'une cellule exprime. Ils définissent ses fonctions physiologiques, morphologiques ou encore ses capacités cellulaires et moléculaires, à l'origine de son comportement au sein de son tissu de résidence. Une cellule est également définie par son devenir, c'est-à-dire son potentiel à se spécialiser vers un type cellulaire donné. Ainsi, l'identité d'une cellule non-différenciée ne présentera pas l'ensemble des fonctions, ou gènes exprimés qu'une cellule différenciée

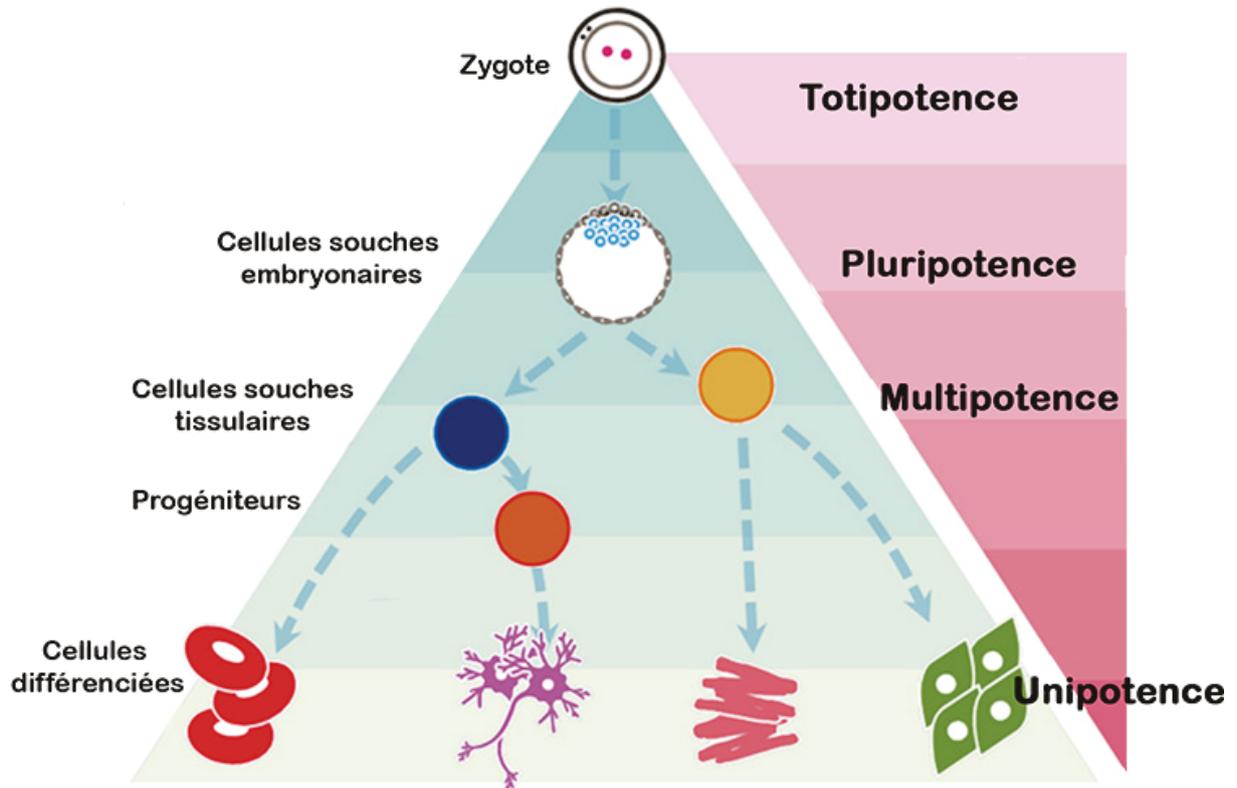


Figure 2. Un potentiel de différenciation hiérarchisé des cellules souches. Au cours du développement, l'augmentation de la diversité des types cellulaires, s'accompagne d'une restriction du potentiel de différenciation des cellules souches, pour se retrouver au stade adulte avec des cellules souches multipotentes et unipotentes à l'origine du maintien de nos tissus. (Adaptée de Sugawara et al. 2012)

pourrait avoir, mais aura la capacité de se spécialiser en un nombre plus ou moins varié de types cellulaires. Compte tenu de l'existence d'un degré de spécification des cellules, le concept de cellule souche peut également être perçu comme une notion relative, intégrée dans un système hiérarchisé à l'échelle du développement d'un individu incluant le stade adulte. Ainsi, chaque cellule souche peut être définie selon son degré de potentialité, c'est-à-dire sa capacité à produire un nombre plus ou moins restreint de types cellulaires (**fig.2**). »

On distingue différentes catégories de cellules souches. Les cellules souches totipotentes, comme par exemple la cellule œuf et les cellules blastomères¹, peuvent former l'ensemble des cellules d'un être-vivant dont les tissus extra-embryonnaires. Les cellules souches pluripotentes, comme les cellules souches embryonnaires sont capables de former les différents tissus d'un organisme, mais ne permettent pas de générer un individu entier. Enfin, les cellules souches multipotentes, qui ont un potentiel davantage restreint, peuvent produire qu'un nombre limité de types cellulaires issus d'une même origine embryonnaire. C'est le cas par exemple de la plupart des cellules souches adultes. Pour finir, les cellules unipotentes sont des cellules au potentiel réduit ne pouvant produire qu'un seul type cellulaire, comme par exemple les cellules satellites du muscle adulte à l'origine des myoblastes, précurseurs des fibres musculaires (**fig.2**).

Ainsi, à partir d'une seule et unique cellule, un organisme entier peut être généré par une succession de divisions et de cascades de spécifications. L'un des enjeux de la recherche actuelle sur les cellules souches est de comprendre quels programmes construisent et façonnent les individus de génération en génération. S'agissant des applications thérapeutiques, l'intérêt est de pouvoir remplacer des organes ou tissus défectueux par de nouveaux créés *in vitro* et compatibles avec l'individu greffé. L'un des meilleurs exemples de cet accomplissement est la greffe de peau des grands brûlés à partir d'épiderme cultivé *in vitro*. La reconstitution des structures endodermiques n'est pas encore maîtrisée. La production *in vitro* d'organoïdes (Lancaster & Knoblich, 2014) à partir de cellules pluripotentes ou de progéniteurs humains et murins, a permis de récapituler différentes structures de l'intestin (Sato et al, 2009; Spence et al, 2011), de la rétine (Eiraku et al, 2011; Nakano et al, 2012) ou plus récemment du cerveau (Lancaster et al, 2013) et du rein (Taguchi et al, 2014; Takasato et al, 2014; Xia et al, 2013). Cette avancée offre la perspective

¹ Un blastomère est une cellule qui dérive des premières divisions du zygote durant le développement embryonnaire.

d'une reconstitution d'organes plus complexes *in vitro* et un nouveau matériel pour l'étude pharmacologique de composés chimiques.

III. Les cellules souches adultes : une combinaison de mécanismes extrinsèques et intrinsèques dans la régulation de leur destin

Nos tissus et organes peuvent être endommagés au point que leur remplacement, au moyen de greffes par exemple, soit nécessaire. Cependant, tout au long de la vie d'un individu, ils sont également soumis à des contraintes et agressions extérieures quotidiennes. Celles-ci peuvent compromettre l'intégrité des tissus comme à l'issue d'une perte majeure de cellules, et donc affecter leurs fonctions physiologiques. Le maintien de cette intégrité tissulaire et le remplacement physiologique des cellules sont possibles grâce à la présence de cellules souches adultes. Ces cellules non-différenciées assurent le renouvellement constant des cellules différenciées, tout en maintenant un réservoir de cellules souches dans le tissu. Cet équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire définit ainsi l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire le maintien d'un état stable de la composition du tissu pour chaque type cellulaire. Une perturbation de ces fonctions peut avoir des conséquences délétères à l'origine de dégénérescences tissulaires ou du développement de certains cancers (Clevers, 2011; Jones & Rando, 2011). Un enjeu de la recherche sur les cellules souches est de comprendre comment les fonctions des cellules souches sont régulées au sein des tissus et de pouvoir ainsi les maîtriser dans des contextes pathologiques.

Au sein de leur tissu, les cellules souches sont finement régulées. Elles sont sensibles aux signaux de leur environnement dits « extrinsèques », c'est-à-dire les signaux et molécules extérieurs à la cellule (**fig. 3**). Les changements de ces signaux sont à l'origine de la modification des réseaux intracellulaires ou signaux « intrinsèques ». La coordination de ces événements permet l'entrée des cellules souches dans différentes voies décisionnelles, forgeant ainsi leur identité cellulaire.

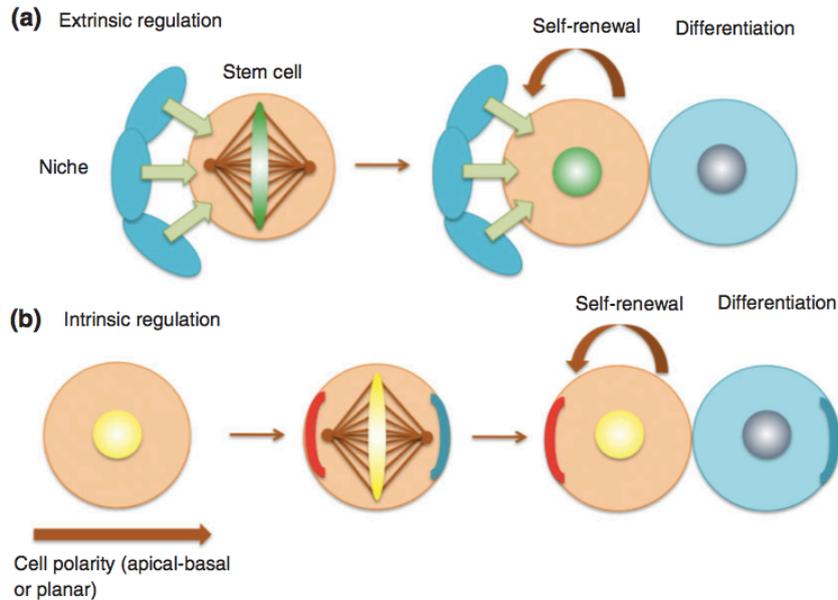


Figure 3 Schématisation des mécanismes du contrôle de la division asymétrique des cellules souches. (A) Le contrôle de la division asymétrique par des facteurs extrinsèques issus de la niche permet le maintien de l'identité souche de la cellule fille en contact avec la niche, alors que l'éloignement de la seconde cellule fille entraîne sa spécification. **(B)** Le mode de division asymétrique peut également être régulé par des déterminants intrinsèques. Leur répartition asymétrique au cours de la division détermine le destin des cellules filles avant la résolution de la division. (Yadlapalli & Yamashita, 2012)

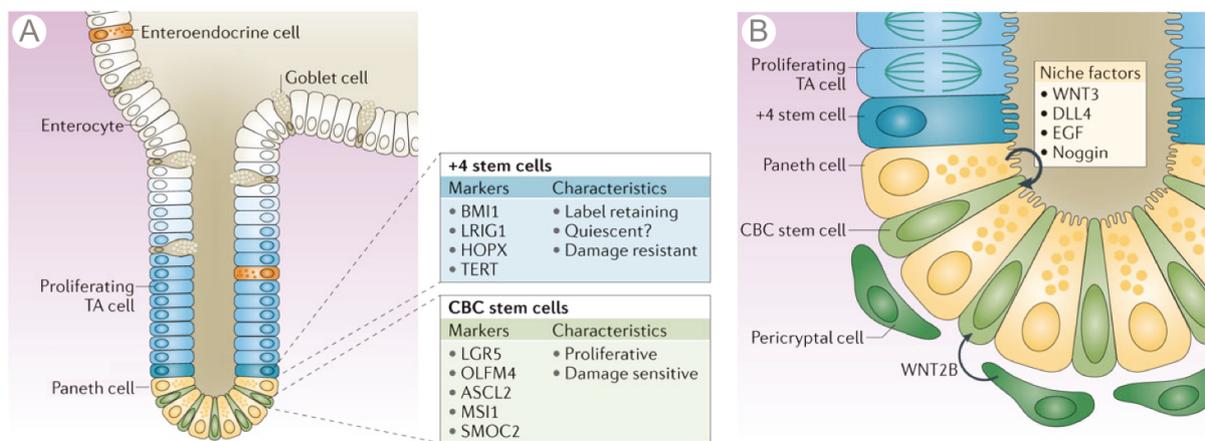
Le concept de niche

L'environnement des cellules souches est un élément crucial à leur maintien dans les tissus. Tout changement peut influencer leur destin (prolifération, quiescence, spécification,...). Le concept de niche est un exemple du control local de cet environnement. Il peut se définir comme un microenvironnement local (en opposition à une régulation globale au niveau tissulaire dit systémique) et par son rôle fonctionnel dans le maintien des cellules souches (**fig. 3A**) (pour revue, voir (Losick et al, 2011).

Les relations entre les cellules souches et leur niche peuvent se distinguer de différentes manières. Certaines cellules souches établissent un contact direct avec leur niche. C'est le cas par exemple des cellules souches germinales de drosophiles. D'autres tissus présentent des structures qui vont mettre en place un environnement signalétique de maintien de l'état souche des cellules qu'elles contiennent. Ce type de conformation se retrouve par exemple au niveau des cryptes de l'épithélium intestinal de mammifères. Bien qu'une interaction directe ou juxtacrine entre la cellule souche et ses cellules voisines soit un cas de figure répandue, la niche est définie par son rôle dans le maintien des cellules souches, et non comme simple interaction physique. Pourra ainsi être considéré comme une niche, tout groupement de cellules proximal ou distal défini, impliqué dans le maintien local de cellules souches. Cette capacité de contrôle à distance a notamment été bien décrite dans la régulation des cellules souches du follicule pileux.

Les cellules germinales de drosophile : le contrôle d'une division orientée

L'importance du microenvironnement dans le contrôle du devenir des cellules souches a notamment pu être mis en évidence grâce à l'étude des cellules souches germinales de drosophile (Kiger et al, 2001; Tran et al, 2000; Xie & Spradling, 1998; Xie & Spradling, 2000). Il a permis de valider le concept de niche (pour revue : Losick et al, 2011) proposé vingt ans plus tôt par R. Schofield (Schofield, 1978). Les cellules souches de la lignée germinale de drosophile produisent des gamètes au cours de la vie adulte. Elles sont en contact direct avec une structure physique de cellules somatiques nécessaires au maintien de leur état non-différencié. Cette interaction permet également la polarisation de ces cellules. Par exemple, une orientation du fuseau mitotique perpendiculaire à l'interface



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 4. Les cellules souches intestinales et leur niche chez les mammifères. (A) Localisation le long de la crypte de Lieberkühn et caractéristiques des cellules souches +4 et Lgr5+ (également appelée cellules souches CBC pour « Crypt basal cell »). **(B)** Composition de la niche intestinale. Les cellules de Paneth et les cellules stromales périphériques de la crypte (Pericryptal cell) fournissent les facteurs moléculaires de la niche, essentiels au maintien, à la survie et à la régulation de la prolifération des cellules souches intestinales. Schémas issus de (Barker, 2014)

niche-cellule souche entraîne l'exclusion ou l'éloignement de la niche de l'une des cellules filles (**fig. 3A**). Ceci conduit à une perte des signaux extrinsèques de maintenance fournis par le microenvironnement, et à une activation de signaux intrinsèques due à la perte de contact entre la cellule souche et son support par l'intermédiaire des molécules d'adhésion : les Cadhérines et les Intégrines (pour revue : (Yamashita, 2010)). Cela signe le début de son engagement sur la voie de la différenciation. Cette corrélation entre l'orientation du fuseau mitotique et l'issue de la division de la cellule souche a par exemple été décrite chez la drosophile lors de la division des cellules souches germinales (pour revue : (Yadlapalli & Yamashita, 2012)), et a également été observée lors de la division des cellules satellites du muscle chez la souris (Kuang et al, 2007) où une orientation du fuseau parallèle aux fibres musculaires est à l'origine d'une division symétrique : deux cellules filles au destin cellulaire identique.

L'identification d'une structure indispensable au maintien de l'identité souche n'est cependant pas restreinte à la lignée germinale de drosophile comme le montre la présence d'une niche germinale chez le nématode (Crittenden et al, 2006; Kimble & White, 1981), chez le poisson zèbre (Beer & Draper, 2013; Nobrega et al, 2010) ou au niveau des cellules souches germinales mâles chez les mammifères (Brinster & Zimmermann, 1994). On retrouve également la présence d'une niche pour certaines cellules souches somatiques.

La crypte intestinale : une concentration des signaux de maintenance de l'état « souche »

L'intestin grêle chez les mammifères est formé de deux unités structurales et fonctionnelles : les villosités d'une part, composées des cellules différenciées, dont les cellules Entérocytes, Entéroendocrines et les cellules caliciformes (« *Goblet cell* » en anglais), nécessaires à l'absorption des nutriments, la sécrétion d'hormones et de la muqueuse intestinale, et des cryptes de Lieberkühn d'autre part. Ces dernières sont le siège des cellules souches intestinales et de leurs progéniteurs à l'origine des cellules différenciées, mais également d'un second type de cellules sécrétrices, les cellules de Paneth (**fig. 4A**). Deux populations de cellules souches sont présentes : une population proposée comme étant quiescente, les cellules +4 (pour revue : (Potten et al, 1997)) et une seconde, les cellules Lgr5+ (Barker et al, 2008; Barker et al, 2007) proliférant de manière active à l'origine de la production continue de cellules différenciées.

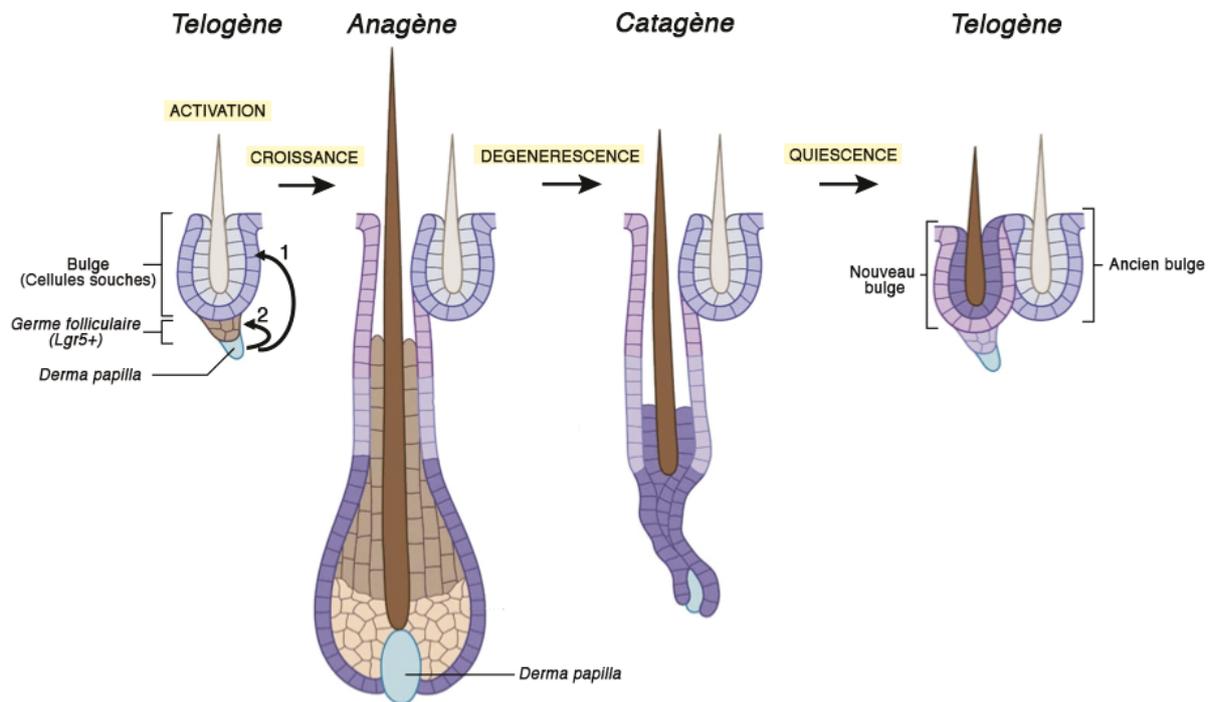


Figure 5. Les différentes phases du cycle de régénération du follicule pileux. La *Derma papilla* active les cellules souches localisées dans le « *bulge* » dans un premier temps (1), puis les cellules Lgr5+ du germe folliculaire (2). La partie la plus basale va se développer à travers le derme et permet de produire les cellules différenciées à l'origine du poil (Anagène). Le follicule entre ensuite dans une phase de dégénérescence (Catagène) qui met fin à sa croissance, réduisant le follicule pileux à une seule structure : le « *bulge* ». L'étape finale de ce cycle est une phase de quiescence (Telogène), faisant la transition avec le cycle suivant. En région basale du follicule pileux se trouve le « *derma papilla* ». (Adapté de Hsu et al, 2014)

De nombreux signaux nécessaires au maintien des cellules souches et régulant leur rythme de prolifération, comme les voies de signalisation Wnt, BMP et Notch, sont concentrés dans ce compartiment épithélial (pour revue : (Clevers, 2013; Montgomery & Breault, 2008) et (Barker, 2014)). Ils sont notamment produits par les cellules de Paneth et les cellules stromales périphériques de la crypte (**fig. 4B**). La nécessité fonctionnelle des cellules de Paneth en tant que constituant de la niche intestinale *in vivo*, testée notamment par ablation génétique, fait l'objet d'une controverse (Garabedian et al, 1997) Sato et al, 2011 ; (Durand et al, 2012; Geiser et al, 2012; Kim et al, 2012; Parry et al, 2013). Il est néanmoins acquis qu'elles sont suffisantes à la survie et croissance *ex vitro* de cellules souches Lgr5+ isolées et à la formation d'organoïdes (Yilmaz et al, 2012). Ainsi, bien que les cellules de Paneth soient importantes pour le maintien des cellules souches Lgr5+, elles ne semblent pas être les constituants exclusifs de la niche intestinale. Ceci pourrait ainsi expliquer les divergences de résultats, s'ajoutant à cela la variabilité des conditions expérimentales employées (notamment avec des différences dans les promoteurs et mutants utilisés).

La niche du follicule pileux : Un contrôle à distance des cellules souches

Le follicule pileux suit un cycle de régénération en trois phases (**fig.5**). Une première étape de croissance (Anagène) où la partie la plus basale se développe à travers le derme et permet de produire les cellules différenciées à l'origine du poil (Lee & Tumber, 2012 ; Sennett & Rendl, 2012). Le follicule entre ensuite dans une phase de dégénérescence (Catagène) qui met fin à sa croissance, réduisant le follicule pileux à une seule structure : le « *bulge* ». L'étape finale de ce cycle est une phase de quiescence (Telogène), faisant la transition avec le cycle suivant. En région basale du follicule pileux se trouve le « *derma papilla* ». Cette structure mésenchymateuse est nécessaire et suffisante à l'induction de la croissance du poil et est considérée comme la niche des cellules souches folliculaires. Au cours de la phase Anagène, le « *derma papilla* » permet la stimulation distale de la prolifération des cellules souches folliculaires localisées au niveau du « *bulge* » (**fig.5**). Il active également la prolifération d'une seconde population de cellules positives pour le marqueur Lgr5, localisées dans le germe folliculaire, une région en contact directe avec la niche. Ce type de régulation à distance est également bien décrit pour le système

hématopoïétique de la larve de drosophile. Située en région postérieure de la glande lymphatique, la niche hématopoïétique n'est pas en contact directe avec les progéniteurs hématopoïétiques. Elle est néanmoins nécessaire à leur maintien *via* la sécrétion et diffusion de signaux solubles.

Une localisation asymétrique de facteurs moléculaires

D'autres mécanismes comme la ségrégation asymétrique de facteurs décisionnels pendant la mitose peuvent également influencer le destin des deux cellules filles (**fig. 3B**). C'est le cas par exemple de la localisation asymétrique des facteurs tels que la protéine Numb ou le facteur de transcription Prospero dans la future cellule fille destinée à se différencier pendant la division des neuroblastes chez la drosophile (Hirata et al, 1995; Knoblich et al, 1995; Rhyu et al, 1994; Spana & Doe, 1995) et chez les mammifères (Zhong et al, 1996) (pour revue : (Kang & Reichert, 2015)). Ce type de localisation asymétrique est orchestré par les protéines du complexe Par (pour « *Partitioning defect* ») (Betschinger et al, 2003; Bultje et al, 2009; Durgan et al, 2011) (pour revue : (Vorhagen & Niessen, 2014)), initialement identifiées lors d'un crible génétique chez *Caenorhabditis elegans* (Kemphues et al, 1988). L'ovocyte de nématode contient une distribution uniforme de granules cytoplasmiques appelées P-granules (pour « *Posterior granules* »). Après fertilisation, ces organelles sont relocalisées au pôle postérieur du zygote, pour être par la suite entièrement ségrégées après division dans la cellule postérieure de l'embryon au stade deux cellules. Une perte de fonction des gènes codant les composants du complexe Par affecte cette localisation postérieure, maintenant ainsi une répartition symétrique des P-granules après fertilisation. Ce phénotype est également associé à un positionnement anormal du fuseau mitotique au cours des premières divisions embryonnaires (Kemphues et al, 1988). Ces études du complexe Par chez la drosophile et le nématode ont précisé le rôle de ce complexe dans la régulation de la polarité cellulaire et de la division asymétrique. L'élucidation de ces mécanismes a permis par la suite une transposition de ces fonctions dans les modèles murins, où l'étude de ce complexe est rendue difficile du fait d'une redondance fonctionnelle des gènes *par* (Niessen et al, 2012).

Une maintenance de l'intégrité « souche » ?

Le principe d'auto-renouvellement des cellules souches pose une énigme cruciale : le maintien de l'intégrité des fonctionnalités cellulaires et nucléaires de la cellule souche au cours des divisions. Ces mécanismes de ségrégation asymétrique pourraient être interprétés comme étant des dispositifs de protection de la cellule souche au cours des divisions.

La réplication est une étape incontournable du cycle cellulaire. Elle en est néanmoins une phase qui permet l'accumulation de lésions dans le brin d'ADN néo-synthétisé, et donc l'installation de mutations potentielles dans le génome de la cellule souche fille. La théorie du brin immortelle (pour revue : (Yennek & Tajbakhsh, 2013) et (Yadlapalli & Yamashita, 2013)) propose une rétention du brin « matrice » au niveau de la cellule souche. Elle découle de l'observation d'une ségrégation non-aléatoire des brins d'ADN pendant la mitose dans certains types de cellules souches comme les cellules satellites du muscle (Conboy et al, 2007; Shinin et al, 2006), les cellules souches des glandes mammaires (Smith, 2005) et du système nerveux (Fei & Huttner, 2009; Karpowicz et al, 2005) de souris, et les cellules souches germinales de drosophile femelle (Karpowicz et al, 2009). Ceci serait un moyen d'éviter l'acquisition de ces mutations réplicationnelles en maintenant le brin « matrice » dans la cellule souche.

La ségrégation non-aléatoire des chromosomes n'est cependant pas un fait universel et est source de controverse dans certains systèmes comme les cellules souches intestinales de mammifères (Kiel et al, 2007; Schepers et al, 2011; Sotiropoulou et al, 2008; Steinhauser et al, 2012; Waghmare et al, 2008; Yadlapalli et al, 2011). Curieusement, bien que les brins d'ADN des cellules souches germinales de drosophiles mâles ségrégent de manière aléatoire, certains variants d'histones nouvellement synthétisés semblent être préférentiellement distribués dans les progéniteurs (Tran et al, 2012). Cette nouvelle découverte dépeint ainsi un tableau plus complexe du maintien de la « mémoire souche » pendant et après division.

Chapitre 2 | L'intestin de *Drosophila melanogaster*, un modèle d'étude des cellules souches adultes *in vivo*

I. La caractérisation des cellules souches intestinales : la naissance d'un modèle

Gut feeling: « *In vertebrates, the cells of the intestine are continually replenished by multipotent stem cells. The discovery of a similar regime in the fruit fly *Drosophila* has come as a surprise, but a welcome one. With such a well-developed genetic model to handle, it should be possible to make great strides in the study of normal and abnormal intestinal function.* » Résumé de l'éditeur | Nature vol 439, 26 Janvier 2006.

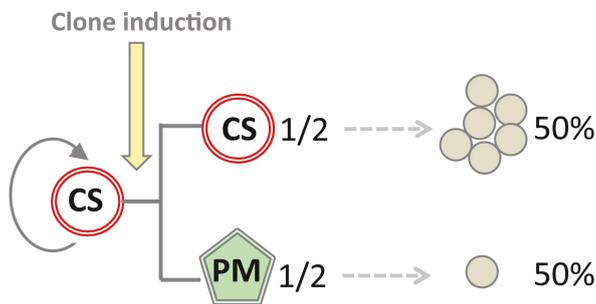
L'année 2006 signe les premiers pas d'un modèle d'étude génétique des cellules souches adultes : l'intestin de *Drosophila melanogaster*, allant à l'encontre de l'idée reçue qu'un tissu somatique d'un individu à courte durée de vie (d'une moyenne de 30 jours pour la drosophile) devait être dépourvu de cellules souches. Deux études publiées par *Micchelli and Perrimon*, et *Ohlstein and Spradling* dans Nature sur l'identification des cellules souches intestinales adultes de drosophile, illustrent un exemple de procédé de la caractérisation de la présence de cellules aux propriétés « souches », au sein d'un tissu adulte. Pour cela, ils ont mis en évidence les fonctions d'auto-renouvellement et la de multipotence de ces cellules : la définition même des cellules souches. Ils ont qui plus est recherché des marqueurs spécifiques de ces dernières, offrant ainsi un outil précieux pour leurs études ultérieures.

L'auto-renouvellement et la multipotence

La démonstration de la propriété d'auto-renouvellement d'un type cellulaire se traduit par la mise en évidence de cellules capables de proliférer et de produire des cellules différenciées, tout en se maintenant dans le tissu au fil des divisions.

Une stratégie est d'identifier des cellules au cours de leur cycle cellulaire, comme par exemple pendant la mitose. Pendant cette phase, l'Histone 3 est entre autres phosphorylée sur le résidu Sérine en position 10 (pH3). Ce marqueur mitotique a ainsi été un premier

Progéniteur post-mitotique



Divisions transitoires

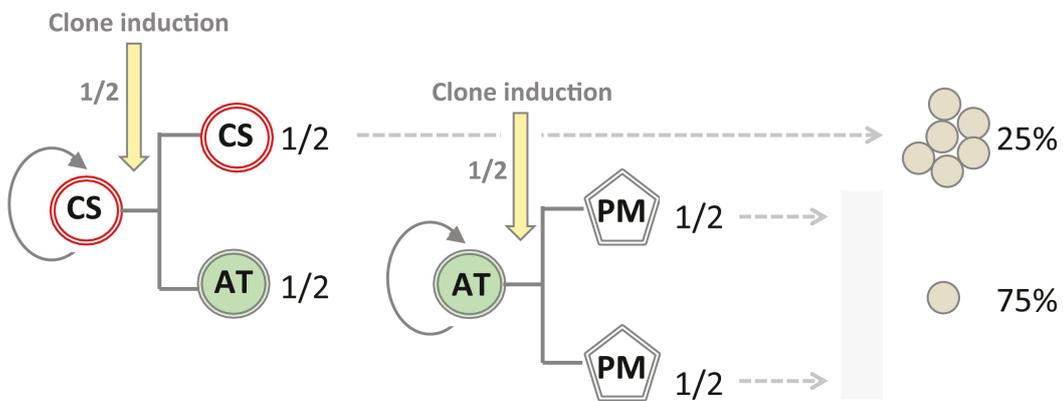


Figure 6. Modèles de répartition des clones transitoires. La génération de recombinaison mitotiques, et donc de clones ne peut se faire que dans des cellules en cours de mitose. Ainsi, dans un tissu tel que l'intestin de drosophile où seules les cellules souches (CS) se divisent (panel supérieur), deux types de clones issus de la division d'une cellule souche sont attendus à fréquence équivalente : des clones multicellulaires (50%) d'une part si la cellule fille, future cellule souche est marquée, et des clones unicellulaires (50%) issus de la cellule fille devenue progéniteur post-mitotique (PM). Dans un tissu présentant des cellules souches et des progéniteurs capables d'une division terminale supplémentaire (amplification transitoire [AT]) à l'origine de la production de deux cellules post-mitotiques (panel inférieur), les recombinaisons mitotiques peuvent être induites lors de deux évènements distincts : pendant la division de la cellule souche, et pendant la division du progéniteur mitotique. La proportion de clones unicellulaires attendue représenterait alors 3/4 de l'ensemble des clones générés dans le tissu (Ohlstein & Spradling, 2006).

indice de la présence de cellules en cours de prolifération dans l'intestin (Micchelli & Perrimon, 2006). En parallèle, l'analyse du lignage cellulaire (ou analyse clonale) par l'induction de clones mitotiques² a permis de montrer *a posteriori* que ces cellules en division pouvaient d'une part se maintenir dans l'épithélium intestinal, c'est-à-dire de produire de nouvelles cellules souches, et d'autre part générer les différentes cellules différenciées du tissu, montrant ainsi la présence de cellules multipotentes (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). L'une des limites de ce système d'analyse clonale est qu'il ne marque que les cellules en division. Il n'est ainsi pas possible d'exclure l'existence d'un type de cellules souches quiescentes. Celles-ci sont suggérées par la présence de clones à une cellule exprimant un marqueur de cellule souche : signe d'un potentiel retour à un état de quiescence (de Navascues et al, 2012).

Par des techniques similaires, des cellules souches ont été mises en évidence dans les différents tissus de l'appareil digestif de drosophile (Fox & Spradling, 2009; Singh et al, 2007; Singh et al, 2011; Takashima et al, 2008). Nous nous focaliserons plus spécifiquement sur les cellules de l'intestin moyen.

Une origine commune pour les cellules différenciées de l'intestin de drosophile

L'analyse du lignage cellulaire de l'intestin de drosophile a permis de montrer que les cellules différenciées étaient issues d'une même origine cellulaire. Ces cellules sont au nombre de deux, et assurent les différentes fonctions physiologiques du tissu intestinal de drosophile. On distingue les cellules Entérocytes (EC), des cellules absorbantes polyploïdes caractérisées par l'expression du facteur de transcription Pdm1 (homologue de Oct1 chez les mammifères)(Lee et al, 2009) et les cellules Entéroendocrines (EE), des cellules sécrétrices caractérisées par l'expression du facteur de transcription Prospero (Pros) (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006), de la protéine Bruchpilot (Brp) et de l'enzyme Peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (Phm) (Beehler-Evans & Micchelli, 2015). Les cellules Entéroendocrines peuvent être subdivisées en quatre sous-classes marquées par l'expression des neuropeptides de types Allatostatine (Ast), Tachykinine (Tk) et des

² Un clone fait référence à l'ensemble des cellules issues d'une même cellule souche.

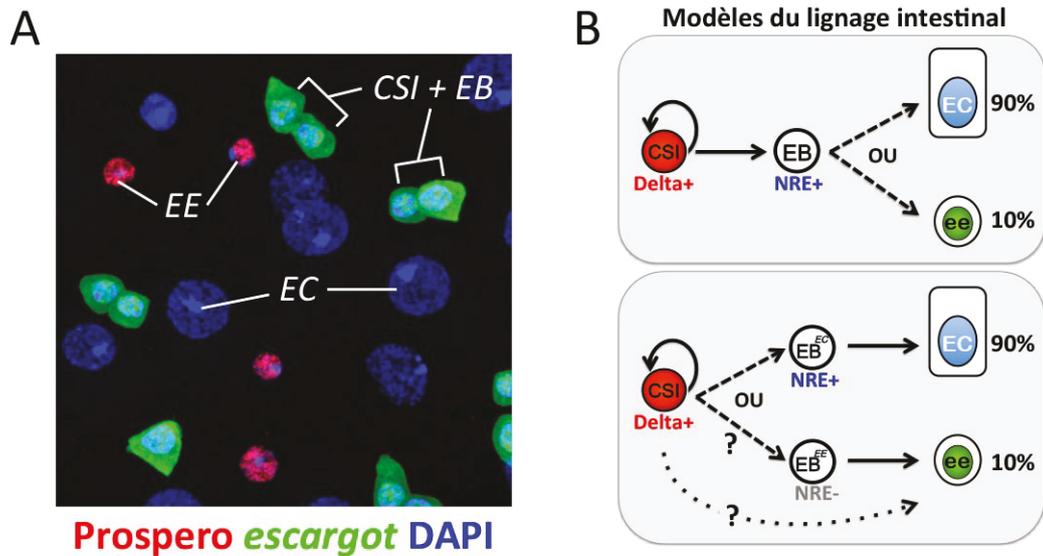


Figure 7. Le lignage intestinal de drosophile. (A) Photo des cellules de l'épithélium intestinal de drosophile (photo de J. Sallé). L'intestin de drosophile est constitué de deux types cellulaires différenciés : les cellules Entéroendocrines (EE) qui sont des cellules sécrétrices caractérisées par l'expression du facteur de transcription Prospéro (Rouge) et les cellules Entérocytes (Bleu) qui sont des cellules absorbantes polyploïdes caractérisées par un large noyau. Les cellules souches intestinales (CSI) et les progéniteurs post-mitotiques, les Entéroblastes (EB) sont tous deux caractérisés par l'expression du gène *escargot* (Vert). (B) L'évolution du modèle du lignage intestinal. Les observations de (Olhstein et al. 2006 et Micchelli et al. 2006) ont conduit au lignage suivant (panel supérieur) : les cellules souches intestinales (CSI), caractérisée par l'expression du marqueur Delta, sont les seules cellules mitotiques du tissu. Après leur division, l'une des cellules filles va être maintenue à l'état de cellule souche alors que la seconde cellule fille va se spécifier progéniteur post-mitotique, l'Entéroblaste (EB). La production de ce dernier est dépendante de l'activation de la voie Notch (NRE+), et va directement se différencier soit en cellule Entéroendocrine (EE), soit en cellules Entéroblaste (EC). L'observation d'une production des cellules EE indépendante de l'activation de la voie Notch (Biteau & Jasper, 2014; Zeng & Hou, 2015) a conduit à une nouvelle définition du lignage intestinal (panel inférieur). A l'issue de la division de la cellule souche, l'une des cellules filles sera maintenue à l'état de cellule souche. L'activation de la voie Notch dans la seconde cellule fille spécifie cette dernière en progéniteur post-mitotique des EC (EB^{EC}). Il n'est cependant pas clair si les cellules EE sont issues directement de la spécification des cellules souches, ou si ces dernières produisent un progéniteur intermédiaire (EB^{EE}) à l'origine des EE.

Hormones Diurétiques (DH) (Ohlstein & Spradling, 2006) (Beehler-Evans & Micchelli, 2015) : les classes I (AstB+, AstC+) et II (AstC+) présentes au niveau de la première moitié antérieure de l'intestin postérieur moyen, les classes III (AstA+, AstC+) et IV (Tk+, DH+) localisées dans la seconde moitié, montrant ainsi un second degré de spécificité de ces cellules Entéroendocrines. La pertinence fonctionnelle de ces deux types de cellules Entéroendocrines n'a cependant pas encore été mise à jour.

L'Entéroblaste : un progéniteur post-mitotique

Dans de nombreux systèmes, les cellules souches sont à l'origine de progéniteurs au potentiel réduit, dotés de capacités prolifératives. Dans ce cas de figure, plusieurs cellules (les cellules souches et les progéniteurs) participent à la croissance clonale. Au sein de l'intestin de drosophile, une seule cellule se divise (la cellule souche) et participe à la production des cellules intestinales (Ohlstein & Spradling, 2006; Ohlstein & Spradling, 2007). En effet, la présence de clones composés d'une seule cellule dans 49 à 63% des cas (Ohlstein & Spradling, 2006), et non de 75% comme l'impliquerait la présence de progéniteurs capables de se diviser transitoirement, suggère l'existence d'un progéniteur post-mitotique transitoire (**fig. 6**). Cette idée est également renforcée par la corrélation entre la présence d'une seule cellule exprimant les marqueurs des cellules souches dans chaque clone et la restriction du marqueur de la mitose pH3 à ces cellules souches (Ohlstein & Spradling, 2007). Ce progéniteur post-mitotique a été nommé « Entéroblaste » (EB) en référence aux Cystoblastes et Gonialblastés, progéniteurs des lignées germinales femelles et mâles de drosophile au potentiel restreint, capables de produire des cellules différenciées (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006).

L'identification de marqueurs moléculaires

L'identification de marqueurs de l'identité cellulaire (souche et différenciée) est un outil crucial pour une étude approfondie du lignage des cellules souches et de l'homéostasie tissulaire en général. Les cellules souches et les Entéroblastés sont caractérisés par l'expression du marqueur *escargot* (*esg*) (Micchelli & Perrimon, 2006) (**fig. 7A**). Ces deux types cellulaires sont majoritairement organisés en paires le long de l'épithélium (Micchelli & Perrimon, 2006 ; de Navascues et al, 2012) et présentent une forte expression de la

protéine Armadillo (ou β -Catenine) (Ohlstein & Spradling, 2006), une molécule impliquée dans l'adhésion cellulaire et dans la transduction de la voie de signalisation Wingless/Wnt. 50% des cellules *esg+* activent la voie de signalisation Notch (Micchelli & Perrimon, 2006). La seconde moitié des cellules, pour laquelle la voie Notch est inactive, est capable de se diviser (Micchelli & Perrimon, 2006) et est associée à l'expression du ligand transmembranaire du récepteur Notch : Delta (Ohlstein & Spradling, 2007). Par extrapolation, un marquage positif pour Delta, permet de repérer les cellules souches de l'intestin adulte de drosophile alors que l'activation de la voie Notch est un marqueur des Entéroblastes.

Les premières observations en 2006 de *Micchelli and Perrimon*, et *Ohlstein and Spradling* ont défini les grandes lignes du modèle de lignage intestinal de drosophile que nous connaissons aujourd'hui. Après division, la cellule souche donne naissance dans la majorité des cas à une nouvelle cellule souche et à un Entéroblaste. Ce dernier poursuit sa différenciation pour former soit une cellule Entérocyte, soit une cellule Entéroendocrine (**fig. 7B**).

II. La voie Notch et la régulation du lignage intestinal de la drosophile

Dès la mise en évidence des cellules souches intestinales de drosophile, l'observation d'une expression exclusive du ligand Delta au niveau des cellules souches intestinales (Ohlstein & Spradling, 2007) et de l'activation de la voie Notch dans les progéniteurs (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2007) a été le premier signe d'une implication de cette voie dans la régulation de ce lignage. Plusieurs questions se sont alors posées. Quel est le rôle de la voie Notch dans la régulation des cellules souches intestinales et leur lignage cellulaire ? Comment expliquer cette expression et activation différentielle de la voie Notch et de son ligand Delta ?

Un signal primaire de spécification

La voie Notch est essentielle à la spécification du destin cellulaire au sein du lignage intestinal de drosophile. Son rôle dans la régulation de ce lignage a pu être évalué en bloquant son activité ou en l'activant de manière ectopique. En absence d'activation de cette voie, des cellules souches et des cellules Entéroendocrines s'accumulent en

corpuscules compactes ou « masses tumorales », au détriment des Entérocytes qui sont quasiment absents (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2007). Inversement, une activation constitutive de la voie par expression ectopique de la forme active du récepteur Notch (NICD), entraîne une perte des cellules souches par leur engagement dans la voie de différenciation des Entérocytes (Ohlstein & Spradling, 2007). La voie Notch a ainsi un double rôle dans la régulation du lignage intestinal : un premier dans le choix entre l'auto-renouvellement et la spécification des cellules souches intestinales, et un second dans le choix entre les destins Entéroendocrine et Entérocyte lors de la différenciation terminale (**fig.7B**).

Des variations dans le niveau d'activation de la voie Notch

Cette double fonctionnalité de la voie Notch au cours du lignage intestinal peut être découplée par une modulation du niveau d'activation de la voie. En effet, l'efficacité d'activation du récepteur Notch, et donc potentiellement de l'activation de ces gènes cibles peut être modulée par les modifications et régulations post-traductionnelles (glycosylation, ubiquitination, endocytose ou encore dégradation) que peuvent subir le récepteur et son ligand Delta (Fortini, 2009; Fortini & Bilder, 2009 ; Takeuchi & Haltiwanger, 2014).

Dans l'intestin de drosophile, une diminution de l'efficacité d'activation suite à une perturbation de la voie de biosynthèse du GDP-fucose ou de l'activité de la glycosyltransferase Rumi³ entraînent une accumulation de cellules souches sans perturbation de la différenciation terminale, c'est-à-dire sans que la production de cellules Entérocytes et Entéroendocrines ne soit affectée (Perdigoto et al, 2011). Ainsi, l'intensité d'activation de la voie Notch semble avoir un impact sur l'issue de la division de la cellule souche. Ces résultats suggèrent que la spécification des cellules souches intestinales nécessite un certain niveau d'activation de la voie Notch, supérieur à celui permettant la différenciation de l'Entéroblaste en cellule Entérocyte.

Bien que l'implication de la voie Notch dans l'établissement d'un destin neurogénique soit conservée (Crosnier et al, 2005; Kim & Shivdasani, 2011; Stanger et al, 2005; van Es et al, 2005), son rôle dans la sortie du cycle cellulaire des cellules souches

³ La glycosyltransferase Rumi est impliquée dans la glycosylation du domaine extracellulaire du récepteur Notch.

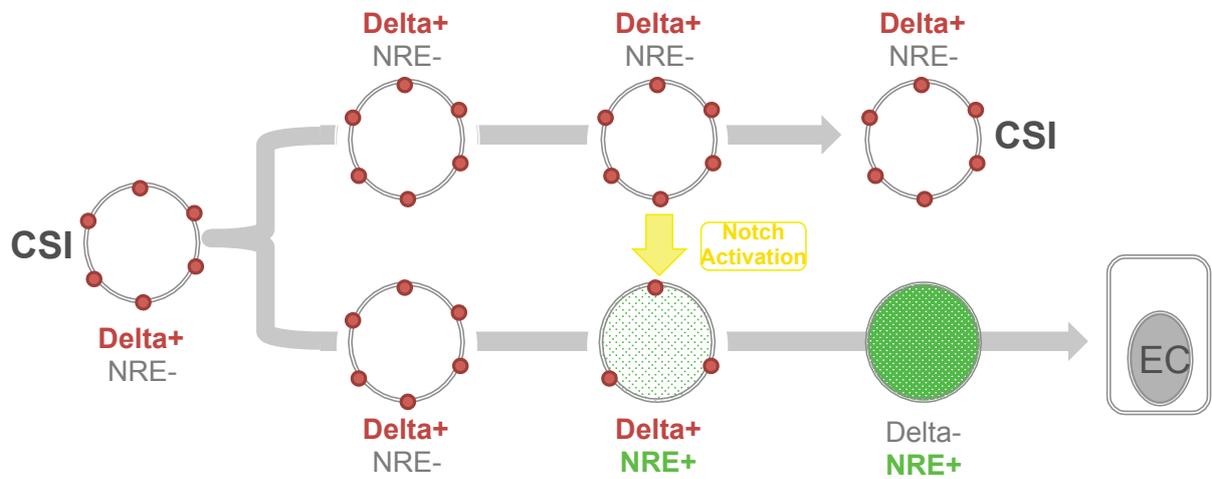


Figure 8. Représentation d'une division asymétrique à l'origine de la production d'un Entérocyte. Après division de la cellule souche (CSI), le ligand Delta est présent à la membrane des deux cellules filles (Delta+). La spécification de l'une des cellules filles en progéniteur post-mitotique (l'Entéroblaste) est engagée par l'activation de la voie Notch (NRE+) et de la répression de *Delta* (Delta-) dans celle-ci. Ce progéniteur ainsi généré (Delta- NRE+) continue sa différenciation en Entérocyte (EC). En parallèle, la voie Notch est maintenue réprimée dans la seconde cellule fille, la future cellule souche.

intestinales de drosophile, à l'origine de leur perte au sein du tissu, peut paraître surprenant. En effet, l'activation de cette voie de signalisation est par exemple associée au maintien des cellules souches et à la promotion de la prolifération dans l'intestin de mammifère et chez le poisson-zèbre (Carulli et al, 2015; Fre et al, 2005 ; Yang et al, 2009). Cependant, cette double fonction de la voie Notch dans la promotion du processus de spécification des cellules souches et dans la détermination du destin cellulaire n'est pas restreinte au lignage intestinal de drosophile adulte. En effet, au cours du développement pancréatique du poisson-zèbre, une inhibition minimale de la voie Notch est associée à une stimulation de la prolifération des progéniteurs endocriniens, alors qu'une forte inhibition de la voie associe à ce phénotype une stimulation de la production de cellules endocrines (Ninov et al, 2012). L'activation de la voie Notch est également associée à la spécification des cellules souches dans certains tissus adultes mammifères comme l'épiderme inter-folliculaire (Blanpain et al., 2006), la glande mammaire (Bouras et al., 2008), ou l'épithélium pulmonaire (Rock et al, 2011).

Une activation et une expression unilatérale

Dans l'intestin de drosophile, immédiatement après la division de la cellule souche, le récepteur Notch et son ligand Delta sont présents dans les deux cellules filles. La voie Notch ne sera cependant activée que dans une seule des deux cellules qui deviendra alors un Entéroblaste destiné à produire un Entérocyte. Cette activation est dépendante du maintien de l'expression du ligand Delta dans l'autre cellule fille (la nouvelle cellule souche) (**fig. 8**). On ne sait toutefois pas si la restriction de l'expression de la protéine Delta à la nouvelle cellule souche se fait avant, pendant ou après l'activation de la voie Notch (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2007). Un potentiel mécanisme à l'origine de cette activation unilatérale de la voie Notch découle de l'observation d'une répartition asymétrique de vésicules endosomales marquées par la molécule de surface Sara (« *Smad Anchor for Receptor Activation* »), contenant le récepteur Notch internalisé colocalisant avec le ligand Delta. Cet enrichissement d'endosomes Sara+ corrèle avec la future cellule entéroblaste. Une hypothèse serait que cette accumulation d'endosomes participe à l'augmentation de récepteurs Notch dans l'une des deux cellules filles et favorise ainsi

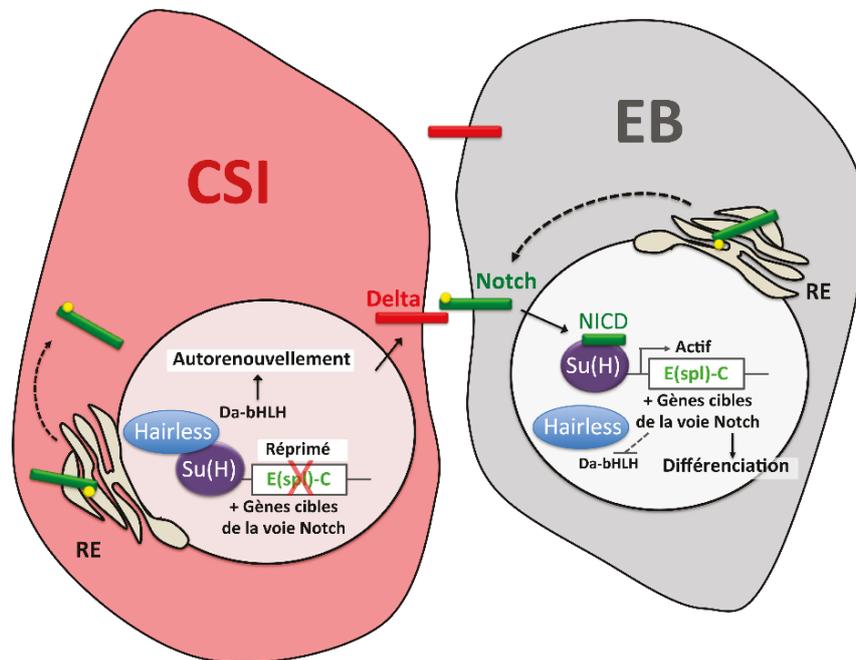


Figure 9. Modèle de régulation de la voie Notch dans le lignage intestinal En l'absence d'activation de la voie Notch, Hairless permettrait le maintien des cellules souches (CSI) en réprimant l'expression des gènes cibles de la voie. L'activité du facteur de transcription Daughterless (Da) serait ainsi maintenue entraînant le renouvellement des CSI et le maintien de l'expression de Delta. L'activation de la voie Notch par le ligand Delta dans la cellule voisine entraîne le clivage du récepteur Notch et la translocation de son domaine intracellulaire (NICD) dans le noyau. Le complexe NICD/suppressor of hairless (Su[H]) active la transcription des gènes cibles de la voie Notch, parmi lesquels les gènes codant pour les membres du complexe Enhancer of Split (E[spl]-C). Le complexe E(spl)-C aurait comme fonction d'inhiber l'activité de Da, permettant ainsi la différenciation de la cellule en Entéroblaste (EB). L'activité de la voie Notch est modulée par des modifications post-traductionnelles du récepteur Notch (fucosylation, glycosylation, en jaune). Aucune restriction de ces modifications aux EB n'a été rapportée jusqu'ici. RE : réticulum endoplasmique.

l'activation de la voie dans cette cellule (Montagne & Gonzalez-Gaitan, 2014). Cette activation unilatérale de la voie Notch est importante pour l'établissement du caractère asymétrique de la division. D'autres facteurs, comme les protéines du complexe Par semblent également être localisés de manière asymétrique au cours des différentes phases de la division (Goulas et al, 2012). La question de la ségrégation asymétrique de facteurs décisionnels au cours de la division des cellules souches est ainsi ouverte.

L'absence d'activation de la voie Notch spécifiquement dans une seule des deux cellules filles est importante afin de maintenir les cellules souches dans leur état non différencié. Un des mécanismes qui restreint l'activité de cette voie dans les cellules souches repose sur la répression par le complexe Hairless/Su(H), de l'expression des gènes cibles de Notch (dont les membres du complexe Enhancer of split [E(spl)-C] (**fig.9**) (Bardin et al, 2010). Dans les Entéroblastes, l'interaction du récepteur Notch avec son ligand Delta entraîne le clivage de Notch, suivi de la translocation de son domaine intracellulaire NICD (« *Notch intracellular domain* ») dans le noyau. Cette version tronquée représente la forme active du récepteur. Ce dernier se lie à Su(H) à la place de Hairless, et induit la transcription des gènes cibles de la voie Notch, dont E(spl)-C (Bray, 2006; Kopan & Ilagan, 2009). Le rôle des protéines E(spl)-C serait d'inhiber l'activité du facteur de transcription Daughterless (Kageyama et al, 2007), lui-même nécessaire au renouvellement des cellules souches, ce qui permettrait l'entrée de la cellule souche dans la voie de différenciation. Ainsi, une perte de fonction de E(spl)-C induit la persistance de l'expression de Delta et l'accumulation de cellules ayant les caractéristiques des cellules souches (Bardin et al, 2010). À l'inverse, Hairless jouerait un rôle de senseur afin de bloquer la transcription basale des gènes cibles de la voie Notch dans la cellule souche, permettant ainsi de maintenir son identité (Bardin et al, 2010). Ce répresseur est également connu pour son rôle dans le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine (Goodfellow et al, 2007), un processus important pour le maintien de l'homéostasie de l'intestin. En effet, le gène *scrawny*, codant une désubiquitinase de l'histone H2B, serait nécessaire à la répression de l'expression des gènes cibles de la voie Notch et le maintien des cellules souches intestinales au cours du temps (Buszczak et al, 2009).

Une redéfinition du lignage intestinal

En plus d'apporter des précisions sur l'implication de la voie Notch dans ce lignage cellulaire, ces études mettent également en évidence des zones d'ombres, notamment au sujet de la génération du lignage entéroendocrinien. En effet, bien que les cellules différenciées soient issues d'une origine commune, la question se pose quant à l'existence d'un progéniteur direct commun. En effet, l'accumulation de cellules Entéroendocrines observée en absence d'activation de la voie Notch suggère que cette activation n'est pas essentielle à la production des cellules Entéroendocrines. Ceci est corroboré par le fait que ces cellules ne proviennent pas de cellules ayant activées le rapporteur de l'activation de la voie Notch (Biteau & Jasper, 2014 ; Zeng & Hou, 2015) (*J. Sallé & A. Bardin*— résultats non publiés).

Différents cas de figures peuvent ainsi être envisagés. Une hypothèse serait que les cellules Entéroendocrines proviennent directement des cellules souches. En d'autres termes, il n'y aurait pas d'intermédiaire cellulaire et la décision de former une cellule Entéroendocrine serait faite au sein de la cellule souche, avant ou pendant la division. Une seconde possibilité serait que les cellules Entéroendocrines proviennent d'un progéniteur post-mitotique (dont le marqueur est à ce jour inconnu), qui ne nécessite pas l'activation de la voie Notch pour être généré (**fig. 7B**).

La voie des JAK (« *Janus kinase* »)/ STAT (« *signal transducer and activator of transcription* ») est nécessaire à la différenciation terminale en Entéroendocrine et en Entérocyte (Beebe et al, 2010; Buchon et al, 2009c; Jiang et al, 2009). En effet, son inhibition est d'une part à l'origine d'une accumulation de cellules non différenciées, mais supprime également l'accumulation de cellules Entéroendocrines en absence d'activation de la voie Notch, ainsi que la production de cellules Entérocytes lors d'une sur-activation de la voie Notch.

Un certain nombre de points restent à éclaircir concernant le rôle de Notch dans le lignage intestinal. Tout d'abord, les mécanismes à l'origine de l'activation asymétrique de la voie Notch dans une seule des deux cellules filles sont mal compris. Il a également été proposé que les cellules souches se divisent de manière symétrique (de Navascues et al, 2012; McLeod et al, 2010; O'Brien et al, 2011). Les deux nouvelles cellules souches produites n'activeraient pas la voie Notch. Les mécanismes de répression de la voie Notch dans le cas de ces divisions symétriques restent inconnus.

III. Les cellules souches dans leur contexte tissulaire et environnemental.

Du fait de sa constante exposition à un nombre important de microorganismes, l'intestin de drosophile est l'un des modèles phares de l'étude des interactions hôtes-pathogènes (Lemaitre & Hoffmann, 2007). La mise en évidence des cellules souches intestinales a permis d'associer à cette réponse systémique, des mécanismes de la réparation tissulaire, et ainsi de mettre en évidence les réponses tissulaires mises en place lors d'une infection, et plus généralement en réponse à un stress causant un dégât important dans l'épithélium comme une mort cellulaire massive. En d'autres termes, cela a ouvert un champ d'investigation qui vise à comprendre comment les cellules souches intestinales sont sollicitées pour assurer le maintien de l'intégrité tissulaire.

L'appareil digestif de drosophile, une organisation simple mais structurée

L'appareil digestif de drosophile peut être divisé en trois parties distinctes le long de son axe antéro-postérieur : l'intestin antérieur (« *Foregut* »), moyen (« *Midgut* ») et postérieur (« *Hindgut* ») (Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013) (**fig.10**). Connecté en son extrémité antérieure à la cavité buccale (ou *proboscis*) et aux glandes salivaires, l'intestin antérieur est composé du Jabot, lieu de stockage des aliments ingérés, et de l'Œsophage (ou *proventriculus*) dont la fonction peut être assimilée à celle de l'estomac chez les mammifères. L'intestin postérieur est relié au *rectum* : lieu de sécrétion des aliments non assimilés par l'organisme, et aux tubes de Malpighi. Ces derniers ont une fonction importante dans le maintien de l'homéostasie ionique des fluides circulatoires internes de l'individu (hémolymphe), et peuvent être comparés au système rénal des mammifères.

L'intestin moyen que nous appellerons par la suite « intestin » pour plus de simplicité, est l'équivalent de l'intestin grêle chez les mammifères. Comme son nom l'indique, il sépare l'intestin antérieur du postérieur et est le lieu principal de la digestion. Il est lui même physiquement segmenté en trois parties majeures : une région antérieure et postérieure séparées d'une zone intermédiaire composée de cellules Cu²⁺ au pH très acide (pH < 3). Constitué d'un mono-épithélium pseudo-stratifié, il est entouré d'une couche de muscles viscéraux dont les contractions permettent le mouvement des aliments présents dans la lumière intestinale (au niveau apicale de l'épithélium) vers le *rectum*, et est protégé

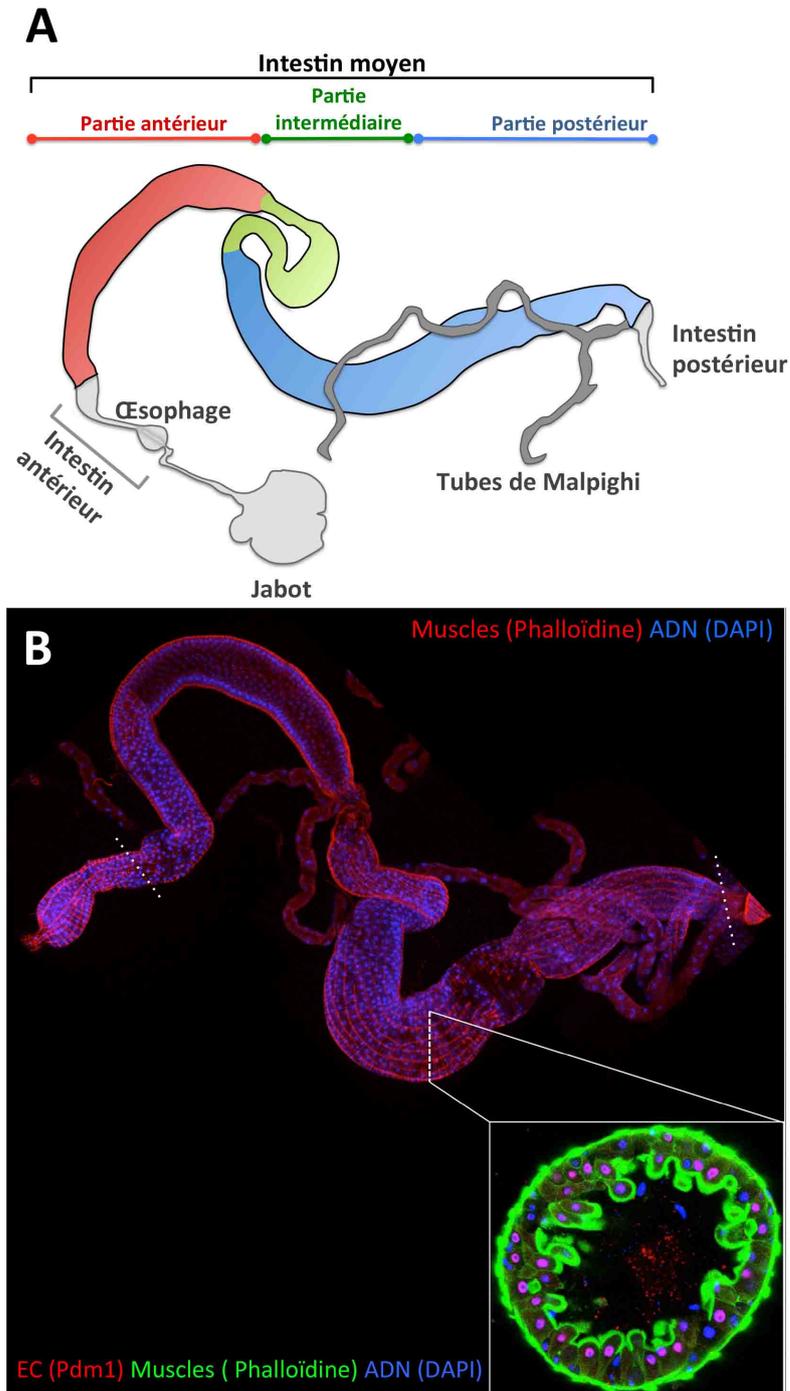


Figure 10. Organisation structurale de l'intestin moyen de drosophile. (A). Le système digestif est connecté en son extrémité antérieure à la bouche, aux glandes salivaires (non représentées) et au jabot. Il se prolonge jusqu'à l'intestin antérieur composé, entre autres, de l'œsophage. Ce dernier aurait une fonction similaire à celle de l'estomac. L'appareil digestif est également composé d'un intestin moyen et d'un intestin postérieur. L'intestin moyen de drosophile est segmenté en trois parties majeures : une région antérieure (rouge), une région intermédiaire (vert) qui inclut une zone composée de cellules Cu²⁺ au pH très acide (pH < 3), et une région postérieure (bleu). (B) Image confocale d'un intestin de drosophile (Photo de C. Fons) et de sa section transversale (Photo de A. Bardin)

de l'environnement extérieur par une matrice non-cellulaire essentiellement composée de chitine et glycoprotéines : la membrane péritrophique. Cet épithélium ne présente cependant pas de compartimentation structurale comme son homologue mammifère qui se distingue par la présence de cryptes de Lieberkühn où sont maintenues les progéniteurs intestinaux.

Les cellules souches intestinales de drosophile sont localisées au niveau basal de l'épithélium, proche des muscles viscéraux, et sont réparties de manière homogène le long du tissu (**fig. 7A, 10**) (Marianes & Spradling, 2013). Différentes subdivisions ont néanmoins été établies selon des critères morphologiques, histologiques et génétiques comme l'expression régionalisée de facteurs de transcriptions (Buchon et al, 2013 ; Marianes & Spradling, 2013), ce qui ajoute une complexité supplémentaire à l'organisation fonctionnelle de l'organe intestinal. Par exemple, l'expression d'enzymes digestives spécifiques, restreinte à certaines régions de l'intestin moyen d'une part, et la présence de transitions strictes du taux d'acidité local à la lumière intestinale entre chaque région d'autre part, définissent ces zones intestinales comme des unités fonctionnelles assurant la digestion progressive des nutriments le long du transit intestinal. La partie antérieure de l'intestin moyen est associée à la dégradation des macromolécules (amidon, gras, protéine) et corrèle avec l'expression de gènes de la réponse immunitaire, alors que la partie postérieure est associée à l'assimilation, dégradation et transport des nutriments (Buchon et al, 2013 ; Marianes & Spradling, 2013). Ces régions sont établies au cours des deux premiers jours après éclosion de la vie adulte de drosophile et restent établies malgré les stress environnementaux telles que les restrictions nutritives ou les infections. Elles sont néanmoins affectées avec les effets liés à l'âge telle que l'augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (Buchon et al, 2013).

La présence de ces subdivisions est essentielle pour le maintien de l'homéostasie générale du tissu. En effet, une perturbation génétique de cette régionalisation par l'inactivation des gènes spécifiques à chaque région, est assimilée à un stress tissulaire, comme le suggère le déclenchement d'une réponse immunitaire : expression de peptides antibactériens et augmentation de la prolifération des cellules souches (Buchon et al, 2013).

En plus d'une fonctionnalité physiologique et digestive différentielle, chaque région peut être caractérisée par un état homéostatique spécifique, d'un point de vue du taux de prolifération des cellules souches qu'elle contient ou de la production de chaque type de

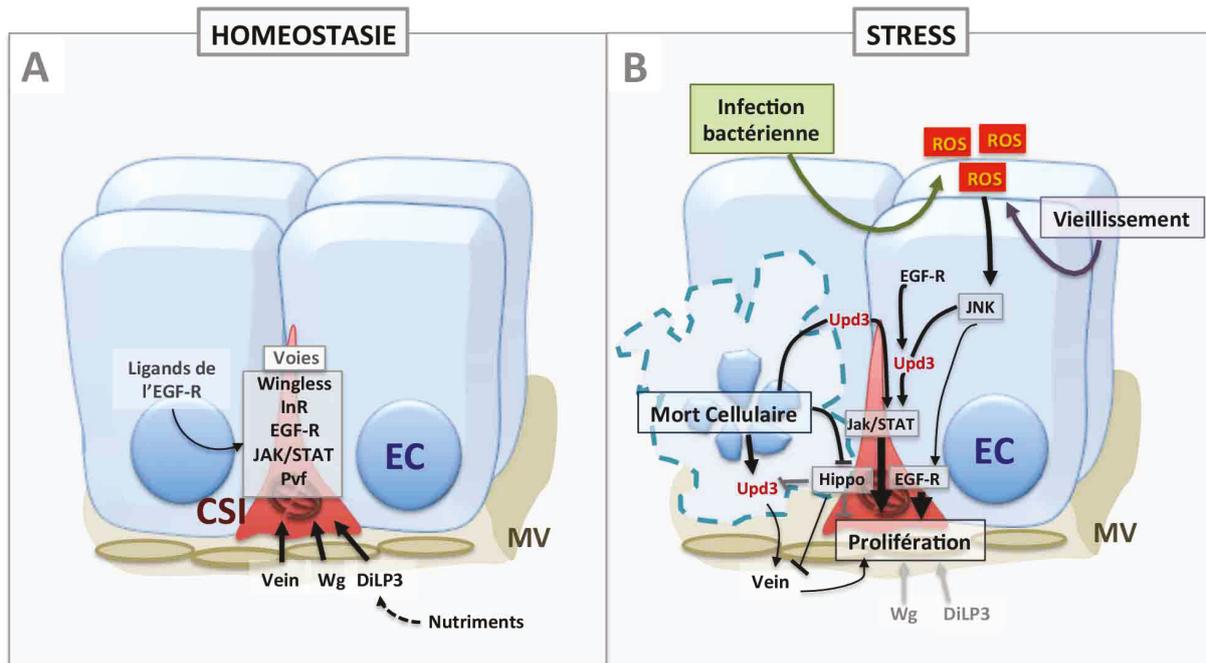


Figure 11. Contrôle de la prolifération des CSI à l'état d'homéostasie tissulaire et en réponse à un stress. (A) Dans des conditions d'homéostasie tissulaire, la prolifération des cellules souches intestinales (CSI) est stimulée par les voies JAK/STAT, du récepteur à l'EGF (EGF-R), du récepteur à l'Insuline (InR) et par la voie Wingless (Wg). Ces voies sont, entre autres, activées dans les CSI par les ligands Vein, Wg et le peptide à insuline DiLP3, exprimés par les muscles viscéraux (MV), mais également par d'autres ligands de la voie de l'EGF-R exprimés par les CSI, les Entéroblastes (EB) ou les entérocytes (EC). La voie de l'InR serait impliquée dans l'adaptation du tissu face aux variations des apports nutritionnels. (B) Lors d'une infection bactérienne ou au cours du vieillissement tissulaire, plusieurs voies de signalisation stimulent la prolifération des cellules souches. Au cours de cette réponse, une augmentation intracellulaire de ROS (« *Reactive Oxygen Species* ») intervient, suivie de l'activation de la voie JNK (« *Jun N-terminal kinase* ») dans les EC. Après un dommage cellulaire, la voie Hippo est inhibée, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération des CSI. Ainsi, l'activation de JNK, l'inhibition de Hippo, et l'intervention d'autres signaux mal connus impliqués dans la réponse aux dommages, stimulent la voie JAK/STAT par l'intermédiaire du ligand Upd3, et celle de l'EGF-R via l'expression musculaire du ligand Vein, dans les CSI. La voie JNK stimule également la voie Wg par l'intermédiaire du ligand Wg, exprimé dans des EB (Non représenté sur le schéma).

cellules différenciées. Par exemple, les cellules souches des régions postérieures de l'intestin moyen se divisent en moyenne une fois par jour, ce qui est sensiblement plus rapide que les cellules souches des régions antérieures (0,8 divisions par jours) et des régions de la zone intermédiaire, une région plus quiescente où les cellules souches se divisent en moyenne tous les quatre à cinq jours (Marianes & Spradling, 2013). La production clonale de chaque cellule souche semble également avoir une "mémoire positionnelle", c'est-à-dire quelle respecte les limites de leur zone originelle et ne semblent pas envahir les régions voisines (Marianes & Spradling, 2013).

Une niche intestinale ?

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'épithélium intestinal de drosophile ne comporte pas de repliements structuraux à l'origine d'une centralisation des signaux du maintien de la régulation des cellules souches, à l'inverse de son homologue mammifère (**fig. 10**). Bien que la présence d'une niche intestinale ne semble pas être définie à ce jour, différentes sources de signalisations ont cependant pu être mises en évidence. Les muscles viscéraux sécrètent des facteurs extracellulaires mitogènes, tels que les ligands des voies de signalisation Wingless, de l'EGF-R, et de l'insuline (Biteau & Jasper, 2011; Buchon et al, 2010; Jiang et al, 2011; Lin et al, 2009; Lin et al, 2008; O'Brien et al, 2011; Veenstra et al, 2008; Xu et al, 2011) à l'origine d'un environnement extracellulaire propice à la prolifération des cellules souches (**fig. 11**).

L'expression de facteurs mitogènes n'est cependant pas exclusive aux muscles viscéraux. En effet, les ligands du récepteur de l'EGF et du récepteur de la voie JAK/STAT sont aussi exprimés au niveau des cellules souches, des Entéroblastes et dans les Entérocytes (Buchon et al, 2009a; Buchon et al, 2010; Jiang et al, 2011; Jiang et al, 2009; Xu et al, 2011). Par exemple, cours de la régénération tissulaire, la sécrétion du Wg par les cellules Entéroblastes va être stimulée par l'action de la voie JNK (Cordero et al, 2012b). De même, la sécrétion du ligand Unpaired 3 (Upd3) par les Entérocytes au cours de la réparation tissulaire stimule l'expression des ligands des voies JAK/STAT et de l'EGF-R dans les cellules souches. En plus d'une stimulation de la prolifération des cellules souches par les Entérocytes, une boucle homéostatique de régulation de l'activation des cellules souches est mise en place. Elle est à l'origine d'une stimulation autocrine des cellules souches, et donc d'une amplification du signal prolifératif. En résumé, l'environnement cellulaire participe au

contrôle de la prolifération des cellules souches en produisant des signaux extracellulaires mitogènes (**fig.11**).

Une troisième source de signaux de régulation des cellules souches proviendrait des trachées et impliquerait la voie de signalisation BMP/Dpp (« *bone morphogenetic protein* »/« *Decapentaplegic* ») qui serait impliquée dans la stimulation de la spécification des cellules souches (Li et al, 2013b). L'origine de ce signal est cependant controversée. Deux autres études aux résultats contradictoires proposent un contrôle issu des muscles viscéraux, les hémocytes et des cellules Entérocytes (Guo et al, 2013; Li et al, 2013a; Li et al, 2013b; Zhou et al, 2015). Dans l'attente de nouvelles investigations, la région émettrice du signal Dpp reste à l'état d'hypothèse.

Ce regroupement localisé de signaux, indépendant d'une structure physique définie, constitue un environnement local favorable à la régulation de la prolifération des cellules souches. Cependant, la question de l'existence d'une niche, c'est-à-dire d'une entité physique nécessaire au maintien de l'état « souche » au sein du tissu intestinal de drosophile est toujours en débat. Au sein de l'épithélium, les cellules souches ont une position basale et sont donc proches des muscles viscéraux (Ohlstein & Spradling, 2007). Ainsi, ces derniers pourraient jouer ce rôle de niche pour les cellules souches. Toutefois, l'absence de mise en évidence claire de fonction de ces muscles dans le maintien des cellules souches ne permet pas de conclure définitivement. L'interaction de la cellule souche intestinale avec son environnement voisin semble néanmoins être important. En effet, une perte de fonction clonale ou une déplétion des différents composants des complexes d'Intégrines nécessaires à l'adhésion cellulaire, impliqués dans l'ancrage de la cellule souche à la matrice extracellulaire perturbe le maintien et la prolifération des cellules souches intestinales (Lin et al, 2013).

La possibilité que les cellules souches produisent leur propre niche n'est également pas à exclure. Cette idée, non exclusive, découle d'une homologie qui peut être faite entre l'épithélium intestinal de drosophile, de mammifère (avec la proximité des cellules de Paneth) et l'épiderme murin (Clevers et al, 2014). Localisées au niveau basal de l'épiderme, les cellules souches interfolliculaires produisent et sécrètent leur propre ligand Wnt, source du maintien de leur état « souche », à l'instar des cellules souches intestinales de drosophile.

De même que la proximité des cellules de Paneth avec les cellules souches intestinales des cryptes n'est pas sans rappeler l'interaction entre les cellules souches intestinales de drosophile et leur progéniteur, les cellules Entéroblastes.

Le maintien de l'intégrité tissulaire

L'intestin est un organe en contact permanent avec le milieu extérieur. Ainsi, en plus du renouvellement naturel du tissu, l'intestin doit faire face à des agressions externes comme les stress physiques (lésions), chimiques (stress oxydatif) ou encore infectieux. Pour restaurer l'intégrité du tissu et assurer un état physiologique fonctionnel de l'organe, les cellules souches vont être activement sollicitées. Une régulation fine de leur capacité proliférative est alors indispensable et est assurée par un réseau complexe de voies de signalisation qui entraîne principalement l'activation de trois voies centrales : les voies Wnt/Wingless, JAK/STAT et du récepteur de l'EGF (EGF-R) (**fig.11**).

De nombreuses stratégies assurent une détection des dommages tissulaires au sein de l'intestin. La voie Hippo agit comme un senseur de l'intégrité tissulaire. En absence de stress, elle restreint la capacité proliférative des cellules souches. À l'inverse, une perte de l'intégrité épithéliale provoque l'inactivation de cette voie, ce qui permet la stimulation de la prolifération des cellules souches (Karpowicz et al, 2010; Ren et al, 2010; Shaw et al, 2010; Staley & Irvine, 2010). Lors d'une activation constitutive de la voie Hippo, le tissu est incapable de répondre aux stress environnementaux (stress réplicatif, infection bactérienne, destruction de la lame basale), comme l'illustre l'absence de prolifération des cellules souches.

Dans le cas d'une mort cellulaire importante, ou encore d'un stress oxydatif (caractérisé par une forte concentration de dérivés réactifs de l'oxygène ROS [*reactive oxygen species*]), la réparation tissulaire est également associée à une activation de la voie de signalisation JNK (Jun N-terminal kinase) dans les Entérocytes (Biteau et al, 2008; Buchon et al, 2009b; Jiang et al, 2009). La voie JNK stimule la sécrétion du ligand Unpaired 3 (Upd 3) par les Entérocytes, des ligands de la voie EGF-R par les cellules épithéliales et musculaires, et du ligand Wingless (Wg) par les cellules Entéroendocrines, ce qui induit l'activation des voies JAK/STAT, de l'EGF-R et Wg dans les cellules souches (Figure 3B) (Biteau & Jasper, 2011; Buchon et al, 2009a; Buchon et al, 2010; Cordero et al, 2012b; Ha, 2005; Jiang et al, 2011; Karpowicz et al, 2010; Ren et al, 2010; Shaw et al, 2010; Staley & Irvine, 2010). Dans le

cas d'une infection bactérienne, la réponse au stress se fait en deux étapes. La réponse immunitaire va, dans un premier temps, se mettre en place. Elle se traduit par une rapide production de ROS qui, dans un second temps, stimulent la prolifération des CSI (Buchon et al, 2009a; Ha, 2005; Hochmuth et al, 2011).

Les relations d'épistasie qui lient ces différentes voies de signalisation restent cependant mal connues. Certaines données placeraient la voie de l'EGF-R en aval de la voie JAK/STAT (Cordero et al, 2012a; Jiang et al, 2009), alors que d'autres indiquent une action parallèle de ces deux voies (Buchon et al, 2010; Xu et al, 2011). Les voies Hippo et des JNK semblent agir en amont en modulant l'expression des ligands des voies JAK/STAT, de l'EGF-R et de Wg (Biteau et al, 2008; Buchon et al, 2010; Buchon et al, 2009b; Cordero et al, 2012b; Jiang et al, 2009; Karpowicz et al, 2010; Ren et al, 2010; Shaw et al, 2010; Staley & Irvine, 2010). D'autres voies de signalisation, comme l'activation de la kinase Dp38p, sont également impliquées dans la réponse au stress (Choi et al, 2008; Park et al, 2009).

En résumé, la mise en place des mécanismes de réparation tissulaire se fait par le biais de différentes voies de détection des dommages (JNK, Hippo) qui vont générer l'activation de voies prolifératives secondaires (JAK- STAT, EGF-R, Wg).

La régulation de la prolifération des cellules souches au cours du renouvellement naturel du tissu

En plus d'être impliquées dans la réparation tissulaire, les voies JAK/STAT et de l'EGF-R exercent un rôle stimulateur sur la prolifération des cellules souches au cours du renouvellement naturel de l'épithélium, tout en assurant le maintien des cellules souches (**fig. 11**) (Biteau & Jasper, 2011; Buchon et al, 2010; Jiang et al, 2011; Xu et al, 2011). Il en est de même pour la voie de signalisation PvR (« *Platelet-derived Growth Factor-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-related* »), qui n'est pas nécessaire à l'induction de la prolifération en réponse au stress (Bond & Foley, 2012). Autrement dit, l'absence de ces voies induit une perte des cellules souches au sein du tissu (Xu et al, 2011). L'étude de mutants affectant la transduction des signaux de la voie Wiggless/Wnt, comme une perte de fonction des gènes codant pour le récepteur Frizzled, le facteur de transcription Armadillo/ β -caténine ou encore la protéine effectrice Dishevelled, implique également cette voie dans le

maintien et la prolifération des cellules souches en absence de stress extrinsèques (Lee et al, 2009; Lin et al, 2008). De plus, une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *apc* (« *adenomatous polyposis coli* »), inhibiteur de la voie Wingless, est à l'origine d'une hyperplasie de l'épithélium dépendante du gène *myc* (Cordero et al, 2012a). Ainsi, une activation constitutive de cette voie dans les cellules souches stimule leur prolifération sans affecter la différenciation des cellules souches nouvellement formées en Entérocytes et cellules Entéroendocrines (Lee et al, 2009; Lin et al, 2008).

Un mode de division Asymétrique vs. Symétrique

Afin de s'adapter aux variations environnementales telles que les fluctuations de nourriture, l'épithélium peut modifier sa croissance et la capacité proliférative des cellules souches. En effet, le niveau d'expression local du ligand DiLP3 (« *Drosophila Insulin-like peptide 3* ») sécrété par les muscles viscéraux (**fig.11**) peut influencer la prolifération des cellules souches par activation du récepteur à l'insuline (Biteau et al, 2010; Choi et al, 2011; O'Brien et al, 2011; Wang et al, 2011). Cette augmentation du taux de division des cellules souches s'accompagne d'une tendance des cellules souches à se diviser symétriquement. Ainsi, à l'issue de la division de la cellule souche, deux cellules filles au même destin cellulaire seront produites. Ces effets permettraient de réguler la croissance de l'intestin en augmentant le nombre total de cellules de cet organe afin d'assurer une meilleure adaptabilité du tissu face aux variations en apport nutritionnel (jeûne ou nutrition) (Choi et al, 2011; O'Brien et al, 2011; Wang et al, 2011). Ainsi, la voie de l'insuline agirait davantage comme un signal permissif d'activation de la capacité proliférative des cellules souches en réponse à un apport de nutriments (Amcheslavsky et al, 2009).

Ce mode de division n'est cependant pas restreint à une réponse régénérative des cellules souches. En effet, dans un tissu à l'état homéostatique, ce type des divisions se produit dans environ 18% des cas (de Navascues et al, 2012; Foronda et al, 2014; O'Brien et al, 2011). Celles-ci ont notamment été mises à jour par le suivi du destin des deux cellules filles et de leur descendance simultanément. Bien que le mode de division symétrique participe à l'augmentation du nombre de cellules au sein du tissu en produisant deux nouvelles cellules souches, il peut également causer leur perte par la génération de deux cellules Entéroblastes. L'épithélium intestinal de drosophile présente ainsi une certaine

adaptabilité tissulaire, lui permettant de moduler sa composition en cellules en réponse aux aléas du milieu extérieur.

Cette coordination entre auto-renouvellement des cellules souches et spécification serait régulée par le micro ARN (miARN) *miR305* dans les cellules souches, en réprimant les transcrits du récepteur à Insuline et de la Pi3k (« *phosphoinositide 3-kinase* »), ainsi que les transcrits codant le répresseur de la voie Notch Hairless. Une boucle de rétro-action négative, place également l'expression de *miR305* sous le contrôle de la voie à Insuline (Bardin et al, 2010). Ces analyses ouvrent un nouveau champ d'investigation sur le rôle des miARN dans la régulation du lignage intestinal.

IV. L'identification de nouveaux régulateurs des cellules souches intestinales de drosophile

Deux stratégies complémentaires dans l'identification de nouveaux régulateurs de l'homéostasie tissulaire

La découverte de nouveaux facteurs de régulation de la fonction des cellules souches est un challenge dans le domaine, tous modèles d'études confondus. L'idéal d'une cartographie de la fonction et des interactions moléculaires des gènes exprimés dans un système donné permettrait d'élucider les mécanismes à l'origine de l'orchestration des fonctions physiologiques de nos cellules et à une plus large échelle, de nos tissus.

La drosophile est devenue un modèle par excellence pour la mise en place de cribles génétiques à grande échelle. Ceci, du fait d'une courte durée de temps entre chaque génération composée d'un grand nombre d'individus, d'un faible coût de maintenance, mais également grâce à la disponibilité d'outils génétiques qui permettent la modulation de l'expression des gènes à l'échelle du génome : banques de lignées mutantes, d'ARNi ou de surexpression de gènes (pour revue voir (Beller & Oliver, 2006)).

Deux types d'approches complémentaires ont été mis en place dans l'intestin de drosophile. Elles consistent à analyser les phénotypes associés à une perte ou inactivation de la fonction de gènes par mutagenèse ou ARNi, et sont à l'origine de la découverte de nouveaux facteurs de régulations de la biologie des cellules souches.

(i) Du gène au phénotype : à la recherche d'une fonction

Un « catalogue » de la fonction des gènes dans la régulation des cellules souches intestinales de drosophile a ainsi été établi par le laboratoire de Steve Hou (Zeng et al, 2015), grâce à une approche d'inactivation de l'expression des gènes par ARNi insérés de manière stable dans le génome. Ceci est possible grâce au système thermosensible UAS/GAL4 sous le contrôle du promoteur *escargot*, permettant une inactivation spécifique dans les cellules souches et progéniteurs intestinaux chez l'adulte (Micchelli & Perrimon, 2006). Cette stratégie a l'avantage de donner un large aperçu de la fonction des gènes, offrant ainsi un répertoire utile pour la communauté scientifique. Ainsi, avec cette technique, Zeng et ses

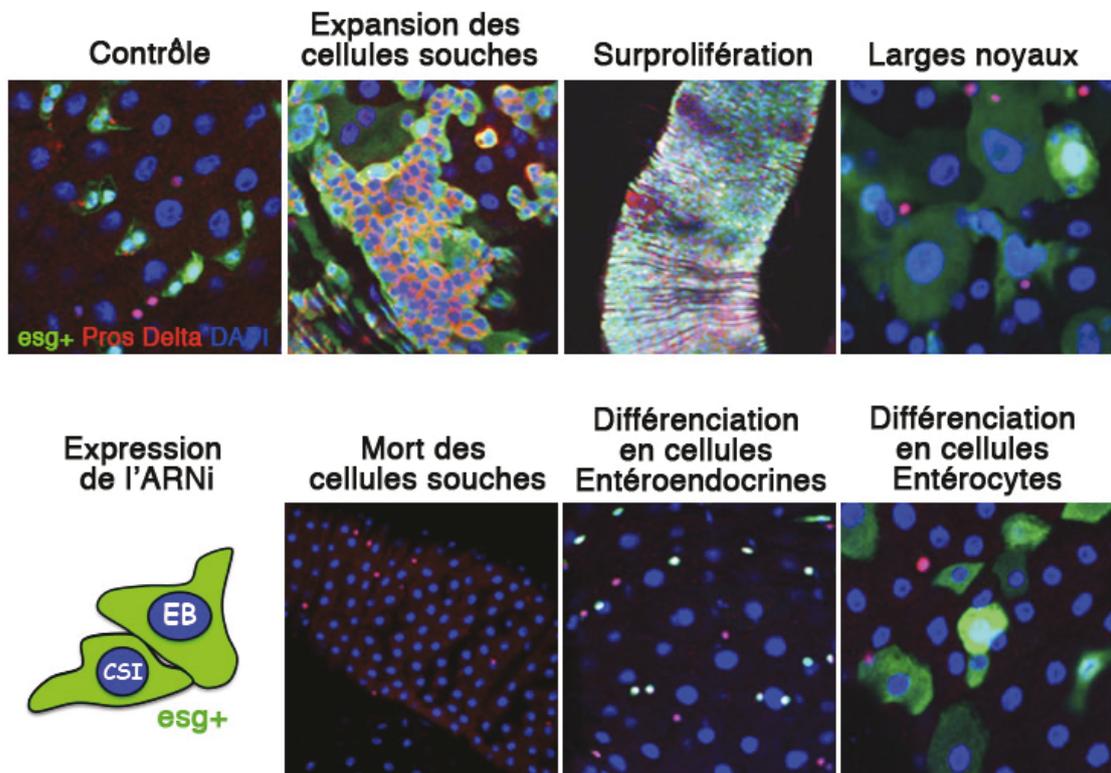


Figure 12. Phénotypes criblés par Zeng *et al.* 2015. Des ARN interférant (ARNi) ont été spécifiquement exprimés dans les cellules souches (CSI, Rouge ponctiforme) et les cellules Entéroblastes (EB) sous le contrôle du promoteur *escargot* (*esg*, Vert). Le marqueur Prospéro (Rouge nucléaire) est utilisé pour identifier les cellules Entéroendocrines. Les cellules Entérocytes sont identifiables par leur noyau polyploïde (Large noyau, Bleu). ADN (Bleu). (Adapté de Zeng et al, 2015)

collaborateurs (Zeng et al, 2015) ont pu mettre en évidence 478 gènes potentiellement importants pour la régulation des cellules souches intestinales.

L'une des étapes importantes d'un crible génétique est l'analyse des phénotypes. Ces derniers doivent être clairs, distincts et sans ambiguïté, afin d'éviter toute surinterprétation et conclusion prématurée sur la fonction des gènes testés. Zeng et al. (Zeng et al, 2015) ont ainsi regroupé les phénotypes observés en six catégories (**fig.12**). Une expansion de cellules souches suggérerait un défaut de spécification alors qu'une hyperplasie résulterait d'une sur-prolifération des cellules souches. De plus, la présence de cellules *esg+* exprimant le marqueur des cellules Entéroendocrines Prospero ou une accumulation de ces dernières, suggèreraient une différenciation aberrante des cellules Entéroendocrines. Les trois catégories suivantes ont quant à elles des phénotypes associés plus ambigus, rendant une interprétation plus difficile de la fonction des gènes associés. La présence de cellules *esg+* à large noyau qui pourrait être associée à un défaut du maintien de la diploïdie comme stipulé par les auteurs, pourrait également être interprétée comme une différenciation prématurée des cellules souches en cellules Entérocytes elles mêmes polyploïdes. Cette dernière interprétation est considérée comme une catégorie phénotypique à part entière. La sixième catégorie fait référence à une absence de cellules *esg+* dans le tissu et est associée à un phénotype de mort cellulaire et/ou de maintien d'un état de quiescence dans le cas d'une l'analyse plus détaillée de la fonction du complexe CycT/Cdk9. En absence d'analyse clonale supplémentaire, il est en effet impossible de conclure sur la cause de ce phénotype : mort cellulaire, quiescence ou perte des cellules souches et des progéniteurs par induction de leur différenciation.

La similarité des phénotypes observés lors de l'inactivation de gènes appartenant à un même complexe est néanmoins un bon contrôle de leur significativité. L'inhibition de dix gènes codant des protéines du complexe Médiateur révèle la présence de cellules *esg+* polyploïdes dépourvues du marqueur des cellules souches Delta. Ceci suggère une spécification prématurée des cellules souches associée à une différenciation en cellules Entérocytes. Ce large complexe composé de 33 protéines chez la drosophile, est impliqué dans les différentes étapes de la transcription : de la régulation de la polymérase II à la biogénèse de l'ARN messager. Ainsi, bien que cette étude offre une base de données utile pour de futures investigations de la régulation des cellules souches intestinales, elle montre

également l'importance d'établir des phénotypes non ambigus dans la mise en place des cribles.

Un paramètre important à noter est que, du fait de l'expression globale des ARNi dans toutes les cellules souches et progéniteurs à l'échelle du tissu, cette approche ne permet pas de distinguer entre une réponse tissulaire (non-autonome) ou propre à l'inactivation cellulaire (autonome) et est davantage sujet aux variations tissulaires. Elle ne permet également pas l'identification de nouveaux gènes ou d'éléments régulateurs non-codant et est dépendante de la disponibilité et de l'efficacité des transgènes ARNi utilisés.

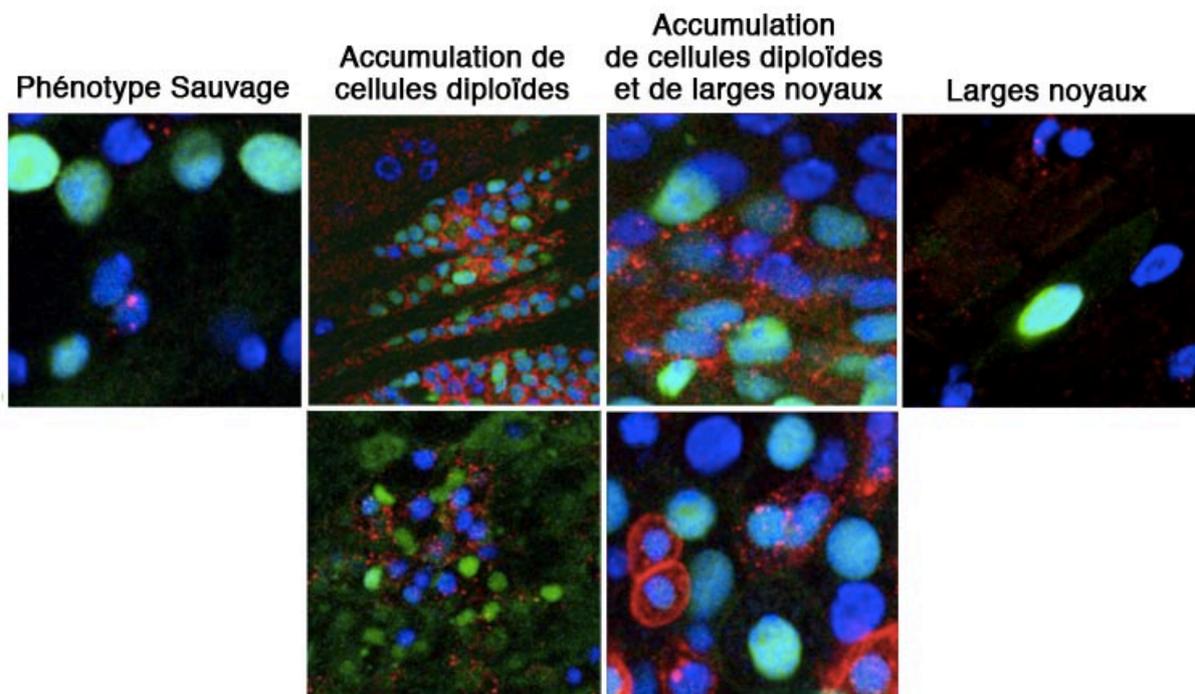


Figure 13. Phénotypes criblés par A. Bardin lors du crible génétique issue d'une mutagenèse non-dirigée. 88 allèles mutants ont pu être répartis selon les phénotypes suivants : 1) une accumulation de cellules diploïdes, potentiellement associées à un défaut de spécification des cellules souches et de différenciation terminale, 2) une accumulation de cellules diploïdes avec la présence de noyaux polyploïdes, suggérant un défaut de spécification des cellules souches et 3) des cellules polyploïdes isolées, reflétant une perte de cellules souches par spécification. (Adaptée des résultats de la thèse de C. Perdigoto 2011).

(ii) Un phénotype associé à une mutation : à la recherche d'un gène

Une seconde stratégie est d'induire des mutations au hasard dans le génome et de cribler les phénotypes associés. Dans cette optique, Allison Bardin (Perdigoto C., Schweisguth F., Bardin A., non publié) a mis en place une mutagenèse non dirigée par agent chimique (EMS, pour Méthanesulfonate d'éthyle), suivi d'un crible de seconde génération des phénotypes associées aux mutations non identifiées, localisées sur le bras gauche du chromosome II. Ceci en utilisant la technique de MARCM (Lee & Luo, 1999) permettant la mise en évidence de phénotypes liés à des mutations récessives, létales à l'état homozygote, affectant les cellules souches intestinales *in vivo*. 88 lignées mutantes réparties en trois groupes de phénotypes distincts associés à une dérégulation de l'homéostasie des cellules souches de l'intestin ont ainsi pu être identifiés (**fig.13**).

- 1) une accumulation de cellules diploïdes, potentiellement associées à un défaut de spécification des cellules souches et de différenciation terminale,
- 2) une accumulation de cellules diploïdes avec la présence de noyaux polyplœides, suggérant un défaut de spécification des cellules souches,
- 3) des cellules polyplœides isolées, reflétant une perte de cellules souches par spécification.

A l'issue de ce crible, 12 groupes de complémentations et donc des mutations associés à 12 gènes ont pu être isolés. Au final, deux allèles du gène *gmd* impliqué dans la régulation post-traductionnelle du récepteur Notch (Perdigoto et al, 2011), 1 allèles du gène *kismet* codant un facteur de modification de la chromatine (Gervais *et al*, en préparation), et deux allèles du gène *split-ends/spen* codant une protéine de liaison à l'ARN potentielle, ont entre autres pu être identifiés (Andriatsilavo *et al*, en préparation).

Bien que génératrice de nouveaux allèles mutants, cette démarche ne permet pas l'établissement rapide d'un catalogue à grande échelle de gènes dont la perturbation serait associée à un phénotype donné. Cette approche a cependant l'avantage de mettre en avant la fonction autonome des gènes identifiés à travers l'identification de phénotypes distincts. Elle permet également de s'affranchir en partie de nos connaissances sur la fonction des gènes dans l'étape de crible et ainsi d'analyser le phénotype d'allèles que nous n'aurions peut-être pas testés au premier abord. C'est le cas du gène *split-ends*, dont l'implication dans la régulation des cellules souches intestinales de drosophile est le sujet de cette présente étude.

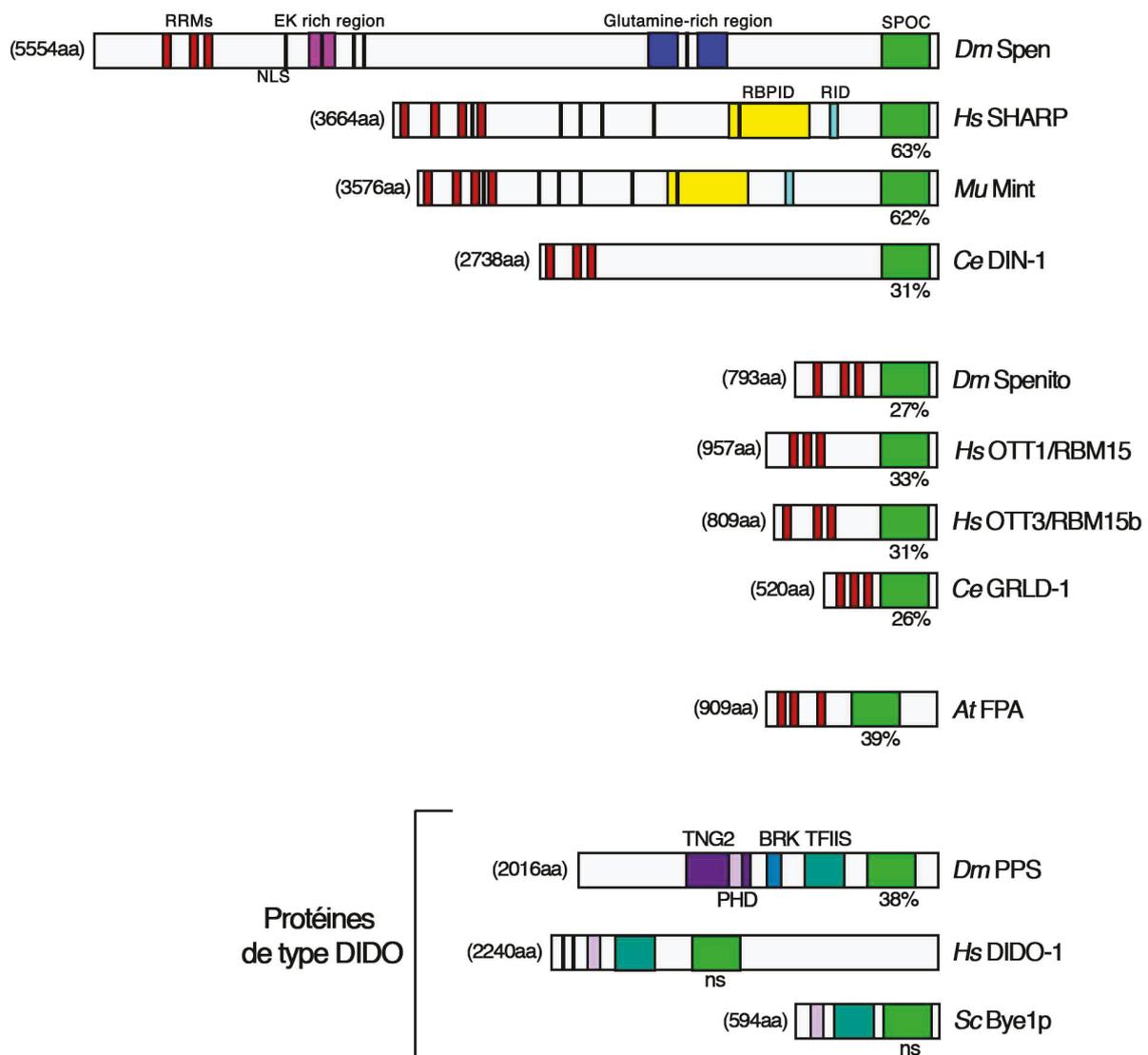


Figure 14. Les protéines de la famille SPEN. Chez les *Métazoaires*, les protéines SPEN peuvent être regroupées en deux sous-groupes composés des protéines de type Spen/SHARP (*Dm Spen*, *Hs SHARP*, *Mu MINT* et *Ce DIN-1*) d'une part et des protéines de type RBM15 (*Dm Spenito*, *Hs OTT1/RBM15*, *Hs OTT3/RBM15b* et *Ce GRLD-1*) d'autre part. A ce jour, qu'une seule protéine de la famille SPEN a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* (*At FPA*). Les protéines de type DIDO définissent une autre famille de protéines présentant un domaine SPOC. Le pourcentage de similarité des domaines SPOC en comparaison avec le domaine de *Dm Spen* est indiqué. *Drosophila melanogaster* (*Dm*), *Homo sapiens* (*Hm*), *Mus musculus* (*Mu*), *Caenorhabditis elegans* (*Ce*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Des domaines spécifiques à chaque protéine ont également été prédits ou mis en évidence : comme la région riche en acide Glutamique et Lysine (« EK rich region »), la région riche en Glutamine (« Glutamin-rich region »), les domaines RBPID (« RBP interaction domain »), RID (« nuclear receptor interaction domain »), TNG2 (un domaine présent dans les protéines de remodelage de la chromatine), PHD, BRK, TFIS (« *Transcription factor S-II domain* »).

Chapitre 3 | *spen* : un gène aux multiples facettes

I. Une famille de gènes conservée chez les *Metazoaires* et les plantes

La famille SPEN est composée de protéines nucléaires, conservées à travers les Métazoaires (humains, souris, nématodes, insectes,...), mais également chez les plantes (*A. thaliana*, *Oryza sativa* — le riz) (**fig. 14**) (Uranishi et al, 2009). Elles sont caractérisées par la présence de trois domaines RRM (de l'anglais « *RNA Recognition Motif* » pour « Motif de reconnaissance de l'ARN ») en région N-terminale de la protéine et d'un domaine SPOC (pour « *Split-ends Paralog and Ortholog C-terminal* ») en région C-terminale. Chez la drosophile, le gène *split-ends* (*spen*, *CG18497*) (Kolodziej et al, 1995 ; Kuang et al, 2000 ; Rebay et al, 2000; Wiellette et al, 1999) est localisé au niveau du chromosome 2L (*21B3-B4*). Il code huit isoformes générées par épissage alternatif, sous le contrôle de deux promoteurs alternatifs. Ces isoformes diffèrent principalement par des variations au niveau de leurs régions non traduites (UTRs, de l'anglais « *Untranslated region* ») et sont à l'origine d'une protéine nucléaire de 5560 acides-amino (aa) (Chen & Rebay, 2000; Kuang et al, 2000; Rebay et al, 2000; Wiellette et al, 1999). Un second gène de la famille SPEN, *spenito/OTT1/Rbm15* (*nito*, *CG2910*) (Jemc, 2006) est localisé sur le chromosome 2R (43F8-F9) et code une protéine de 793aa. La présence de deux gènes codant une grande protéine (Spen/SHARP) et une petite protéine (Spenito/OTT1/Rbm15) dans les génomes, est conservée à chez les Métazoaires (**fig. 14**). Chez les vertébrés, la classe des protéines Rbm15 est subdivisée en deux sous-groupes : les protéines de type OTT1/Rbm15 et les protéines de type OTT3/Rbm15b (Uranishi et al, 2009) (**fig. 15**), suggérant un événement de duplication au niveau de l'ancêtre commun de ces deux groupes de Métazoaires, les nématodes et les vertébrés.

Afin de mieux cerner les rôles et les fonctions de Spen chez *Drosophila melanogaster*, nous allons dans un premier temps nous attarder sur ses fonctions cellulaires connues (**Tableau 1**). Dans un second temps, nous allons nous intéresser aux fonctions moléculaires associées aux protéines de la famille SPEN.

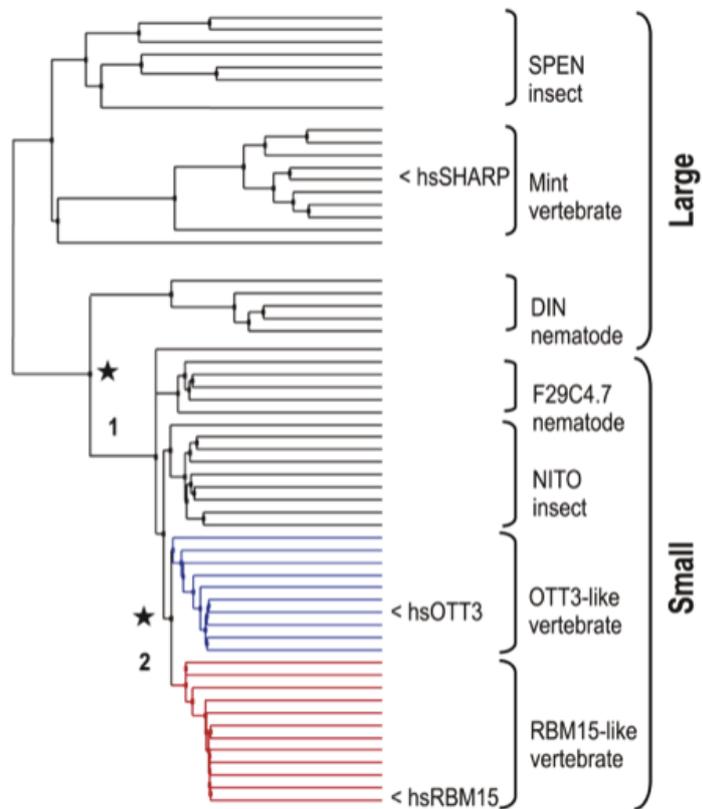


Figure 6. Arbre phylogénétique des protéines de la famille SPEN. Le nœud (1) représente la première séparation entre les protéines de type SPEN et RBM15, le nœud (2) représente la séparation entre OTT1/Rbm15 (Rouge) et OTT3/Rbm15b. (Arbre généré par (Uranishi et al, 2009)).

Tableau 1. Récapitulatif des phénotypes liés à une perte de fonction du gène *spen*

	Phénotypes d'une perte de fonction de <i>spen</i>	Processus cellulaires potentiellement affectés	Espèces	Références
Système nerveux central embryonnaire	Défaut de fasciculation axonale	Axogénèse Migration cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	Kuang et al, 2000 Kuang et al, 2000 ; Chen & Rebay, 2000
	Réduction du nombre de précurseurs des cellules gliales (stade 13) gliales (stade 14) hypoplasie du cerveau adulte associée à un retard général de croissance	Prolifération, Différenciation et/ou Survie cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Chen & Rebay, 2000
Système nerveux central adulte	hypoplasie du cerveau adulte associée à un retard général de croissance	Prolifération, Différenciation et/ou Survie cellulaire	<i>Mus musculus</i>	Yabe et al, 2007
Système nerveux périphérique embryonnaire	Défaut de fasciculation axonale	Axogénèse Migration cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	Kolodziej et al, 1995 ; Kuang et al, 2000 Mace & Tugores, 2004
	Défaut de migration cellulaire	Migration cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mace & Tugores, 2004
Mononeurones intersegmentaux embryonnaires	Variation du nombre de précurseurs neuronaux	Prolifération, Différenciation et/ou Survie cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kuang et al, 2000
	Défaut d'innervation ou de formation de synapses des muscles dorsaux	Axogénèse et/ou Synaptogénèse	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kuang et al, 2000
Développement mandibulaire	Absence de certaines sclérites des appendices buccaux	Détermination cellulaire et/ou biosynthèse de Chitine	<i>Drosophila melanogaster</i>	Gellon et al, 1997; Wielllette et al, 1999
	Malformation et hypoplasie de la dent, associée à une réduction du germe et de la prolifération	Prolifération et/ou Différenciation cellulaire	<i>Mus musculus</i>	Zhu et al. 2011
Autres phénotypes embryonnaires	Défaut de réponse immunitaire chez la larve		<i>Drosophila melanogaster</i>	Jin et al. 2008
	Présence de sclérites ectopiques thoraciques	Intégrité tissulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Gellon et al, 1997; Wielllette et al, 1999;
Développement de l'œil	Perte drastique des cellules interommatidiales	Survivis cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mace et al, 2005 Querenet et al, 2015
	Une composition variable en photorécepteurs. Le photorécepteur R8 ne semble pas être affecté.	Prolifération et/ou Différenciation cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dickson et al, 1996; Dorroquez et al, 2007
Hématopoïèse	Augmentation de la population d'Hémocytes et diminution de la population de cellules Cristal chez la larve.	Prolifération et/ou Différenciation cellulaire	<i>Drosophila melanogaster</i>	Jin et al. 2008
	Différenciation préférencielle en lymphocytes B de la Zone Marginale dans un contexte déficient pour la production de lymphocyte T.	Différenciation cellulaire	<i>Mus musculus</i>	Kuroda et al. 2003
	Augmentation des Progéniteurs T précoces et réduction du nombre de Thymocytes mature, au stade foetal.	Différenciation cellulaire	<i>Mus musculus</i>	Tsufti et al. 2007

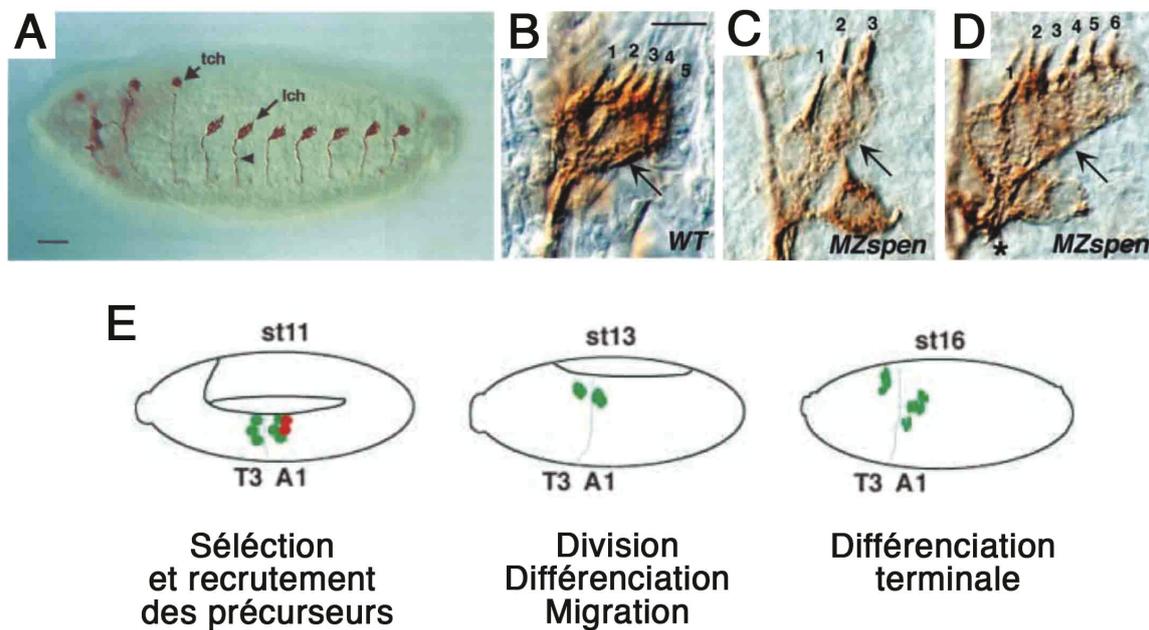


Figure 16. *spen* est impliqué dans le développement du centre nerveux périphérique de l'embryon de drosophile. (A) Vue latérale d'une sous-population des neurones chordotonaux (ch), les latéraux (lch) et les thoraciques (tch) d'un embryon au stade 16 (Chen & Rebay, 2000). (B) Groupe de 5 lch sauvages au stade 15 (Kuang et al, 2000). (C-D) En absence d'expression zygotique et maternelle de *spen*, les groupes de neurones lch présentent un nombre varié de neurones au stade 15, associé à un défaut de fasciculation (Kuang et al, 2000). (E) Schématisation du développement de l'organe chordotonal. Au stade 11 (vue dorsale), les progéniteurs des neurones ch sont recrutés et entament leur division. Au stade 13 (vue latérale), les précurseurs finissent leur division et migrent alors de la région dorsale de l'embryon pour atteindre leur position latérale au niveau de chaque hémisegment. C'est alors que débute la croissance axonale au stade 14 (vue latérale). Les cônes axoniques de croissance vont alors rejoindre le système nerveux central en région ventrale au stade 16 (vue dorsale). A ce stade, les neurones ont entamé leur différenciation terminale (Adapté de Rusten et al. 2001).

II. *Spen* et la régulation de processus cellulaires divers

spen et la Neurogénèse : une implication dans l'axonogénèse et la survie cellulaire

Le gène *split-ends* (*spen*), dont la mutation est létale à l'état embryonnaire, a été identifié pour la toute première fois chez *Drosophila melanogaster* au cours d'un crible génétique issu d'une mutagenèse aléatoire par agent chimique, en 1995 par Kolodziej, P. A. et ses collaborateurs (Kolodziej et al, 1995). Dans le but de mettre en évidence des gènes impliqués dans le guidage axonal, ils se sont focalisés sur les neurones chordotonaux latéraux (lch) au cours de l'embryogénèse. Ces neurones sensoriels sont regroupés sous forme de paquets neuronaux distribués aux niveaux dorsal, latéral et ventral des hémisegments abdominaux A1 à A7 de l'embryon (**fig. 16**). Au stade 13 de l'embryogénèse, les précurseurs des neurones lch ont fini leur division et migré depuis la région dorsale de l'embryon pour atteindre leur position latérale au niveau de chaque hémisegment. C'est alors que débute la croissance axonale au stade 14, pour rejoindre le système nerveux central en région ventrale au stade 16. Ils ont à ce stade accompli leur différenciation terminale en neurone chordotonal (**fig. 16**).

Une première analyse des stades 14 et 16 de l'embryogénèse a permis d'exclure les allèles mutants à l'origine d'une perturbation globale du réseau neuronal périphérique, et donc des gènes potentiellement impliqués dans la production des neurones. Les candidats restants (incluant le mutant *spen*) ne présentent aucun défaut de différenciation cellulaire apparent. Les marqueurs de différenciation neuronale au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, des cellules gliales et musculaires sont normalement exprimés (Chen & Rebay, 2000; Kuang et al, 2000). Un second crible a permis de classer ces candidats en trois groupes phénotypiques : un défaut de croissance axonale (longueur axonale), de fasciculation (capacité des fibres axonales à migrer groupées), ou de migration neuronale (positionnement des corps cellulaires) (Kolodziej et al, 1995).

Le phénotype lié à une mutation dans le gène *spen* a premièrement été décrit comme un défaut de fasciculation des axones neurones lch (Kolodziej et al, 1995). Ce dernier pourrait probablement avoir inspiré le nom de « *split-ends* » ou « *extrémités fourchues* » (**fig.16**).

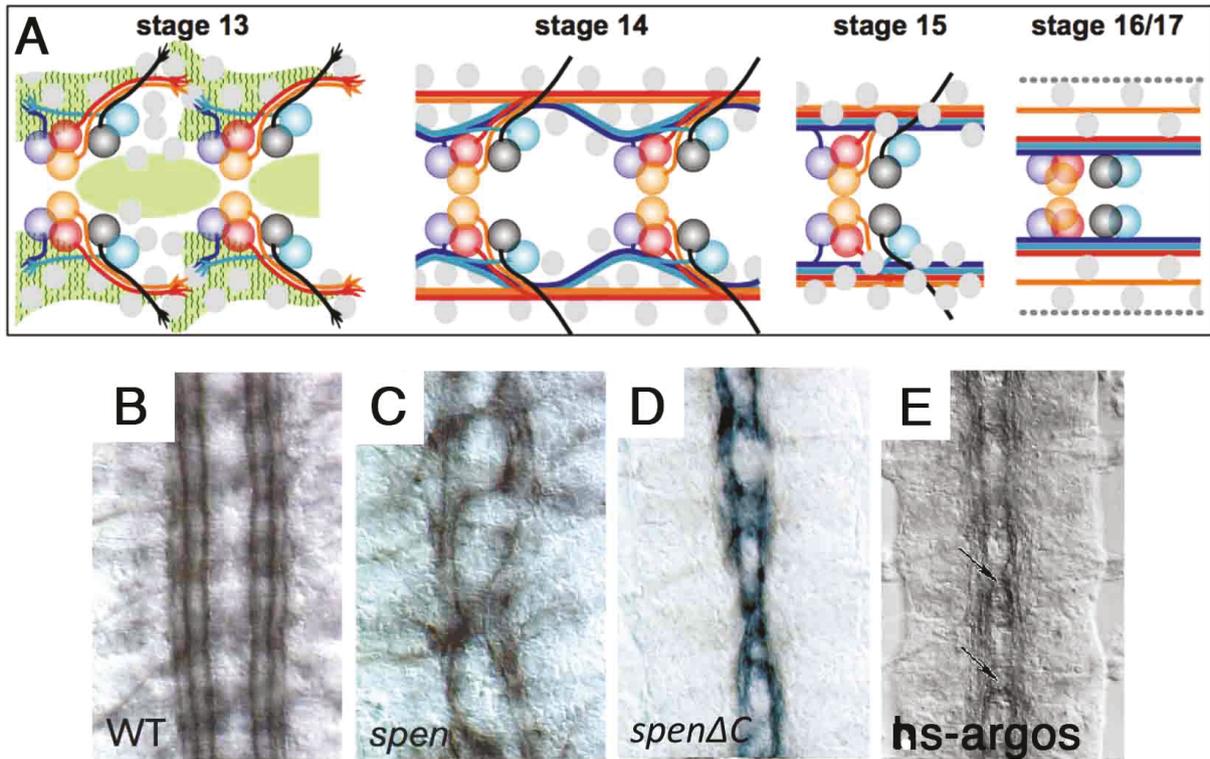


Figure 17. Développement du système nerveux central dans l'embryon de drosophile. (A) Les axones des neurones de la commissure ventrale migrent en coordination avec les différents réarrangements des précurseurs des cellules gliales. Ils vont ainsi enchaîner des étapes de fasciculation (stade 13), de séparation (stade 14) et de re-fasciculation (stade 15), pour finir arrangés le long de la commissure ventrale. (Sanchez-Soriano et al, 2007) **(B-E)** Visualisation des axons réarrangés le long de la commissure ventrale dans un contexte sauvage (Chen & Rebay, 2000) **(B)**, d'un mutant *spen* à l'état homozygote (Chen & Rebay, 2000) **(C)**, d'une construction *spen* dominante négative (*spenΔC*) (Chen & Rebay, 2000) **(D)** et d'un contexte d'inhibition de la voie Egf-R par une surexpression de *argos* (Stemerding & Jacobs, 1997) **(E)**. Immunomarquage de la Fascicline II **(B-E)**.

Cinq ans plus tard, la même équipe montrera un défaut dans la production du nombre de précurseurs des neurones ICh par paquets neuronaux, dans des embryons de stade 14-15 dépourvus de l'expression maternelle et zygotique du gène *spen* (Kuang et al, 2000). Ces précurseurs neuronaux présentent également un défaut de positionnement le long de l'axe dorso-ventral, suggérant un défaut de migration cellulaire au cours des stades 13-14 (Mace & Tugores, 2004). Aucun lien de cause à effet entre ce phénotype et les défauts de migration axonale n'a cependant été établi à ce jour. Une perturbation des étapes en amont du stade 14 de l'embryogénèse, comme lors de la division des précurseurs neuronaux, ne peut également pas être exclue. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que *spen* semble avoir un rôle dans le contrôle de la prolifération des précurseurs des photorécepteurs au cours du développement de l'œil de drosophile (Lane et al, 2000; Staehling-Hampton et al, 1999). Des phénotypes similaires de fasciculation associés à des défauts de migration axonale ont également été observés au niveau de la commissure ventrale du système nerveux central (**Fig.17 B—D**) et des neurones moteurs au niveau des muscles dorsaux, avec un phénotype qui se traduit dans ce cas par un défaut d'innervation ou de formation de synapses neuromusculaires (Kuang et al, 2000).

Les défauts de migration axonale observés au niveau des neurones de la commissure ventrale et du système nerveux périphérique de l'embryon pourraient être dû à un effet autonome d'une perte de la fonction du gène *spen*, c'est-à-dire dû à un rôle de *spen* dans les neurones. Au cours de la croissance et migration axonale, des signaux répulsifs et attracteurs vont guider l'axone à sa cible. Ainsi, des molécules membranaires tels que les récepteurs Pléxines et leurs ligands : les Sémaphorines, Ephrines et Nétrines (Negishi et al, 2005), mais également les molécules d'adhésion cellulaire composées principalement de protéines attachées à la membrane par des ancrs glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) telles que la Fascicline I et II, la TAG1 et la N-CAM (Walsh & Doherty, 1991) jouent un rôle important dans l'axonogénèse et dans l'intégration de ces signaux extracellulaires par les neurones. Il n'est cependant pas possible d'exclure un rôle non-autonome de *spen*, c'est-à-dire dû à des modifications de l'environnement des neurones par l'absence de protéines Spen. Cette hypothèse est par exemple illustrée par la corrélation entre une augmentation de l'expression épidermique de la E-Cadhérine, une glycoprotéine importante pour l'adhésion cellulaire et le positionnement normal des neurones du système nerveux périphérique dans

un embryon de stade 16 (Mace & Tugores, 2004). Une seconde possibilité serait que cette perturbation de la migration et axonogénèse des neurones du système nerveux central (**fig.17**), soient dû à un défaut au niveau des cellules gliales de la commissure ventrale, également observé en absence de fonction du gène *spen* (Chen & Rebay, 2000; Kuang et al, 2000).

Au cours des stades 13 à 15 de l'embryogénèse, les axones des neurones de la commissure ventrale migrent selon l'axe longitudinal de l'embryon sans jamais le franchir (**fig.17. B**), tout en subissant des étapes successives de fasciculation (stade 13), de séparation (stade 14) et de re-fasciculation (stade 15) (**fig.17 A**). Ces événements sont entre autres dépendants des précurseurs des cellules gliales qui vont servir de guide aux axones durant leur migration (Stemerink & Jacobs, 1997). Dès le stade 13, les cellules gliales, qui sont d'environ 8 cellules par segment, vont subir des réarrangements le long de la commissure ventrale et voir leur nombre réduit à 3 cellules par segment par apoptose aux stades 16-17.

Au stade 13 d'un embryon dépourvu d'expression maternelle et zygotique du gène *spen*, Kuang *et al.* notent une augmentation du nombre de précurseurs des cellules gliales le long de l'axe longitudinal de la commissure ventrale, rappelant ainsi le phénomène observé pour les précurseurs des neurones lch (Kuang et al, 2000). Cette impression de cellules surnuméraires serait en réalité due à un défaut de migration et d'agglomération des cellules gliales, causant une répartition plus diffuse de ces cellules le long de la commissure ventrale (Chen & Rebay, 2000). En effet, Chen *et al.* dénombrent une quantité de précurseurs comparable aux embryons sauvages de stade 13. Ces précurseurs subissent néanmoins une réduction drastique et précoce de leur nombre à partir du stade 14 (Chen & Rebay, 2000). Ceci suggère que *spen* est nécessaire à la survie des cellules gliales de la commissure ventrale : un rôle également observé lors de l'élimination des cellules interomatidiales par mort cellulaire programmée, au cours de la morphogénèse de l'œil au stade pupal de la drosophile (Querenet et al, 2015).

Ce rôle de Spen dans la survie cellulaire au cours du développement neural semble être conservé chez les mammifères. En effet, une invalidation génétique conditionnelle du gène *mint* (homologue murin de *spen*) dans le système nerveux, au cours du développement chez la souris, révèle une hypoplasie du cerveau adulte associée à un retard général de croissance (Yabe et al, 2007). Ceci suggère que Mint pourrait être impliquée dans la survie neuronale, mais ne permet pas d'exclure un défaut de production de neurones matures au cours du développement. Cette fonction de Spen n'est cependant pas généralisable, comme le démontre l'absence de compétition cellulaire au cours du développement du disque d'aile chez la drosophile. En effet, la croissance de clones homozygotes pour un allèle mutant du gène *spen* est comparable à la croissance de clones sauvages (Mace & Tugores, 2004).

Des effets similaires sur la réduction drastique du nombre de cellules gliales ont été observés lors d'une surexpression du gène *argos*, un antagoniste de la voie de l'EGF-R/MAPK (Stemerding & Jacobs, 1997). De même, une absence d'activation du récepteur à l'EGF au niveau des cellules gliales va permettre une induction de l'apoptose, par la répression de l'inhibiteur de caspase Diap1 (diaphanous homolog 1) par la protéine HID (Bergmann et al, 2002). Cette perte de cellules gliales va avoir un impact sur la croissance axonale des neurones de la commissure ventrale (**fig.17 E**) (Stemerding & Jacobs, 1997) et n'est pas sans rappeler les phénotypes observés lors d'une perte de fonction du gène *spen* (**fig.17 B—D**) (Chen & Rebay, 2000; Kuang et al, 2000).

De manière intéressante, les embryons doubles hétérozygotes pour les allèles mutants des gènes *spen* et *pointed* (un effecteur de la voie EGF-R/MAPK) présentent des défauts de guidage axonal au niveau de la commissure ventrale, à l'inverse des simples hétérozygotes qui ont un phénotype sauvage aux stades 13 et 16 (Chen & Rebay, 2000). Une expression d'une forme constitutivement active de l'effecteur Ras dans les cellules gliales de la commissure ventrale supprime partiellement la létalité due à la surexpression d'une potentielle forme dominante négative de Spen (Chen & Rebay, 2000). Ces interactions épistatiques suggèrent une possible régulation du nombre des cellules gliales au cours du développement embryonnaire par Spen à travers la voie EGF/MAPK.

***spen* : un gène important pour le maintien de l'intégrité tissulaire**

D'autres phénotypes embryonnaires chez la drosophile ont pu être recensés, comme une altération du nombre et de la morphologie des cellules musculaires et des trachées (résultats non publiés de (Kuang et al, 2000)), mais également des malformations au niveau des pièces buccales et des sclérites thoraciques de l'embryon (Gellon et al, 1997; Wiellette et al, 1999).

Les pièces buccales de l'embryon font parties du squelette céphalo-pharyngien. Elles sont formées de plaques de Chitine⁴, également appelées sclérites. En absence d'expression maternelle et zygotique du gène *spen*, certaines sclérites céphaliques sont manquantes (Wiellette et al, 1999). La mise en place de celles-ci est entre autres orchestrée par le gène homéotique *Deformed*⁵. Aucun défaut d'expression de ce gène n'a été observé en absence de *spen*. La fonction du gène *spen* interviendrait en parallèle de la fonction de *Deformed* dans la détermination des appendices cuticulaires buccaux (Wiellette et al, 1999). De manière intéressante, ce phénotype n'est pas observé dans des mutants zygotiques ayant une expression maternelle de *spen* (Wiellette et al, 1999). Ainsi, sa fonction serait nécessaire à la formation de ces structures cuticulaires buccales avant le stade 12 de l'embryogenèse, stade où la présence de protéines Spen maternelles n'est plus observée (Kuang et al, 2000).

Des embryons dépourvus d'expression zygotique du gène *spen* présentent des sclérites ectopiques au niveau des segments thoraciques T2 et T3. Ce phénotype est reproduit dans le cadre d'une perte de fonction du gène homéotique *Antennapedia*⁶ (*Antp*). Il est également accentué dans les embryons doubles mutants *spen- Antp*- et est supprimé par une surexpression du gène *Antp*. Ces gènes ne semblent pas se réguler mutuellement d'un point de vue transcriptionnel, comme le montre l'expression des transcrits *spen* et *Antp* dans les mutants respectifs. Ces deux gènes semblent ainsi agir de manière parallèle dans la répression de l'apparition de sclérites ectopiques dans la région thoracique de l'embryon (Wiellette et al, 1999).

⁴ Polysaccharide présent notamment dans la composition de la cuticule des Arthropodes et de la carapace des Crustacés. La chitine est également un constituant de la chitosane, un bio polymère utilisé dans la production d'emballages (papier et carton sanitaires), de bio textile (textiles bactériostatiques), utilisé en Agriculture (traitements phytopathogènes) ou encore pharmaceutique (pansements, peaux artificielles, implants...).

⁵ Le gène *Deformed* est hautement similaire au gène HOXA4 chez les mammifères.

⁶ Le gène *Antennapedia* est hautement similaire au gène HOXA7 chez les mammifères.

Contrairement à ce qui était supposé lors de la découverte de ces sclérites ectopiques, c'est-à-dire une conversion de l'identité thoracique en identité céphalique (Wielllette et al, 1999), ces agglomérats de cuticules seraient en réalité dus à la formation de cicatrices cuticulaires, en réponse à une perte d'intégrité tissulaire (Mace et al, 2005).

Chez les insectes, la cuticule constitue une barrière protectrice du milieu extérieur. Elle agit entre autres comme une sorte de carapace pour prévenir des éventuelles blessures que le corps pourrait subir. Une perforation de l'épithélium embryonnaire résulte en une régénération tissulaire, marquée par une accumulation massive de sclérites : des cicatrices cuticulaires. En absence de *spen*, les sclérites ectopiques formées coïncident avec une blessure épithéliale laissant par exemple pénétrer les liquides du milieu extérieur dans la cavité embryonnaire. Elles corrént également avec une activation de l'expression des gènes de la réparation tissulaire. Par l'activation de la voie de l'EGF-R/MAPK, les facteurs de transcription Grainy head/GRH⁷ et Fos⁸ stimulent l'activation de gènes entre autres impliqués dans la formation de cuticule comme *ddc*⁹, pour « *dopa decarboxylase* » et *pale/DTH* codant une tyrosine hydroxylase (Kim & McGinnis, 2011; Mace et al, 2005; Pearson et al, 2009). Ceci suggère que le gène *spen* est important pour le maintien de l'intégrité tissulaire embryonnaire. L'origine de la formation de ces blessures dans un mutant *spen* ou *Antp*, ainsi que les signaux initiateurs de cette réponse sont toujours inconnus.

Spen et la régulation du cycle cellulaire au cours du développement de l'œil de drosophile.

L'étude du gène *spen* au cours de l'embryogénèse nous révèle une information intéressante sur sa fonction : il semble être important pour contrôler le nombre de cellules générées au cours du développement, et ce en régulant probablement la migration et la survie cellulaire sans pour autant pouvoir exclure une régulation de la prolifération cellulaire. L'implication du gène *spen* dans la régulation du nombre de cellules semble également être nécessaire au cours du développement de l'œil de drosophile. Celui-ci est

⁷ Trois homologues du gène *grh* sont présents chez les mammifères (*grh 1, 2 et 3*), où ils sont également impliqués dans la différenciation, la morphogénèse et la maintenance de l'intégrité épithéliale (Ting et al. 2005; Werth et al, 2010; Mlacki et al, 2014)

⁸ Le gènes de la famille *Fos* codent des facteurs de transcription capables de se dimériser avec les protéines de la famille JUN. De manière intéressante, un rôle cytoplasmique dans l'activation de la biosynthèse de glycerolipid a également pu être mis en évidence chez les mammifères (Caputto et al, 2014).

⁹ *Ddc* est une aromatic L-amino acid decarboxylase également impliquée dans le processus de mélanisation (Hiruma & Riddiford, 1985 ; Hiruma & Riddiford, 2009).

composé d'ommatidies : des unités structurales regroupant entre autres 8 photorécepteurs ou rhabdomères (les cellules R1—8). Ces derniers sont spécifiés de manière séquentielle au niveau des disques imaginaux de l'œil au cours du stade larvaire.

Une première vague de divisions mitotiques, au niveau du sillon morphogénétique (traduit de l'anglais « *Morphogenic Furrow* »), va permettre la sélection des précurseurs des photorécepteurs : les cellules intermédiaires. Le photorécepteur R8 va par la suite être le premier rhabdomère à être spécifié. Le recrutement successif des paires de récepteurs R2/R5, puis R3/R4 s'opère alors par l'activation de la voie de l'EGF-R. Les cellules voisines intermédiaires non spécifiées vont dans un second temps entrer dans une phase de divisions mitotiques. Paradoxalement, alors que la voie de l'EGF-R est nécessaire à l'entrée en phase mitotique des cellules intermédiaires non spécifiées au cours de la seconde vague de divisions, les photorécepteurs R2, R3, R4 et R5 sont maintenus en phase G1 grâce à l'activation de cette même voie (Baker & Yu, 2001). Le photorécepteur R8 est quant à lui, arrêté en phase G1 par le facteur Atonal, i§ de la voie EGF-R (Baker & Yu, 2001). Pour finir, les photorécepteurs R1/R6, puis R7 vont être générés. Cette dernière étape de spécification nécessite l'activation de la voie des MAPK. La spécification du photorécepteur R7 est également dépendante de l'activation de la voie Notch par le ligand Delta présent à la membrane des récepteurs R1 et R6 qui le juxtaposent.

Des ommatidies mutantes pour le gène *spen* se distinguent par une composition variable en photorécepteurs, qui se traduit dans la majorité des cas par une absence de photorécepteur R7 et occasionnellement d'autres types. La spécification du photorécepteur R8 ne semble cependant pas être affectée. Il n'est également pas impossible de voir la présence de photorécepteurs ectopiques, toutes classes confondues (Dickson et al, 1996; Doroquez et al, 2007). *Spen* est ainsi nécessaire à la mise en place des ommatidies au cours du développement de l'œil de drosophile.

Des ommatidies mutantes pour le gène *spen* présentent un phénotype proche de celui lié à une absence d'activation de la voie EGF-R/MAPK. En effet, une diminution de l'activation de la voie de l'EGF-R/MAPK se traduit par une absence de récepteur R7 chez l'adulte (Firth et al, 2000; Rebay et al, 2000; Therrien et al, 2000). Ce phénotype, induit par une mutation dans les effecteurs de la voie de l'EGF-R/MAPK, en aval de la GTPase Ras activatrice de la kinase Raf : Crokscrow, KSR (pour « *Kinase Suppressor of Ras* »), ou par une

activation constitutive du répresseur Yan, est accentué par une perte de fonction du gène *spen* (Firth et al, 2000; Rebay et al, 2000; Therrien et al, 2000). *Spn* pourrait ainsi avoir un rôle similaire à celui de la voie de l'EGF-R/MAPK au cours du développement de l'œil.

Comme nous venons de le voir, la voie des MAPK est à la fois nécessaire à la spécification des photorécepteurs et à leur maintien en phase G1 du cycle cellulaire. Son activation permet également la progression de la phase G2 en phase M des cellules non spécifiées du disque d'œil, pendant la seconde vague de division. Ainsi, on pourrait se demander comment se positionne l'action de *Spn* dans ces différentes étapes de régulation ? Une hypothèse serait que le gène *spen* régule la prolifération des cellules intermédiaires et/ou soit impliqué dans le maintien en phase G1 des photorécepteurs spécifiés R2, R3, R4 et R5. Par exemple, une perte de fonction du gène *spen* est suffisante pour rétablir l'entrée en phase S, ainsi que la progression de la seconde vague mitotique réprimées par une surexpression du facteur Dacapo (répresseur du complexe Cycline E/Cdk2). *Spn* se comporterait comme un répresseur de l'entrée en phase S en aval ou en parallèle du répresseur Dacapo, lors de la mise en place de la seconde vague mitotique dans le disque imaginal d'œil.

De même, une co-expression ectopique des gènes *dE2F* et *dDP* se traduit par la formation d'yeux rugueux chez l'adulte, associée à d'une augmentation du nombre de cellules intermédiaires en phase S lors de la seconde vague mitotique qui précède la spécification des photorécepteurs R1/R6 et R7. Ce phénotype est accentué par une mutation dans le gène *spen* à l'état hétérozygote (Staebling-Hampton et al, 1999), et n'est pas affecté par une mutation dans des gènes du cycle cellulaire comme la *cycline A*, *cycline B*, *cycline E*, *cdc2*, *cdc2c* et *string* (Staebling-Hampton et al, 1999). Ainsi, l'interaction génétique entre *spen* et les gènes *dE2F/dDP* ne semble pas être due à une dérégulation directe de ces facteurs du cycle cellulaire.

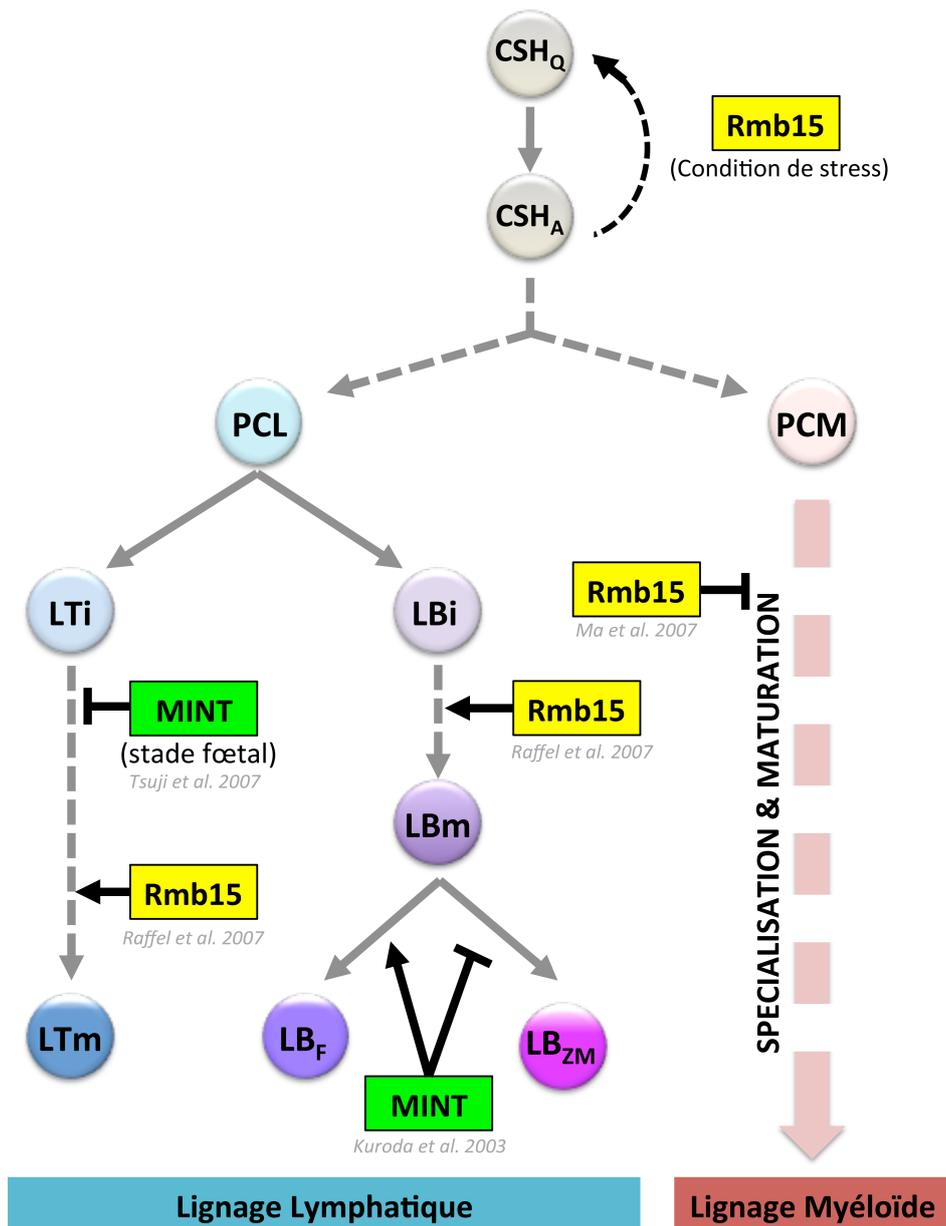


Figure 7. Schématisation de l'implication des protéines de la famille SPEN au cours de l'hématopoïèse. Représentation simplifiée du lignage hématopoïétique chez les mammifères. Les flèches noires à extrémité pointue représentent une fonction d'agoniste et les flèches noires à extrémité plate représentent une fonction d'antagoniste. Les Cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont présentes au sein de la moelle épinière sous deux états : en état de quiescence (CSH_Q) ou actif (CSH_A). Après activation, elles vont s'engager dans un processus de spécification pour générer un progéniteur commun lymphatique (PCL) à l'origine de la lignée lymphatique, et un progéniteur commun myéloïde (PCM) à l'origine de la lignée myéloïde. LTi : Lymphocyte T immature, LTm : Lymphocyte T mature. LBi : Lymphocyte B immature, LBm : Lymphocyte B mature, LB_F : Lymphocyte B Folliculaire, LB_{ZM} : Lymphocyte B de la zone marginale.

La nécessité du gène *spen* dans le maintien des photorécepteurs R2/R5 et R3/R4 en phase G1 et/ou leur spécification n'est cependant pas connue. En effet, bien qu'une mutation dans le gène *spen* accentue le phénotype d'yeux rugueux chez l'adulte causé par une expression ectopique de la Cycline E dans les cellules post-mitotiques, il n'est pas clair si ces effets sont dus à un effet d'une diminution de *spen* dans les photorécepteurs, ou à un effet additif lié à une perturbation de la seconde vague mitotique au niveau des cellules intermédiaires.

Spn et la détermination cellulaire

Chez les mammifères, les protéines de la famille SPEN jouent un rôle important au cours des différentes étapes de l'hématopoïèse. Au sein de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'adulte sont présentes à l'état de quiescence. Après activation, c'est-à-dire après stimulation de leur prolifération, ces CSH actives vont produire des cellules lymphoïdes progénitrices d'une part, et des cellules myéloïdes progénitrices d'autre part. Ces dernières sont respectivement à l'origine des lignées lymphoïdes et myéloïdes (**fig. 18**).

La protéine SHARP/MINT joue un rôle important pour la production de lymphocytes B folliculaires (Kuroda et al, 2003). Une fois sortie de la moelle osseuse, les lymphocytes B matures vont se spécialiser soit en lymphocytes B folliculaires, soit en lymphocytes B de la zone marginale (ZM). Au cours de ce processus, une inhibition de la voie Notch est nécessaire à la formation des lymphocytes B de type folliculaires (pour revue : (Lobry et al, 2014)). De manière intéressante, une absence de MINT dans des souris déficientes pour la production de lymphocytes T est à l'origine d'un biais de spécialisation en faveur des lymphocytes B de la ZM, au détriment des lymphocytes B folliculaires. Une fonction de MINT en tant qu'antagoniste de la voie Notch est ainsi suggérée dans la production de lymphocytes B de type folliculaires (Kuroda et al, 2003). Au cours de la maturation des lymphocytes T dans le Thymus au stade fœtal, MINT semble également limiter la production de lymphocyte T mature par l'inhibition de la voie Notch (Tsuji et al, 2007). En cohérence avec cette idée que MINT/SHARP agit comme un antagoniste de la voie Notch, une surexpression de SHARP est suffisante pour supprimer un phénotype lié à une surexpression de Notch au cours de l'embryogénèse du Xénope, suggérant ainsi une conservation chez les vertébrés de cette fonction de répresseur de la voie Notch.

L'homologue mammifère de la famille SPEN Rbm15 est lui aussi impliqué à plusieurs niveaux du processus d'hématopoïèse et a été associé aux leucémies aiguës mégacaryoblastiques, à travers la translocation $t(1;22)$ entre les gènes *RBM15* et *MLK* à l'origine d'une fusion transcriptionnelle et traductionnelle entre les deux gènes, (Mercher et al, 2001). Impliquée dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques adultes, la protéine OTT1/Rbm5 est essentielle au retour en quiescence de ces dernières après un stress réplicatif. Aucuns effets n'ont cependant pas été observés en absence de stress (Xiao et al, 2012). Dans un second temps, OTT1/Rbm15 participe à la mise en place du lignage lymphoïde, en réprimant la spécialisation des cellules progéniteurs myéloïdes (Ma et al, 2007). Au sein du lignage lymphoïde, OTT1/Rbm15 est nécessaire à la détermination du destin de « lymphocyte T » au cours de la spécialisation des progéniteurs communs lymphoïdes, et est nécessaire à la maturation des Lymphocyte B au sein de la moelle épinière (Raffel et al, 2007). Ces études du rôle de la famille SPEN au cours de l'hématopoïèse démontrent l'importance de ces protéines dans les processus de spécification et détermination cellulaires. Cette fonction de Spen dans la détermination des cellules hématopoïétiques semble être conservée chez *D. melanogaster*. En effet, en plus de générer un défaut de la réponse immunitaire, une absence de Spen est à l'origine d'une augmentation de la population d'hémocytes et d'une diminution de celle des cellules Crystals, deux des trois types de cellules hématopoïétiques chez la drosophile (Jin et al, 2008). Dans ce système, Spen agirait comme un agoniste de la voie Notch en participant à l'activation de ses gènes cibles de manière globale (Jin et al, 2009).

III. Spen à la croisée de multiples mécanismes moléculaires

Une interface entre la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression génique

Comme nous venons de le voir, la protéine Spen chez la drosophile semble être impliquée dans des processus cellulaires clés comme la survie cellulaire, le guidage axonal, la migration, la décision ou encore la prolifération cellulaire au cours du développement. Les mécanismes moléculaires régulés par Spen au sein de ces processus cellulaires sont néanmoins peu connus et ce, probablement dû à sa taille de 600 kDa qui constitue un challenge technique pour une étude de ses fonctions moléculaires. Les études structurales et fonctionnelles des domaines de ses orthologues, de même que de leurs interactions moléculaires ont permis d'en apprendre davantage sur les fonctions moléculaires associées à la famille de protéines SPEN (Arieti et al, 2014 ; Ariyoshi & Schwabe, 2003 ; Mikami et al, 2013 ; Mikami et al, 2014). Ces analyses font entre autres ressortir l'idée d'une famille de protéines servant de plateformes protéiques, permettant le regroupement de différents complexes en un même locus (**fig. 19**). Ce concept d'interface moléculaire est notamment mis en perspective avec les travaux de Malovannaya et ses collaborateurs en 2011. Au cours de cette étude, ils ont pu mettre en évidence que la protéine SHARP chez les mammifères, n'était pas un constituant central d'un complexe protéique défini, mais un composant pouvant interagir avec trois complexes majeurs de la régulation de l'expression génique (Malovannaya et al, 2011) : 1) le complexe Médiateur, régulateur de la transcription dépendante de la polymérase II (Poss et al, 2013), 2) le complexe de Co-répression HDAC/NCOR SMRT liant ainsi SPEN à la répression transcriptionnelle liée aux modifications des marques d'histones et 3) le complexe de facteurs d'épissage WTAP (« *Wilm's tumor 1 associated protein* ») impliqué dans la régulation l'épissage des ARNm. De ce fait, et comme nous allons le voir par la suite, les protéines de la famille SPEN semblent être associées à des fonctions moléculaires variées, allant de la régulation de la transcription à celle de la biogénèse des ARN et de leur devenir post-transcriptionnel.

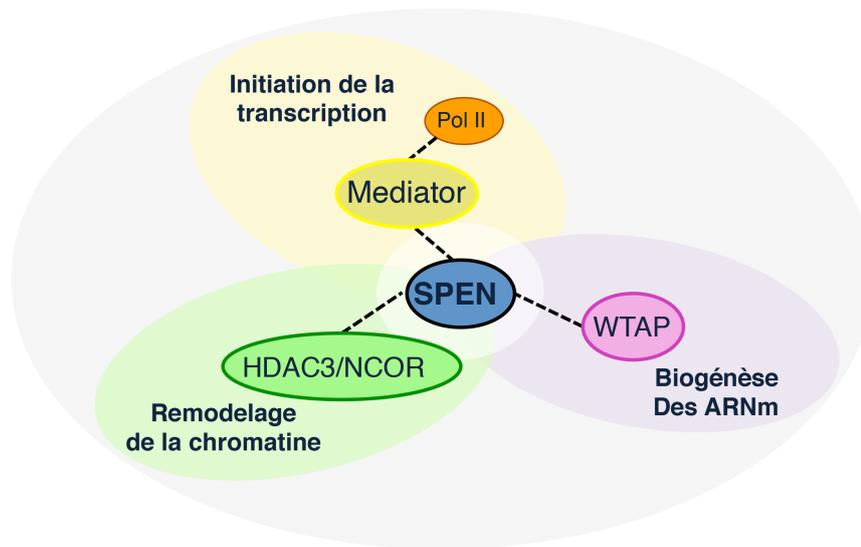


Figure 19. Interactions de SHARP/Spen chez les Mammifères. SHARP/Spen est un facteur à l'intersection de trois processus majeurs de la régulation de l'expression génique : la régulation de la transcription en interagissant avec le complexe Médiateur, les modifications post-traductionnelles des marques d'histone par ses interactions avec des facteurs de remodelage de la chromatine, et pour finir la biogénèse des ARN messagers en interagissant avec des facteurs de l'épissage (Malovannaya et al, 2011).

Une plateforme d'interaction pour les acides nucléiques et les protéines.

(i) Les domaines RRM de la famille SPEN

Le domaine RRM est l'un des domaines protéiques les plus abondant chez les Eucaryotes. Au sein des protéines de la famille SPEN, les domaines RRM sont localisés dans une région N-terminale conservée, organisée en deux modules structuraux : un premier est constitué d'un domaine RRM, et le second, structurellement conservé au cours de l'évolution, est composé des deux autres domaines RRM (Arieti et al, 2014). La prédiction d'un quatrième domaine RRM chez l'orthologue mammifère SHARP a également été proposée (**fig. 14**). Dans le cadre de la protéine FPA, orthologue chez *A. thaliana*, cette organisation est inversée : le module de deux domaines RRM précède le domaine RRM isolé (Arieti et al, 2014) (**fig.14**). Ce second module de paire de domaines RRM de la protéine SHARP se révèle être nécessaire à une association stable *in vitro* avec de l'ARN simple et double brin, mais également avec des structures secondaires d'ARN de type épingle à cheveux riches en UG, comme celle de l'ARN non-codant (ARNnc) *SRA* (Arieti et al, 2014), un activateur transcriptionnel des gènes cibles des récepteurs à hormone. L'interaction entre SHARP et *SRA* permet ainsi l'inhibition de l'activité de l'ARNnc *SRA*.

De manière intéressante, SHARP interagit avec le répresseur SMRT et les protéines du complexe répresseur NuRD (pour « *Nucleosome Remodeling Deacetylase complex* »), dont les protéines HDAC1 et 2, MTA2, MBD3 et RbAp48 (Ariyoshi & Schwabe, 2003 ; Mikami et al, 2013; Shi et al, 2001). Ce complexe est également impliqué dans la répression des gènes cibles des récepteurs nucléaires (Shi et al, 2001). Un model serait que SHARP réprime l'action de *SRA* au niveau des promoteurs de ses gènes cibles en permettant le recrutement de complexes répresseurs et de modificateurs de la chromatine (Colley & Leedman, 2009). La présence de l'ARNnc *SRA* au sein du complexe répresseur SMRT/HDAC n'a cependant pas été mise en évidence à ce jour. Il n'est également pas impossible d'exclure un mode d'action de SHARP dans l'inactivation de *SRA*, indépendante de son action de corépresseur des gènes cibles des récepteurs à hormone au sein du complexe SMRT/HDAC. De même, dans ce contexte, l'impact d'une absence de SHARP sur les modifications des marques d'histones n'a pas été testé.

SHARP interagit également avec l'ARN non-codant *Xist*, un élément clé de l'inactivation du chromosome X au cours de la spécification des cellules souches embryonnaires murines (Chu et al, 2015 ; McHugh et al, 2015; Moindrot et al, 2015; Monfort et al, 2015). Cette interaction est dépendante du domaine répété A ou « *A-repeat* » de *Xist* (Chu et al, 2015), un élément qui serait potentiellement formée de quatre structures d'ARN en tête d'épingle de type AUCG (Duszczuk et al, 2011). Plus précisément, SHARP, ainsi que ce ses partenaires SMRT et HDAC3 sont nécessaires à la mise en place d'un environnement de répression transcriptionnelle, permettant notamment l'exclusion de la Polymérase II et le recrutement des protéines du complexe répresseur Polycomb 2 (PRC2) (McHugh et al, 2015).

La présence de domaines RRM est généralement associée à la régulation des ARN. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'homologue SPEN FPA contrôle la formation de l'extrémité 3' des transcrits *fpa* et des ARN anti-sens du locus *flc* en s'associant à la chromatine au niveau des sites de polyadénylation régulés (Horniyk et al, 2010). La démonstration de l'implication des protéines de la famille SPEN dans la régulation de l'épissage alternatif est quant à elle plus indirecte (Wang et al, 2010). En effet, chez *Caenorhabditis elegans*, la quantité de récepteurs au glutamate dans les interneurons est dépendante de l'activité de l'homologue de type RBM15, GRLD-1. Une absence de GRLD-1/Rbm15 est corrélée à une diminution de l'expression du récepteur au glutamate (GluR), causant ainsi une perturbation du comportement associé à une pression appliquée au niveau du « nez »¹⁰. Ce phénotype peut être sauvé par la co-expression d'un transgène présentant la séquence codante du gène codant le GluR, mais pas par un transgène présentant la séquence génomique du gène. La maturation de l'ARN pré-messager du GluR semble être défectueuse en absence de GRLD-1/Rbm15 (Wang et al, 2010). De manière intéressante, ce phénotype est également sauvé par une surexpression de la partie N-terminale, dépourvue de domaine SPOC de la protéine GRLD-1/RBM15, suggérant une implication des domaines RRM dans la maturation de l'ARN pré-messager *GluR*. Ainsi GRLD-1/Rbm15 semble réguler post-transcriptionnellement l'expression du GluR chez *C. elegans*.

¹⁰ Le comportement associé à une pression appliquée au niveau du « nez », ou « *nose-touch behavior* » fait référence à la réaction de recule de l'animal générée à la suite d'une légère pression sur son « nez » (Kaplan and Horvitz, 1993).

Bien que le domaine RRM soit principalement décrit comme un domaine de liaison aux ARN, des interactions protéiques et avec l'ADN ont également été mises en évidence. C'est le cas par exemple des domaines RRM de la protéine MINT, homologue murin de Spen, qui lient des séquences d'ADN simple brin riches en nucléotides dG et dT *in vitro*. Ils lient également la région d'ADN double brin de la séquence de l'élément de réponse au FGF (« *Fibroblast growth factor* ») située en région promotrice du gène codant l'Osteocalcine *in vitro* et *in vivo*. Ceci, en parallèle de tests fonctionnels, met en avant une fonction de MINT dans la régulation transcriptionnelle de l'expression génique (Newberry et al, 1999).

(ii) Le domaine SPOC au cœur des interactions protéiques

Le domaine SPOC des protéines de la famille SPEN est impliqué dans les interactions de type protéine-protéine. Il aurait par exemple la capacité de s'homodimériser, comme le montre des expériences de double hybride et tests d'interactions physique *in vitro* (Li et al, 2005). Ceci expliquerait les effets de dominance négative observés lors d'une surexpression du domaine C-terminal de la protéine Spen chez la drosophile (Lin et al, 2003).

Au sein de la protéine SHARP, ce domaine est suffisant à l'interaction avec le corépresseur SMRT (Ariyoshi & Schwabe, 2003 ; Mikami et al, 2013; Shi et al, 2001). Cette interaction est cependant très faiblement établie avec les domaines SPOC des protéines de la famille SPEN de type RBM15 : OTT1/RBM15 et OTT3/RBM15b (Hiriart, 2005). Le domaine SPOC de la protéine OTT1/RBM15 est néanmoins nécessaire à son interaction avec l'histone méthyl-transférase Set1b (Lee & Skalnik, 2012), impliquant OTT1/RBM15 au même titre que la protéine SHARP dans des processus nécessitant l'interaction avec des facteurs du remodelage de la chromatine.

Bien que hautement conservés, les domaines SPOC des protéines de la famille SPEN présentent certaines diversités fonctionnelles au niveau du type de partenaires protéiques fixés. Les protéines OTT1/RBM15 et OTT3/RBM15b, à l'exception de SHARP, interagissent par l'intermédiaire de leur domaine SPOC avec des facteurs nucléaires d'export des ARNm :

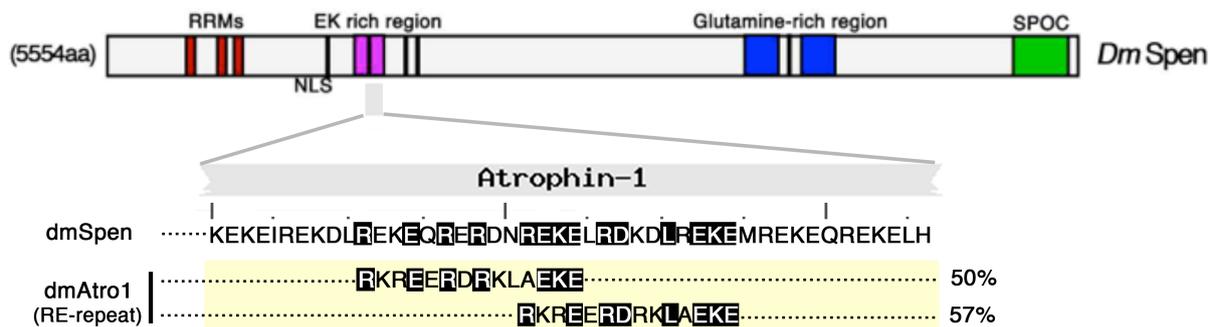


Figure 20. Prédiction d'un domaine de type Atrophin "RE-Repeat" dans la séquence protéine de Spen chez *D. melanogaster*. La région riche en acide Glutamique et Lysine (« EK rich region », en rose) de Spen chez *Drosophila melanogaster* présente une forte similitude avec le domaine de type Atrophin-1 (en jaune). Les pourcentages sont indiqués à droite des séquences en acides-aminés de la protéine Atrophin-1 (dmAtro1). Les autres domaines de Spen sont également représentés : « RNA Recognition motifs » (RRMs) en rouge, la région riche en Glutamine (« Glutamine-rich region ») en bleu et le domaine SPOC (« *Spen paralog and ortholog C-terminal* ») en vert.

NXF1 et DBP5, illustrant l'implication de ces protéines dans la régulation du transport des ARNs (Hiriart, 2005 ; Uranishi et al, 2009 ; Zolotukhin et al, 2009).

Pour finir, malgré son appellation « *Split-ends Paralog and Ortholog C-terminal* » suggérant une présence exclusive de ce domaine dans les protéines de type SPEN, le domaine SPOC est retrouvé au sein de protéines extérieures à la famille SPEN (Sanchez-Pulido et al, 2004) : les protéines de type DIDO-1, pour « *Death inducer-obliterator 1* ». Elles sont associées à la régulation de l'apoptose et à certains cancers. Cette famille de protéines ne présente pas de domaines RRM, mais des domaines associés à la régulation de la transcription tels que les domaines de type PHD (« *Plant Homeodomain* »), TFIIIS (« *Transcription Factor S-II* ») ou BRK (« *BRM and KIS domain* ») (Sanchez-Pulido et al, 2004). Les protéines SPEN sont associées à la régulation de la survie cellulaire comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi, compte tenu de la présence d'un domaine SPOC dans la famille des protéines DIDO-1, il est tentant de spéculer sur l'implication du domaine SPOC dans ces processus de mort programmée. A ce jour, aucun lien entre Spen et les protéines de la famille des protéines DIDO-1 n'a été mis en évidence.

(iii) La prédiction d'une région riche en acide Glutamique et Lysine et d'une région riche en Glutamine chez Drosophila melanogaster.

La prédiction de régions conservées au sein de la protéine Spen chez *Drosophila melanogaster* met en évidence la présence de régions riche en acide Glutamique et Lysine (région EK-riche) d'une part et riche en Glutamine (région Q-riche) d'autre part. Ces séquences ne semblent pas être partagées par les autres protéines de la famille SPEN (**fig.20**) (Wiellette et al, 1999).

La présence d'une région EK a été mise en évidence et caractérisée chez les mammifères, au sein du facteur d'épissage SRp86. Cette protéine appartient à la famille des SR protéines, contenant des domaines riches en Serine et Arginine (SR). SRp86 module l'activité de certaines SR protéines (Barnard & Patton, 2000). Alors qu'elle agit comme un régulateur positif de l'épissage en présence de la protéine SRp20, SRp86 inhibe *in vitro* et *in vivo* l'épissage de sites spécifiques assuré par les facteurs ASF/SF2, SC35 et SRp55. Cette

fonction d'inhibiteur serait conférée par la région EK (Li J. et al, 2002). L'implication de Spen dans la régulation de l'épissage des ARNm n'a pas été démontrée chez *Drosophila melanogaster* à ce jour.

De manière intéressante, un blast de la région EK de Spen prédit la présence d'un domaine de type Atrophin-1. Plus précisément, un alignement entre la région EK de Spen avec la protéine Atrophin révèle une identité de 50/57% avec une région riche en acide Glutamique et Lysine, également appelée « *RE-repeat* » (**fig. 20**). La fonction de ce domaine RE-repeat est cependant inconnue. Les Atrophines sont des protéines conservées au cours de l'évolution, décrites comme des co-répresseurs transcriptionnels (Zhang et al, 2002). Elles ont notamment été impliquées dans la modulation de la signalisation des récepteurs nucléaires (Wang & Tsai, 2008). Elles interagissent également avec les HDAC1/2 et histone méthyltransférase G9a, impactant ainsi sur les marques d'histone chez les mammifères et la drosophile (Wang et al, 2008; Wang et al, 2006; Zoltewicz et al, 2004). Du fait de la présence d'une région polyQ, les protéines Atrophin sont également associées à des maladies neurodégénératives liées à une expansion anormale des répétitions CAG (Napoletano et al, 2011; Suzuki & Yazawa, 2011).

La présence de régions riches en Glutamine est associée à la régulation de la transcription (Freiman & Tjian, 2002). Cette fonction est conservée au cours de l'évolution, des levures aux mammifères (Atanesyan et al, 2012; Escher et al, 2000). On les retrouve majoritairement au sein des facteurs de transcription tels que GAL11 (chez *S. cerevisiae*), Prospero (chez *D. melanogaster*) (Bettencourt et al, 2007), Sp1 ou encore l'Ataxin-3 (chez les Mammifères) (Freiman & Tjian, 2002; Matos et al, 2011).

(iv) La présence d'un domaine de liaison à la protéine RBPj au sein des protéines SPEN chez les mammifères.

La présence d'un domaine de liaison à la protéine RBPj/Su(H) (domaine RID) chez les homologues mammifères de SPEN (**fig. 14**) suggère une fonction des protéines SHARP/MINT dans la régulation de la voie Notch. Il a notamment été démontré *ex vivo* dans des cellules de mammifères en culture, que les protéines SHARP et MINT répriment transcriptionnellement l'expression des gènes cibles de la voie Notch, dont l'activité de promoteur du gène *Hairy/Enhancer of split (HES)-1* (Kuroda et al, 2003; Oswald et al, 2002). Cette fonction est dépendante d'une activité HDAC suggérant le model selon lequel SHARP de pair avec le complexe de co-represseur des HDAC, seraient recrutés au niveau des protéines RBPj présentes aux promoteurs des cibles de la voie Notch, entraînant ainsi leur inhibition transcriptionnelle (Oswald et al, 2002; Oswald et al, 2005). Cette interaction entre SHARP et RBPj/Su(H), est dépendante du domaine de liaison à la protéine RBPj/Su(H) (domaine RID) de SHARP/MINT (**fig. 14**) (Kuroda et al, 2003; Li et al, 2005; Oswald et al, 2002; VanderWielen et al, 2011). De manière intéressante, bien que la protéine Rmb15 soit décrite au cours de l'hématopoïèse comme un antagoniste de la voie Notch, il semble que cette fonction soit dépendante du type cellulaire. En effet, des testes d'expression dépendant du domaine intracellulaire du récepteur Notch au moyen d'un gène rapporteur de l'activité de la voie Notch, révèlent que Rbm15 stimule l'activation de la voie Notch dans des lignées cellulaires en culture d'origine hématopoïétique (cellule 32DWT18), et à l'inverse réprime cette même expression dans des cellules non-hématopoïétiques (cellules CHO) (Ma et al, 2007).

Bien que ce domaine ne semble pas être présent chez la drosophile, différents rôles de la protéine Spen dans la régulation de la voie Notch ont pu être mis en évidence. Spen agirait par exemple comme un répresseur de la voie au cours du développement de l'aile de drosophile, comme le suggère la suppression du phénotype lié à une haplo-insuffisance du gène *notch* par une mutation dans le gène *spen* à l'état hétérozygote dans l'aile adulte (Doroquez et al, 2007). A l'inverse, Spen se présente comme un activateur de la voie Notch dans le développement de la glande lymphatique chez *D. melanogaster*. En effet, Spen participerait à l'activation des gènes cibles de Notch dans les cellules de type hémocytes. Ceci est corrélé avec une perte de la marque d'histone H3K4me3 associée aux promoteurs « actifs » (Jin et al, 2009).

MATERIELS & METHODES

Dissection, Fixation au paraformaldéhyde (PFA) et Immuno-marquage des intestins adultes de drosophile

Solutions :

PBS 1X

PBS 1X, PFA 4%

PBT = 0,1% Triton X100 in PBS 1X

PBS 1X, 50% glycérol

DAPI 1µg/ml final

Dissection et fixation :

- Dissection réalisée dans des coupelles en verre.
- Disséquer 10 à 20 femelles par génotypes dans une solution de PBS 1X. Ne garder que les intestins attachés aux ovaires et à un bout de cuticule postérieure.
- Fixer les intestins pendant 2h dans du PBS-PFA 4% à température ambiante.
- Enlever le PFA, puis laver avec une solution de PBT.
- Enlever les ovaires et cuticules, puis couper le tissu au niveau des cellules Cu²⁺ pour ne garder que la partie postérieure.
- Incuber les intestins coupés dans une solution de PBS 1X, 50% glycérol, pendant 30min-1h à température ambiante.
- Rincer avec une solution de PBT. La levure présente dans la lumière intestinale est expulsée par choc osmotique. Enlever à l'aide des pinces l'excédant de levure.
- Rincer avec une solution de PBT

Immuno-marquage :

- Les anticorps primaires sont préalablement dilués dans une solution de PBT à la concentration désirée.
- Incuber les intestins 4h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C.
- Enlever la solution d'anticorps primaires et rincer les intestins 3X 15-20min avec une solution de PBT.
- Réaliser la solution d'anticorps secondaire extemporanément dans du PBT. Centrifuger les dilutions et les transvaser dans un nouveau tube avant de les mettre en contact avec les intestins.
- Incuber 3 à 4 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière.
- Enlever la solution d'anticorps secondaire et rincer les intestins 3X 15-20min avec une solution de PBT.
- Pendant le dernier lavage, ajouter une solution de DAPI (1µg/ml final).
- Après le dernier lavage dans la solution de PBT-DAPI, incuber les intestins dans une solution de PBS 1X, 50% glycérol au minimum 30min à température ambiante avant la mise entre lame et lamelle des intestins. Une fois dans la solution de PBS 1X, 50% glycérol, les intestins peuvent être stockés à 4°C et être montés sur lame ultérieurement.

Mise entre lame et lamelle :

- Mettre une goutte de 50µl de milieu de montage sur une lame et y déposer les intestins à l'aide des pinces de dissection.
- Les laisser décanter pendant au moins 30min à température ambiante.
- Déposer ensuite la lamelle et celer au vernis.

Fixation au méthanol des intestins adultes de drosophile

Les procédures de dissection et d'immuno-marquage se référer au protocole de fixation au paraformaldéhyde.

Préparation des tubes avant dissection :

- 3ml PBS-EGTA 50mM (Cf=25mM)
- 3ml Heptane (solvant organique)
- 300ul Formaldéhyde 35-40% (Cf=2%)

Procédure :

- Mettre un agitateur proche de la hotte.
- Numéroter les tubes et les mettre dans l'ordre de la dissection.
- Disséquer pendant 5-10min dans une solution de PBS 1X, garder les ovaires.
- Regrouper les intestins et les transférer dans la bouteille.
- Les mettre sous agitation latérale pendant 15min à température ambiante.
- Enlever Formaldéhyde 4%, PBS-EGTA (phase inférieure), puis ajouter le méthanol. Les intestins devraient alors couler dans la phase inférieure.
- Enlever ensuite la phase supérieur d'heptane pour ne laisser que la solution de méthanol.
- Mettre sous agitation pendant 15 min, à température ambiante. A cette étape, ne pas laisser les intestins plus d'1 heure.
- Réhydrater les intestins progressivement avec une solution de PBT. On passe ainsi d'une solution de 25%-PBT-75% méthanol à une solution de 100% PBT.
- Bien rincer au PBT.

Dissection, Fixation et Immuno-marquage des disques imaginaux de larves de drosophile

Solution :

PBS 1X

PBS 1X, PFA 4%

PBT0.2% = PBS1 X, Triton X100 0,2%

PBT 0,2%, BSA = PBS 1X, Triton X100 0,2%, BSA 1%

PBS1X, Glycérol 50%

Induction des clones mitotiques :

Dés l'apparition de larve L2, réaliser un choc thermique de 1h à 37°C le matin et un second le même jours dans l'après-midi.

Dissection :

- Récupérer des larves L3 et les plonger dans une solution PBS 1X.
- Les couper en deux à l'aide des pinces à dissection.
- Pincer la larve au niveau de l'appendis buccale et la retourner « à la manière d'une chaussette » le long de la pince.
- Eliminer les glandes salivaires et les corps gras.

Fixation:

- Baigner les larves retournées dans une solution de PBS 1X, PFA 4% pendant 20min à température ambiante.
- Rincer avec une solution de PBT0.2%.

Immuno-marquage :

- Incuber les disques imaginaux avec une solution de PBT 0,2%, BSA pendant 10min à température ambiante.
- Ajouter ensuite les solutions d'anticorps primaires préalablement dilué dans du PBT 0,2%, BSA, et incuber 2h à température ambiante ou 4°C sur la nuit.
- Laver avec une solution de PBT 0,2%, BSA 3 fois pendant 5 min
- Ajouter ensuite les solutions d'anticorps secondaires préalablement dilué dans du PBT 0,2%, BSA. , et incuber 1h à température ambiante ou 4°C sur la nuit.
- Laver avec une solution de PBT 0,2%, BSA 3 fois pendant 5 min. Ajouter le DAPI lors du dernier lavage (concentration finale : 1µg/ml).
- Pour finir, incuber les disques dans une solution de PBS1X, Glycérol 50%, avant le montage entre lame et lamelle.

Détacher les disques avant de les monter sur lame.

Purification de Chromosomes Bactérie (BAC)

Solutions : *Chaque solution est stérilisée par filtration.*

• **P1 Buffer :** qsp 50mL

50mM Tris pH8 = 2,5ml 1M Tris pH8

10mM EDTA = 1ml 0,5M EDTA

100mg/ml RNase (à ajouter

extemporanément

Stockage 4°C

• **P3 Buffer :** qsp 100 mL

3M KoAc pH5,5 = 29,44g KoAc

[soit 60ml KoAc 5M]

5,75ml glacial acetaic acid

Stockage 4°C

• **P2 Buffer :** qsp 50mL

0,2N NaOH = 2 ml NaOH 5N

1% SDS = 2,5 ml 20% SDS

Stockage température ambiante

Procédure :

- Réaliser une culture bactérienne de 5-10 ml sur la nuit.
- Centrifuger le lendemain cette culture 10-20 min à vitesse maximal. [Crucial step]
- Re-suspendre le culot bactérien dans 320µl de Solution P1 .
- Puis rajouter 320µl de solution P2 et mixer doucement par inversion [Ne pas Vortexer !]
- Laisser incuber à température ambiante, ne pas dépasser les 5min.- Ajouter 450µl de solution P3. Une solution de Sodium Acetate 3M, pH 5,5 peut également être utilisée à la place.
- Mixer par inversion 4-6 fois.
- Incuber sur glace 10min.
- Centrifuger 10-25 min à 13,000 rpm (~17,900 x g) à 4°C.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter 750µl d'isopropanol froid et mettre le mixe quelque minute à -20°C.
[Can stop here]
- Centrifuger 10-25 min à 13,000 rpm (~17,900 x g) à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Rincer le culot avec 300µl d'éthanol à 75% 2 à 3 fois.
[étapes importantes pour éliminer les sels, nucléotides]
- Sécher le culot à 65°C pendant 10min [Ne pas trop sécher l'ADN]
- Re-suspendre dans 30µl d'eau [Ne pas utiliser de Tris EDTA]
- Incuber 30min à 37°C [do not over-dry it, as DNA is difficult to resuspend].

Utiliser 1µl par électrolocation. Diluer en cas d'arc électrique.

Un ajout de la RNaseA en fin d'extraction contamine l'ADN avec des ribonucleotides libres. Ne pas quantifier au nanodrop, préférer une quantification de la concentration sur gel d'agarose. Pour une solution d'ADN pure, faire une extraction au phenol chloroform.

Production de Bactéries ElectroCompétantes

Les souches bactériennes SW102 sont utilisées pour l'étape de clonage par recombinaison de la technique du Recombeneering. Elles doivent être maintenue à 30°C car la recombinaison est induite à 37°C !

Matériel:

Glace

200ml ddH₂O froide stérile (4°C)

350ml de Glycérol 10% stérile froide (4°C) (Peut être stérilisé par filtration)

Prè-refroidir dans la glace 4-6 falcons de 50ml en fonction du volume de culture utilisé.

Préparer 10ml de culture bactérienne sur la nuit à 37°C (ou 30°C si les souches bactériennes le nécessitent)

- Inoculer 5ml de culture dans 250ml de LB (1/50)

- Laisser pousser à 37°C jusqu'à l'obtention d'une OD₆₀₀ = 0,6

(à 30°C OD₆₀₀ atteinte au bout de 3h)

Il est important qu'à partir de cette étape tout soit à 4°C.

- Mettre les erlen dans la glace 10min, puis transférer les cultures dans des *falcons* de 50ml prè-refroidis.

- Centrifuger à 3500 rpm, 10-15min, 4°C enlever le surnageant

- Re-suspendre les culots dans 1ml ddH₂O froide (4°C) par vortex

- Compléter à 50ml avec du ddH₂O froid (4°C)

- Centrifuger à 3500 rpm, 10-15min, 4°C enlever le surnageant

- Re-suspendre les culots dans 1ml ddH₂O froide (4°C) par vortex

- Compléter à 25ml avec du ddH₂O froid (4°C)

- Centrifuger à 3500 rpm, 10-15min, 4°C enlever le surnageant

- Re-suspendre les culots dans 1ml du glycérol 10% froid (4°C) par vortex

- Compléter à 5ml avec du glycérol 10% froid (4°C)

- Transférer dans des eppendorf 2ml

- Centrifuger 14000 rpm, 30 sec, 4°C, enlever le surnageant

- Ajouter 450 µl de glycérol 10% froid (généralement 200µl glycérol 10% pour 100µl de culture)

- Plonger les tubes dans une solution de carboglace/Et-OH100% pour les congeler.

- Stocker à -80°C

FACS Isolation & Purification of Drosophila intestinal cells for RNA sequencing

Ce protocole a été développé dans le laboratoire. Pour des raisons d'accessibilité linguistique, il a été rédigé en anglais.

Adapted from:

Edgar Lab : Dutta D, Edgar, BA. (2013) FACS isolation of major cell type from drosophila intestine. Current Protocols

Montell Lab: Wang X, et al. (2008) Purification of specific cell populations from Drosophila tissues by magnetic bead sorting, for use in gene expression profiling Protocol Exchange

Knoblich Lab: Berger C et al. (2012) FACS purification and transcriptome analysis of drosophila neural stem cells reveals a role for Klumpfuss in self-renewal. Cell reports 2: 407-418. Harzer et al. (2013) FACS purification of Drosophila larval neuroblasts for next-generation sequencing, Nature Protocols 8(6):1088-99.

#1 - Dissociation & Cell sorting

Materiel:

- BD Falcon 12x75 mm Tube with 35µm or 70µm nylon mesh Cell-Strainer Cap (BD Biosciences, #352235)
- Sorting performed on FACS Aria, 20psi, 100µm nozzle.

Reagents:

- PBS 1X
- PBS 1X, BSA 1%
- Cell dissociation buffer (sigma C1544)
- Elastase stock 4X (sigma E0258): C=4mg/ml used for dissociation at Cf=1mg/ml.
for 5mg Elastase powder add 1,25ml Cell dissociation buffer.
Aliquot of 25ul stock solution, store -20°C. 25µl = 1 reaction with 35 guts.
- Fetal Bovine Serum (Life Technologies)
- TRIzol LS reagent (Invitrogen).

Comments:

- 1 day before dissection put the flies in tubes without yeast. It will reduce the amount of debris during FACS sorting.
- Dissect midgut from w- , and mono colors (only RFP and only GFP expressing flies) for FACS set up and auto-fluorescence control.
- It is preferable to use either female or male as mixing both could skew the transcriptome profiles due to gender specific variations.
- Keep the total time of dissection to less than 2h.
- For RNA isolation, one genotype should be dissected at a time.
- Before starting passing the solution of PBS-BSA through all the tubes and glass pipettes might help to avoid cells sticking to dried surfaces.

Using this protocol, around 100ng total RNA were collected per 100 000 sorted cells.

Procedure:

Dissection time estimation: 35guts/30min

- 1) Prepare Elastase at Final concentration = 1mg/ml in Cell dissociation buffer.
- 2) Dissect flies in PBS. Remove malpighian tubules, the proventriculus, crops and the anus.
- 3) Transfer every 10 guts in to a 1,5ml tube containing about 200µl PBX 1/placed on ice.
- 4) After 30 min of dissection, do a second round of 35 guts dissection transferred in a new tube.

Digestion & dissociation time estimation: 1h30-2h

- 5) Spin down the guts briefly and remove PBS.
- 6) Add Elastase at Cf= 1mg/ml.
- 7) Incubate tubes for 1h at 30°C in a heat block with shaking at 600rpm.
At 37°C cells tends to aggregate even after filtering.
- 8) Mixe every 15min by pipetting up and down using P200, at least 30-40 times to dissociate the tissue fully.
- 9) Centrifuge the dissociated cells for 20min at 300g at 4°C.
- 10) Re-suspend pellet in 500µl fresh PBS-BSA solution for sorting.
- 11) Filter dissociated cells using 35µm (for diploid cells) and 70µm (for EC ad VM) nylon mesh cell strainer cap to remove clumps.
- 12) Maintain cells throughout at 4°C.

Alternatives:

- *Collagenase Type IV (1mg/ml) can also be used. The efficiency of elastase was found to be higher and more living cells could be obtained, particularly for flies expressing membrane GFP.*
- *The time and agitation for EC and VM dissociation should be increased in case clumps are still seen even after 1hour.*
- *500µl of 0.5% Trypsin-EDTA, with 30min incubation was used by Dutta et al. and S.Hou Lab. Some how, with this method, Hoescht can be incorporated well in cells.*

FACS cell sorting Time estimation for : 2h

FACS parameters: → Low pressure soting : FACS Aria, 20psi, 100µm nozzle.

- To account for auto-fluorescence, set gates using cells from w- flies and then the single color cells.
- DAPI (100µg/µl final) can be used to discriminate dead cells.
- Cells are directly sorted in *TRizol LS reagent (Invitrogen)*.
Use 750µl Trizol ~100 000 cells
- After sorting, kept on ice while other samples are running
- Then pipette vigorously up and down several times the TRizol LS/Cell mix, and transfert it in eppendorff.
- Store at 80-°C until RNA purification.

#2 – RNA extraction for sequencing

Phenol extraction

- Sample are in 750µl Trizol at -80°C
- Add 200µl Chloroform, mix and wait 5min RT

- Centrifuge 20min, 4°C 12 000rpm.
- Take out the aqueous phase.
- Add 200µl Chloroform/Iso Amine Alcohol (24 :1) mix and wait 5min RT.
- Centrifuge 20min, 4°C 12 000rpm.
- Take out the aqueous phase.

Precipitation

- Add : 2µl P-carrier (to use instead of glycogen for sequencing purpose)
 - 1/10 Vol. NaAC3M pH = 5.5
 - 1 Vol. Isopropanol
- Mix well. Leave at -20°C 30min, or -80°C Over Night.
- Centrifuge 1h 4°C max speed.
- Wash with 200µl Et-OH 75%, centrifuge 2min 4°C max speed.
- Repeat last step 3 times.
- Dry pellet.
- Add 41,5µl H₂O (qsp 50µl).

DNase treatment

DNase treatment of RNA is required to avoid false positives in downstream applications

- Add : 5µl DNase Buffer 10X
 - 1µl DNase
 - 2,5µl RNaseOUT (40U/µl) [40U in 20µl]
- 37°C, 30min

Repeat Phenol extraction and Precipitation steps.

- Re-suspend pellet in 20µl H₂O

-Qubit measurement :

For ~100 000 ISCs => 3-4ng/µl

For ~100 000 EBs => 6-8ng/µl

We used the Illumina TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Kit

- Sample concentration : 100ng in 50µl H₂O
- RIN : 7.

NOTE : RNA integrity were determined by Bioanalyseur. Sample sent for sequencing should have RIN around 7 (ANNEXE) (Winnebeck et al, 2010).

See Annexe for details on Bioinformatics analysis.

RESULTATS

Partie I.
Spen, un nouveau régulateur des cellules souches intestinales,
chez *Drosophila melanogaster*.

I. Résumé de la première partie

La découverte des cellules souches intestinales chez *Drosophila melanogaster* a offert au domaine de la biologie des cellules souches, un nouveau modèle d'étude alliant les outils génétiques de la drosophile à une étude des cellules souches adultes et de leurs interactions avec leur environnement physiologique *in vivo*. L'étude de ce modèle s'est en partie tournée vers la caractérisation des réseaux de signalisations du contrôle homéostatique des propriétés d'auto-renouvellement et de spécification des cellules souches, mais également lors de changements environnementaux majeurs (infections, restrictions alimentaires, morts cellulaires, vieillissement). Du fait de son lignage cellulaire simplifié, l'effort de recherche est également tourné vers la caractérisation de nouveaux facteurs de la régulation des cellules souches *in vivo*. Ce travail doctoral s'inscrit directement dans cet effort commun de caractérisation de nouveaux facteurs.

Ce projet de thèse découle directement du crible génétique mis en place par Allison Bardin avec la précieuse aide de Carolina Perdigoto (C.P., F.S., A.B., *non-publié*). Celui-ci a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans l'homéostasie des cellules souches intestinales de *Drosophila melanogaster*, dont le gène *split-ends/spen*. Ce gène code une protéine possédant des domaines de liaison aux ARNs et un domaine SPOC (« *Spen Paralog and Ortholog C-terminal domain* ») décrit pour être impliqué dans des interactions protéiques. Mon travail de thèse fut de décrire le rôle de *spen* dans la régulation du lignage intestinal en combinant une quantification des marqueurs et caractéristiques fonctionnelles des cellules souches, avec une analyse des effets d'une déplétion ciblée de *spen* dans les différents types cellulaires. J'ai pu mettre en évidence que *spen* joue un rôle dans les cellules souches pour conférer deux destins distincts à l'issue de la division des cellules souches, et ainsi limiter leur production dans le tissu comme le montre l'accumulation de cellules souches observée lors d'une perte de fonction du gène *spen*. Dans ces conditions, le mode de division symétrique des cellules souches semble être favorisé par rapport au mode de division asymétrique qui est majoritaire dans un tissu sauvage à l'état homéostatique. Comment *Spn* participe-t-il à la régulation des cellules souches adultes ? En d'autres termes, quels sont les mécanismes dépendants de l'activité de *spen* à l'origine de la détermination du mode de division de ces cellules ?

Dans leurs environnements, les cellules souches sont régulées par un ensemble de voies de signalisation extrinsèques et de mécanismes intracellulaires. Ainsi, une première question a été de tester si cette accumulation de cellules souches n'était pas due à un défaut d'activation du signal primaire de spécification des cellules souches, la voie Notch. J'ai pu ainsi montrer que *spen* n'était pas nécessaire à l'activation de cette voie, et que son action pouvait être impliquée dans des événements soit en amont, soit en parallèle de l'activation des gènes cibles de Notch. Une seconde hypothèse était de tester si cette accumulation de cellules souches en absence de fonction du gène *spen* n'était pas due à une prolifération aberrante de ces cellules, les empêchant ainsi de sortir de leur cycle et donc de se spécifier. Pour cela, la capacité proliférative de ces cellules mutantes pour le gène *spen* a été diminuée par une déplétion de l'activité de la voie Insuline. Cette voie est impliquée dans le contrôle de l'auto-renouvellement des cellules souches aussi bien dans un contexte homéostatique, que de stress. J'ai ainsi pu montrer que d'une part, *spen* et la voie de l'Insuline interagissaient génétiquement dans le contrôle de la prolifération de cellules souches, et d'autre part, que cette régulation de la prolifération était indépendante du défaut de spécification des cellules souches mutantes pour le gène *spen*. En effet, bien que moins prolifératives, ces cellules souches effectuent majoritairement des divisions symétriques à l'origine de leur accumulation.

L'identité cellulaire se définit entre autres par l'expression des gènes (transcrits et protéines) à l'origine des fonctions moléculaires, cellulaires, et physiologiques de la cellule. Ainsi, une perturbation de cette expression génique refléterait d'une manière indirecte les processus contrôlés par *spen* dans les cellules souches. Ma stratégie a ainsi été de mettre en place un protocole de purification spécifique par FACS des cellules souches intestinales d'une part et de cellules Entéroblastes d'autre part, afin d'acquérir un panorama de l'expression de leurs transcrits dépendante de la fonction de *spen*, par séquençage de leurs ARN. Cette approche a été pour moi l'occasion de me former et ainsi de réaliser l'analyse de ces données de séquençage à haut-débit des ARN. Que nous dit l'expression de ces transcrits sur les processus affectés par une perte de fonction du gène *spen* ?

Spen se révèle être un facteur important pour la régulation de gènes impliqués dans des processus moléculaires et cellulaires précis (biosynthèse des protéines ancrées aux glycosyl-phosphatidylinositol, réponse immunitaire, ou encore la respiration cellulaire), mais ne semble pas contrôler directement l'expression de gènes codant des composants canoniques des voies de signalisation, ni leurs gènes cibles.

II. Article : Spen limite l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales

Intestinal stem cell self-renewal is limited by Spen

Mahéva Andriatsilavo^{1,2,3}, Carolina N. Perdigoto⁴, Patricia Skorski^{1,2,3}, Francois Schweisguth⁵, Allison J. Bardin*^{1,2,3}

1. Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris F-75248, France.

2. CNRS UMR3215, Paris F-75248, France.

3. INSERM U934, Paris F-75248, France.

4. Current address: Black Family Stem Cell Institute, Department of Developmental and Regenerative Biology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

5. Institut Pasteur, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France; CNRS, URA2578, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France.

*Correspondence: allison.bardin@curie.fr

Abstract

Adult stem cells maintain tissue homeostasis by supplying differentiated cells while at the same time self-renewing. A precise regulation of this switch between stem cell state and differentiated state is thus essential/crucial, while a perturbation can lead to hypo- and hyperplasia-related diseases. Here the adult *Drosophila* intestine is used to study molecular mechanisms that balance. We report the identification of the *split-ends/spen* gene as a novel regulator of intestinal stem cells that control this switch. *SPEN* family genes encode conserved RNA recognition motif-containing proteins that are reported to have a role in RNA biogenesis and stem cell regulation. We show that its loss of function in stem cells results in an abnormal increase in the number of stem cell-like cells associated to an increase of proliferation. These data suggest that Spen acts as a stem cell regulator important for the repression of self-renewal and for the enhancement of the stem cell commitment. To get further in Split-ends molecular function, we have investigated the molecular signature of intestinal stem cells and progenitor cells knockdowned for *spen*, by developing a two-color FACS sorting approach combined with an mRNA sequencing analysis. Here, we provide a new function of *spen* in adult stem cell regulation in the *Drosophila* intestine, which may also shed light on its mode of action in other developmental contexts.

Introduction

While many cell types, from prokaryotic cells to human cells, can self-renew, the ability to both self-renew and produce differentiated daughters with more restricted fate is limited to stem cells. In *Metazoa*, this dual competence of stem cells allows the production of diverse differentiated cell fates during embryonic development thereby creating an adult organism with distinct biological functions compartmentalized in different organs and tissues. Furthermore, stem cells present in adult tissues renew differentiated cells and promote tissue regeneration in response to wounding. Defining the mechanisms governing stem cell self-renewal and differentiation is therefore important for understanding both organism development as well as tissue maintenance and regeneration. Moreover, identifying genes and pathways critical for these processes provides potential therapeutic targets for regenerative medicine.

Efforts over the past 50 years have demonstrated the important role of cell intrinsic pathways as well as cell extrinsic niche and systemic factors in controlling self-renewal and differentiation. Evidence from many stem cell model systems has demonstrated that self-renewal and differentiation require the coordinated activities of cell-cell signaling pathways such as the Notch, Wnt, EGFR, Jak/Stat and Jnk pathways, among others. In addition, cell type-specific transcription factors govern many aspects of stem cell potential. These studies have largely relied on the identification of genes or pathways uncovered by transcriptional profiling of stem cells or through targeted candidate approaches. Importantly, the use of *Drosophila melanogaster* models of stem cell biology has allowed for forward genetic screening to identify genes in an unbiased manner that are required to control stem cell properties. Indeed, this has allowed the discovery of such novel and conserved stem cell control mechanisms as the asymmetric segregation during cell division of cell fate determinants (Knoblich et al, 1995) and histones (Tran et al, 2012), the piRNA pathway (Cox et al, 1998), and niche signals (Xie & Spradling, 2000) (Kiger et al, 2001) (Tran et al, 2000). In particular, a genetic approach is critical in identifying factors that are essential for proper stem cell regulation, but which also play additional, important roles in other cell types and may therefore be broadly expressed, precluding identification by a stem cell specific transcriptome profiling approach. Indeed, important roles in stem cells for transcriptional regulators and chromatin modifying enzymes have identified (Buszczak et al, 2009) (Xi & Xie, 2005) (Eun et al, 2014) (Eroglu et al, 2014).

A new model for stem cell biology was established in 2006 with the demonstration through lineage tracing studies that multipotent stem cells were present in the adult *Drosophila* midgut (intestine) (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Intestinal stem cells (ISCs) were shown to self-renewed and produce post-mitotic daughter cells called enteroblasts, which can further terminally differentiate into enterocytes (ECs) and enteroendocrine cells (EEs) (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006) (**fig. 1A**). As the intestine is directly exposed to the external environment, this model system has been useful to identify signaling pathways required in response to various damaging agents and to understand how these pathways work together in a multicellular context. A complex network of cell signaling pathways including Hippo, Jnk, Jak/Stat, EGFR, p38, Insulin, Bmp, and Wnt coordinate stem cell activation leading to a stem cell regenerative response after gut epithelial damage caused by environmental insults such as pathogenic bacteria,

oxidative stress, DNA damage, and abrasive agents (Amcheslavsky et al, 2009; Biteau et al, 2008; Buchon et al, 2009a; Buchon et al, 2009b; Chatterjee & Ip, 2009; Choi et al, 2008; Cordero et al, 2012a; Cordero et al, 2012b; Ha et al, 2009; Jiang et al, 2011, Ren, 2010 #434; Jiang et al, 2009; Ren et al, 2015; Shaw et al, 2010; Staley & Irvine, 2010; Tian et al, 2015). While modulation of these signaling pathways can clearly induce stem cell proliferation, their effects on stem cell fate specification and symmetric cell fate acquisition are less well established.

In contrast, Notch signaling occurring between stem cell sisters clearly has an essential role in determining stem cell self-renewal and differentiation status (Bardin et al, 2010; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Inactivation of Notch signaling in a single stem cell leads to the clonal expansion of the number of dividing cells expressing Delta as well as Sanpodo (also expressed in ISCs (Perdigoto et al, 2011)). It is thought that Delta-Notch signaling between sister cells leads to one cell with active Notch that will become an enteroblast and another cell where Notch has not been activated that remains a stem cell. Furthermore, the Notch active enteroblast will acquire EC fate whereas the EE cell seems to be generated independently of Notch signaling, perhaps through direct differentiation of the ISC (Biteau & Jasper, 2014; Zeng & Hou, 2015). Bmp signaling has also been demonstrated to inhibit Notch signaling in the ISC and therefore influence its self-renewal (Tian et al, 2015). In addition to Bmp signaling, Insulin signaling is important in young flies to promote symmetric stem cell division and expansion of the stem cell pool during the first week of adult life (O'Brien et al, 2011) and seems to regulate Notch signaling via mir305 (Foronda et al, 2014). Thus, while much is known about pathways and signaling influencing ISC proliferation status, control of ISC fate and specification is less well understood.

In an EMS-based genetic screen, we have identified the gene *split-ends* (*spen*) as an important regulator of *Drosophila* adult intestinal stem cells required to limit their specification. The Spen family of proteins is broadly conserved in plants and Metazoa. Spen family proteins have RNA binding domains (RRM) and a conserved C terminal domain, the SPOC domain (**fig. 1B**) (Kolodziej et al, 1995; Newberry et al, 1999; Wiелlette et al, 1999). Spen proteins have been shown to be important for transcriptional and post-transcriptional control of gene expression. One mammalian ortholog, SHARP (also known as MINT) binds to nuclear hormone receptors as well as the Notch signaling component RBPJk/ CSL and

recruits HDAC activity to silence gene expression (Kuroda et al, 2003; Oswald et al, 2002; Shi et al, 2001). Interestingly, the RNA recognition motifs (RRM) of SHARP have been found to bind to two long non-coding RNAs, the steroid receptor coactivator RNA (SRA) involved in nuclear hormone receptor mediated transcription (Shi et al, 2001), and XIST, required for silencing of the X chromosome during X-inactivation (Chu et al, 2015; McHugh et al, 2015; Minajigi et al, 2015). Consistent with an important role of the RNA interaction in mediating gene silencing, the SHARP RRM domain is required for binding to SRA and silencing of SRA target gene (Arieti et al, 2014; Shi et al, 2001); similarly, SHARP's interaction with XIST is required for X-inactivation (Chu et al, 2015; McHugh et al, 2015; Minajigi et al, 2015). In addition to functions in transcriptional silencing, the plant Spen family protein, FPA, regulates RNA 3' formation via polyadenylation site selection and cleavage (Duc et al, 2013; Hornyik et al, 2010);(Lyons et al, 2013). Other Spen family proteins have been implicated in splicing control (Hiriart, 2005; Wang et al, 2010). Consistent with roles in splicing as well as transcriptional regulation, IP-mass spectrometry analysis found interaction of Spen with components of the Mediator complex and spliceosome (Malovannaya et al, 2011).

Spen family members play diverse roles in development, crosstalking with several signaling pathways depending on the tissue context. In *Drosophila*, *spen* has been found to promote EGFR signaling in the eye and developing embryo, to inhibit Notch signaling in the eye and hematopoietic system, and to promote Wnt signaling in the wing disc (Chen & Rebay, 2000; Doroquez et al, 2007; Kuang et al, 2000; Lin et al, 2003) (Jin et al, 2009). In murine hematopoietic stem cells, the Spen family member Ott1 is required for quiescence following stress (Xiao et al, 2012). However, roles of Spen family proteins in adult stem cells are not well understood.

Here we show that Spen plays an essential role in adult intestinal stem cells acting to limit their production. We found that clonal inactivation of *spen* leads to stem lineages that are much larger than wild-type lineages and contained extra stem cell-like cells expressing multiple stem cell markers and capable of cell division. In addition, *spen* mutant ISCs showed high levels of Delta protein expression and ectopic localization to the cell surface membrane. Despite these defects, *spen* mutant stem cells were still capable of terminal differentiation into both enteroendocrine and enterocyte cells. Our results suggest that *spen* activity is required in the stem cell and that Spen acts to limit ISC fate specification. Comparing RNAseq of wild-type and *spen* mutant ISCs, we identify genes regulated by *spen* that likely

act in a combinatorial manner to regulate ISCs. Importantly, our work identifies a novel regulator of ISCs, provides insight into regulation of cell fate acquisition in the adult intestine, and elucidates the role of a *Spen* family member in adult stem cells.

Results

***spen* limits intestinal stem cell number in the adult midgut.**

In order to identify important regulators of stem cell proliferation, self-renewal and differentiation, we conducted an EMS-based genetic screen using the Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker technique (Lee & Luo, 1999) to generate homozygous clones of candidate mutations on chromosome arm 2L (C.P., F.S., A.B., unpublished). Homozygous clones of lines 9E34 and 9C95 showed an increase in the number and the density of diploid cells in the adult intestine. This suggested a possible effect on intestinal stem cells (ISCs), which are one of the diploid cell populations in the adult intestine. Lines 9E34 and 9C95, were mapped using deficiencies to the same genomic region and both failed to complement each other and with previously identified alleles of gene *split-ends* (*spen*), *spen*⁵ and *spen*³. Sequencing of *spen*^{9E34} (found in this screen) and *spen*⁵ (Kuang et al, 2000) identified nonsense mutations leading to putative truncated proteins encoding 631 amino acids and 2827 amino acids proteins respectively (**fig. 1B**).

In order to further investigate how *spen* affects the ISC lineage in the *Drosophila* posterior midgut, we used previously described markers of ISCs to assess the effect on stem cell fate. First, we examined the expression of Delta (DI) (Ohlstein & Spradling, 2007) in *spen*⁵ and *spen*^{9E34} mutant stem cell clones (**fig. 1C-E**). Both alleles had a similar phenotype: 5 days (d) after heat shock (AHS), wild-type stem cell clones contained 1 DI+ ISC (n=136 clones), representing 17.7% of the cells per clone (**fig. 2C**). In contrast, *spen*⁵ mutant stem cell clones contained a significant increase in the number of DI+ cells per clone, having 13 DI+ cells per clone on average (n=92, p<0,0001; **fig. 1C-F**), comprising 41.2% of the total cell type clonal composition (**fig. 2C**). The phenotype of *spen*^{9E34} and *spen*^{9C95} was similar. In addition, this phenotype was rescued upon insertion of a transgenic BAC construct containing the *spen* wild-type genomic region (**fig. S1A-F**) and reproduced when clones expressed a *spen* RNAi (*KK-108828* VDRC, **fig. S1G-H**). Thus, inactivation of *spen* leads to an accumulation of DI+ ISC-like cells. Consistent with *spen* leading to increased numbers of stem cells, the DI+ cells in

spen mutant clones also expressed another stem cell marker, Sanpodo (Spdo) (**fig. S11-J**) (Perdigoto et al, 2011). Furthermore, the Notch receptor, which marks both ISCs and the EB daughter cells (Ohlstein & Spradling, 2006), was expressed in the DI+ *spen* mutant cells (**fig. S1K-L**). In addition, like wild-type ISCs, DI+ *spen* mutant cells lacked Notch pathway activation as detected by NRE-LacZ (for Notch Responsive Element, also called *Su(H)GBE-LacZ* reporter expression (Furriols & Bray, 2001) (**fig. 2A-C**) (Micchelli & Perrimon, 2006). Thus, *spen* mutants accumulate DI+ cells that share additional features with wild-type stem cells. We also note that the level of DI protein in *spen* mutant ISC-like cells is higher and more strongly localized to the plasma membrane than in wild-type stem cells (**fig. 1C-E**), reminiscent of the upregulation of DI that occurs upon inactivation of *neur* and *E(spl)* (Bardin et al, 2010; Ohlstein & Spradling, 2007). Together, this suggests that *spen* limits ISC production.

An important defining characteristic of ISCs is their ability to divide. Indeed, they are thought to be the only dividing cell type in the adult intestine. We then asked whether DI+ cells in *spen* mutant clones could proliferate by examining the mitotic marker: phospho-Histone H3 (pH3+). Wild-type clones rarely contained a dividing ISC, with 3.4% of clones having a PH3+ cell (n=87 clones, **fig. 1J**). In contrast, we observed 21.3% of *spen* mutant clones having at least 1 PH3+ cell (n=108, p<0.0001) and 0.6% of clones with many clones having more than DI+ cell undergoing mitosis. Moreover, *spen* inactivation led to larger clones than wild-type (6.7 cells per wild-type clone [n=136 clones] to 27 GFP+ cells per *spen* mutant clone [n=92 clones, p<0.0001], **fig 1.I**), consistent with an increase in stem cell numbers upon *spen* inactivation. Altogether our data indicate that inactivation of *spen* results in larger clones composed of excess numbers of ISC-like cells suggesting that Spen is required to limit the number of ISCs.

We then assessed whether the terminal differentiation was affected upon *spen* inactivation. The ISC renews two types of terminally differentiated cells enteroendocrine cells (EE), which are secretory cells expressing the transcription factor Prospero (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006), and Enterocytes (EC) that are polyploid absorptive cells (nucleus >7µm), which express the marker Pdm1 (Lee et al, 2009). At 5 d AHS, wild-type clones contained 3.3 ECs and 0.6 EEs per clone on average (n= 48 clones, **fig. 1I-I',K**). Similarly, *spen* mutant clones contained both types of terminally differentiated cells with 4.9 ECs and 0.7 EEs per clone, with no bias toward one of the two differentiated cell

types (n=66 clones, **fig. 1J-J',L**). However, as there was an increased numbers of ISC-like DI+ cells per clone, the proportion of EC population in *spen* clones was nevertheless decreased (from 54% of ECs in wild-type, [n=54], to 35% in *spen* mutant clone, [n=34]; p<0.0001, Graphic not shown). The proportion of EE cells in the population was not significantly altered (9.2% of EEs in wild-type, [n=54], and 5.8% [n=34], p=0.12, Graphic not shown). Thus, terminally differentiated cells were produced in absence of *spen* function.

spen controls early stem cell commitment events.

spen could limit ISC numbers by promoting asymmetric cell fate outcome of the stem cell divisions in a direct manner, acting on regulators of cell fate. Alternatively, *spen* could influence cell fate indirectly via limiting the proliferation of undifferentiated stem cells. To investigate a putative function of *spen* in controlling cell fate *per se*, we asked whether *spen* may influence the Notch signaling pathway, which plays an essential role in limiting the specification of ISCs and EE cells (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Our previous work has shown that lowering, but not completely inactivating, Notch signaling can increase numbers of ISCs without impacting EE and EC cell numbers (Perdigoto et al, 2011). Therefore, we explored the possibility that *spen* may control stem cell number through promoting Notch signaling. While a link between Spen family proteins and Notch signaling has previously been demonstrated, it was shown to inhibit, Notch signaling in several developmental contexts (Doroquez et al, 2007; Kuroda et al, 2003; Oswald et al, 2002).

Nevertheless, we tested whether Spen may be required for Notch signaling in the gut. We first examined whether *spen* is strictly required for activation of Notch signaling activity, using a reporter of the Notch pathway, *NRE-LacZ* (for Notch Responsive element, also called *Su(H)-GBE-LacZ*) and found that *spen* mutant cells can still activate the Notch pathway (**fig 2. A-A', B-B'**). Therefore, *spen* is not absolutely required for Notch signaling in the intestine, consistent with the fact that *spen* mutant clones produce correct numbers of EE cells, which are present in abnormally high numbers when Notch signaling is abrogated. However, we cannot rule out that *spen* may enhance Notch signaling but not be required for it. Therefore, we tested a putative role for *spen* in Notch signaling in the peripheral nervous

system in the development of the sensory organ precursor lineage as well as in the follicle cells of the ovary and found no evidence for a general role of *spen* in Notch signaling (**fig. S2**)

While *spen* mutant ISC-like cells can still produce Notch active EB progenitor cells and terminally differentiated progeny, it is possible that stem cells accumulate in *spen* mutants because of a delay in commitment resulting in less progenitors relative to the number of stem cells. Therefore, we quantified the relative number of NRE-LacZ⁺ EB cells compared to DI⁺ ISC-like cells in *spen* mutants. Wild-type clones contained on average 1.9 diploid NRE-LacZ⁺ EBs (n=54 clones), representing 19% of the total cells. *spen* mutants similarly contained 1.9 diploid NRE-LacZ⁺ EBs (n=34), representing 17.6% of the total cells (**fig. 2C**). Therefore, while wild-type ISCs produced on average 1.3 NRE-LacZ⁺ cells (n=39), *spen* mutant ISC-like cells produced a significantly reduced amount of NRE-LacZ⁺ cells (on average 0.7 NRE-LacZ⁺ cells per DI⁺ ISC cells, n=33, p=0.0043, **fig. 2D**), suggesting a defect in commitment of these cells (**fig. 2D**). Thus, in wild-type, asymmetric cell fates are generated after most of stem cell divisions; [O'Brien et al. 2011; de Navasquez et al. 2012; McLeod, 2010] whereas in *spen* mutants, ISC division more frequently leads to symmetric stem cell fate acquisition. These data suggest that *spen* affects stem cell commitment and impacts asymmetric cell fate outcome of ISC divisions.

As *Spn* family members have been implicated in transcriptional regulation, it is possible that *spen* acts to promote reliable activation of Notch target genes either directly or indirectly. If *spen* is required for the activation of Notch target genes, the expression of activated Notch would have no effect in *spen* mutants. On the other hand, if *spen*'s role is upstream of activation of Notch or in a parallel process, expression of active Notch would likely drive the differentiation of *spen* mutant DI⁺ ISC-like cells into ECs. Therefore, to further explore this we expressed an activated form of the Notch receptor in *spen* mutant clones (**fig. 2 E-J**). When activated Notch is expressed in wild-type stem cell, it forces them to differentiate directly into ECs generating 1 or 2 cell clones (Ohlstein & Spradling, 2006) (**fig. 2E-F, G-H**). In *spen* mutant clones, we found that constitutive expression of an active Notch receptor (*UAS-N^{Act}*) was sufficient to suppress the ISC-like cell accumulation (from 4.8 Delta⁺ cells per *spen* clones, n=60, to 0.05 Delta⁺ cells per *spen UAS-N^{Act}* clones, n=95 ; p<0.001) and to drive EC differentiation resulting in smaller clones, (p<0.001, **fig. 2 E-F, I-J**), consistent with a role of *spen* upstream or in parallel to Notch activation. Stem cells can thus respond to Notch pathway activation and differentiate in absence of *spen*. We conclude that *spen* is

not essential for Notch target gene activation. Altogether, our data suggest that *spen* controls early events in stem cell commitment, prior to or in parallel to Notch nuclear activity, allowing proper generation of two distinct daughter-cell cell fates

Spen's role in stem cell fate is independent of proliferation.

As *spen* acts upstream or in parallel to Notch activation during ISC commitment, it is possible that it may influence ISC proliferation, which could indirectly influence ISC numbers. We therefore wanted to test whether lowering the proliferation status of *spen* mutant cells could restore the correct cell fate decisions. The Insulin pathway regulates ISC proliferation via systemic insulin-like peptides (Amcheslavsky et al, 2009; Biteau et al, 2010; O'Brien et al, 2011; Wang et al, 2011). We thus tested whether a decrease in Insulin signaling activity could suppress the ISC accumulation observed upon *spen* inactivation using AKT^{RNAi} , which targets a downstream component of the Insulin pathway. Clonal AKT^{RNAi} knockdown 6 days AHS mildly reduced proliferation in wild-type (from 8.9 GFP+ cells per wild-type clones, n=61, to 5.2 GFP+ per AKT^{RNAi} clones, n=74, **fig.3A,B,E**), though this difference was not statistically significant. In a *spen* mutant background, however, AKT^{RNAi} was sufficient to greatly reduce clone size (from 20.4 GFP+ cells per *spen* clones, n=72, to 6.5 GFP+ cells per *spen* AKT^{RNAi} clones, n=51, $p < 0.0001$, **fig.3C,D,E**). In addition, ISC number per clone was significantly decreased in *spen* mutants upon AKT knock-down (from 9.6 DI+ cells per clone in *spen*, n=72, to 2.5 DI+ cells per clone in *spen* AKT^{RNAi} , n=51, $p < 0.0001$, **fig.3A-B**, graph not shown). However, despite the reduction in total DI+ cell per clone, ISC-like cells represented an abnormally high percent of the clonal cells, reaching the same clonal proportion as upon *spen* loss-of-function (44.5% in *spen* clones, n=72 and 37.5% in *spen* AKT^{RNAi} clones, n=51, $p < 0.0005$; **fig.3F**), indicating that a cell fate defect still occurred despite reduced division rates. Thus, we conclude that ISC accumulation upon *spen* inactivation is not primarily due to an increase in ISC proliferation rate.

***spen* activity is required in stem cells to control their fate.**

To investigate in which cell type *spen* function is required to control intestinal stem cell production, we conditionally expressed a *spen* RNAi in a cell-type specific manner using the TARGET system (McGuire et al, 2004). The downregulation of *spen* simultaneously in both ISCs and EBs using the *esg-GAL4*, *tub-GAL80^{ts}* line (*esg^{ts}*), led to accumulation of DI+

ISC-like cells 10 days after *spen*^{RNAi} expression induction (**Fig4.A-B**). Interestingly, already 2 days after *spen*^{RNAi} expression, we could observe an effect on the stem cell marker DI, which was more enriched at the membrane and in vesicles than in wild-type stem cells (**Fig5.A ; FigS1**). Thus, the enrichment of DI at the plasma membrane appeared prior to the increase in number of ISC-like cells which was detected in later timepoints only (**figS4**). These phenotypes could be due to cell autonomous activity of *spen* in the stem cells or to a non-autonomous role of *spen* in EB cells that leads to DI accumulation and ISC cell fate defects in neighboring ISCs. To discriminate between these hypotheses, we specifically expressed *spen*^{RNAi} either in the ISCS, using the *esg-GAL4, NRE-GAL80 tub-GAL80^{ts}* line (*esg^{ts}, NRE-GAL80*; **fig4. C-D**) or in the Notch active EB cells using the *NRE-GAL4, tub-GAL80^{ts}* line (*NRE^{ts}*; **fig4. E-F**). Expression of *spen RNAi* in ISCs but not NRE+ EBs reproduced the phenotypes of clonal inactivation of *spen*. Thus, we conclude that *spen* function is required in the stem cells but not in the NRE+ EBs to regulate stem cell production in the intestine.

Identification of *spen*-dependent transcripts by RNAseq

Spn family members play diverse roles in RNA regulation, including transcriptional control, splicing regulation, polyadenylation site choice and transcript cleavage. In order to better characterize Spn's molecular function and identify Spn-regulated genes that may contribute to adult stem cell regulation, we performed transcriptome and differential splicing analysis on FACS sorted intestinal stem cells or EB cells expressing *spen*^{RNAi}. First, we developed a two-color FACS sorting approach to sort ISCs and EBs (NRE+ cells). We used the *esgGal4, Gal80ts* system to express *spen*^{RNAi} in both ISCs and EBs along with a RFP to mark these cell populations. The EBs were further discriminated using an NRE-GFP. Thus, ISCs were RED only and Notch active EBs were RED and GREEN. Wild-type and *spen*^{RNAi} ISCs and EBs were sorted by FACS (**fig. 5A**) and sequencing of RNAs was performed. In order to determine the initial and more likely direct gene transcripts regulated by *spen*, we performed RNAseq after 2 days of *spen*^{RNAi} expression (**fig. 5B**).

In order to validate our RNAseq protocol, we first analyzed differential gene expression between sorted wild-type stem cells and wild-type EB cells (**fig. 5C**). Among the 185 differentially expressed (DE) genes identified with a False Discovery Rate (FDR) of 0.05 (DEseq2 analysis, (Love et al, 2014)), known ISC markers and cell cycle related-genes were

upregulated in ISCs: *polo* (Amcheslavsky et al, 2011), *Cdc2* (Amcheslavsky et al, 2011), *Delta* (Ohlstein & Spradling, 2007), *sanpodo* (Perdigoto et al, 2011), *charlatan* (Amcheslavsky et al, 2014). Gene Ontology terminology (GO term) analysis revealed stem cell-associated cellular processes (Zeng et al, 2015) such as cell cycle (M phase/Cytokinesis), (post-) transcriptional regulation, signal transduction (Kinases, Receptor activity protein, Secretory peptides, GTPase activity) and trafficking (Endocytosis/Secretion) enriched in ISCs, whereas metabolic processes were enriched in NRE+ EB cells (**Table S1**). Therefore, we can reliably identify differentially regulated genes with our two-color FACS sorting approach.

We then analyzed the impact of *spen* inactivation on gene expression in stem cells and in progenitor cells respectively. 58 genes were differentially expressed (FDR=0.05) between wild-type and *spen*^{RNAi} ISCs and 84 genes were differentially expressed (FDR=0.05) between wild-type and *spen*^{RNAi} EBs (**fig. 5B,6A-A'** and **fig.S4**), suggesting that gene expression was not dramatically changed. Cluster analysis revealed 3 major categories: genes that were differentially expressed in both cell types (groups 2, 5 and 10), genes that were differentially expressed only in stem cells (groups 6, 8, and 9) or in EB cells (groups 1, 3, 4 and 7) (**fig. 6B**). Categories were further discriminated into specific clusters depending on their cell-specific expression profile. For genes that were upregulated in *spen*^{RNAi} ISCs compared to wild-type ISCs we found that the GO term “glycoprotein” was enriched. For the genes downregulated in *spen*^{RNAi} ISCs compared to wild-type ISCs, we found that the GO terms “transporter activity” and “chitin metabolism” were enriched.

Of note, 2 of the 32 downregulated genes and 9 of the 27 upregulated genes are clustered in 4 regions of the genome, which may suggest that *Spen* controls local gene regulation either directly or indirectly.

To assess the functional relevance of these genes in stem cell regulation, we expressed RNAis of candidates from group 8, 9 and 10 (i.e. genes downregulated in stem cells or both cell types) in stem cells and progenitor cells using *esg*^{ts} line. We screened specifically for *spen* knockdown-related phenotypes: a stem cell expansion and/or an increase in DI marker at the membrane. We screened 24 genes (34 RNAi lines) out of 32 downregulated genes and found that RNAi from 9 genes lead to partial defects in intestine homeostasis (**fig. 6C**). The knockdown of *CG11190* (GPI-transamidase, VDRC#110292), *CG9505* (Metalloendopeptidase, VDRC#15536) and *cht2* (Glycoside hydrolase/chitinase activity, BL#35717) genes led to ISC-like cell accumulation. An enrichment of DI at the

plasma membrane was detected upon expression of RNAi for *Aats-ser* (Aminoacyl-tRNA synthetase, VDRC#110573), *CG5867* (Haemolymph juvenile hormone binding, VDRC#38020), *v(2)k05816/FAS2* (Fatty acid synthetase, VDRC#105855) and *blot* (neurotransmitter transport activity, VDRC#5296). This suggests that these genes might act downstream of *Spn* activity to regulate ISCs. The defects detected were more mild than that of *spn* inactivation on its own, suggesting that likely the combined deregulation of these genes in *spn* mutants leads to increased ISC-like cells and DI accumulation at the ISC plasma membrane.

In addition to defects in ISC numbers and DI accumulation, other phenotypes could be observed. The downregulation of the gene *cac* (Voltage-dependent calcium channel, BL#27244) led to an increase in the number of dividing cells per midgut and accumulation of EB (*esg+* DI- cells), suggesting an increase in proliferation without a commitment defect. Moreover, the *neb* gene (a Forkhead-associated domain and Kinesin motor domain protein, VDRC#108138) knock-down caused an enlargement of progenitor cell size without affecting ISCs suggesting that *neb* might also play a role in progenitor maturation or differentiation processes.

We also identified 27 genes that were upregulated upon *spn* inactivation (**fig S4**). Of note, two immune response related genes increase mRNA transcript levels in *spn* mutant ISCs compared to wild-type ISC: the *AttC* gene encoding an immune response-induced anti-microbial peptide and *pirk* (poor immune response upon knock-in), a downstream target of the Imd pathway. Further investigation using RNAi to inactivate these genes in *spn* mutants will be required to assess the functional relevance of their upregulation on the *spn* phenotype.

Together our data suggest that *spn* controls ISC fate by regulating multiple RNAs, each differentially impacting ISC proliferation and/or DI protein accumulation. The combined deregulation that occurs in *spn* mutants leads to a defect in asymmetric cell fate acquisition after ISC division. However, we find that *spn* is dispensable for further differentiation of the ISC into EC or EE cell fates.

Discussion

We have identified *spen* as an essential regulator of adult stem cells in *Drosophila*. Our data indicate that in the absence of *spen* activity, stem cells fail to properly commit into EB daughter cells, resulting in *spen* mutant ISCs producing increased numbers of ISC-like cells upon cell division compared to wild-type. In addition to these defects in the numbers of ISCs, *spen* mutant ISCs also have increased levels of the Notch ligand *Dl*, which accumulates at the plasma membrane as well as in vesicles. Our data suggest that *spen* acts upstream or in parallel to activation of the Notch receptor to promote stem cell commitment. Moreover, slowing proliferation by reducing Insulin signaling decreases the growth rate of *spen* mutant clones, but does not suppress the accumulation of ISC-like cells. This suggests that *spen*'s function is not simply to increase ISC division rates, but acts on fate specification *per se*. Finally, we identify *spen*-dependent transcriptional changes using RNAseq and show that knockdown of many of these genes can partially recapitulate the phenotype of *spen* mutants. Thus, we propose that *spen* controls ISC fate by the coordinate regulation of target genes ultimately allowing a limited number of ISCs to be formed after ISC division.

The mechanisms by which ISCs undergo asymmetric and symmetric divisions are still poorly understood. The Notch signaling pathway clearly has an important role in limiting stem cell numbers by promoting Notch activation in the stem cell daughter and allowing it to undergo terminal differentiation. While complete inactivation of Notch signaling leads to increased numbers of ISCs and EE cells (Ohlstein, 2006; Micchelli, 2006), a lowering of Notch signaling leads to increased numbers of ISCs without affecting EE number (Perdigoto et al, 2011). In addition to Notch signaling, increased proliferation can also lead to expanded numbers of *Dl*⁺ ISCs in the gut. However, the link with proliferation and cell fate specification is not yet well understood. One could imagine that increasing the rate of ISC division may lead to more ISCs if sister cells no longer have time to undergo Notch signaling. However, it seems as if simply increasing proliferation rates is not sufficient to result in extra stem cells. Indeed, when the cell cycle regulators *string* and *cycE* are overexpressed causing faster rates of division, more *Dl*⁺ cells are made, but these cells still activate the Notch pathway (Kohlmaier et al, 2015). In contrast, in *spen* mutants, we found accumulation of ISC-like cells that are *Dl*⁺ cells and do not activate Notch. These ISC-like cells also express *Sanpodo*, another stem cell marker, and are capable of cell division, a defining hallmark of

ISCs. Our data argue against a role for *spen* in simply increasing cell division rates since slowing proliferation of *spen* mutant cells by knocking down insulin signaling can reduce clone size, but fails to suppress accumulation of ISC-like cells. Moreover, overexpression of the activated Notch receptor can promote differentiation of *spen* mutant cells. Therefore, our data suggest that *spen* acts either upstream or parallel to Notch receptor activation to establish ISC fate.

A large-scale RNAi screen has also identified numerous genes that can impact the number of ISCs (Zeng et al, 2015), but a detailed understanding of how these genes act is currently lacking. Interestingly, *spen* was not identified in this RNAi screen, perhaps because its phenotype upon RNAi knockdown in both quiescent and active ISCs and EBs using the *esgGal4* driver is much weaker than clonal inactivation in actively dividing stem cells using the MARCM technique. This suggests that proliferative signals acting in parallel influence the rate of division of *spen* mutant ISCs, which is consistent with our data that knocking down Insulin signaling reduces the clone size of *spen* mutants. Bmp signaling and Insulin signaling have also been proposed to affect ISC self-renewal (O'Brien et al, 2011; Tian et al, 2015). In the future, an in depth mechanistic characterization of how genes controlling ISC self-renewal act together and with *spen* will provide useful insight for the mammalian counterparts where adult stem cells are located in complex cellular and extracellular environments.

Our data raise a number of interesting questions about *spen*-regulated target genes and their function to limit ISC number in the intestine. First, of the genes whose function we assessed, CG11190, CG9505, and *cht2* lead to increase numbers of stem cells. CG11190 encodes the fly PIG-T gene that is a Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-transamidase required to attach a GPI anchor on proteins. GPI anchors direct protein trafficking in clathrin-independent routes and are associated with detergent resistant membrane domains or lipid rafts (Fujita & Kinoshita, 2012). GPI-anchored proteins are involved in cell adhesion as well as cell-cell signaling. Of note, Notch receptor activity is regulated in GPI positive compartments (Shimizu et al, 2014). Whether GPI-dependent routes also influence DI activity is currently unknown, though this could help explain the increased levels and localization of DI to the plasma membrane in *spen* mutant ISCs. Additional cell-cell signaling factors such as Dally and Dally-like protein, which modulate Hedgehog and Jak/stat signaling undergo essential modifications by GPI allowing their apical secretion and membrane

attachment. Thus, *spen* may in part control ISC self-renewal through its regulation of the PIG-T GPI-transaminase. Moreover, a several of *spen*-regulated genes are, themselves, predicted to be GPI-modified including the chitinase Cht2.

The knockdown of *Aats-ser* encoding the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase gene caused enrichment of DI at the plasma membrane. Interestingly, *Aat-ser* knock-down has been shown to disrupt mitochondrial morphology and to increase reactive oxygen species (ROS) accumulation (Guitart et al, 2013). Similarly, the *dmGlut* gene, whose expression was upregulated upon *spen* inactivation, has been linked to generation of ROS: *dmGlut* encodes a glutamate transporter and leads to mitochondrial enlargement and excess ROS production when it is expressed at higher than normal levels (Shim et al, 2011). Increased mitochondrial ROS in intestinal stem cells has been demonstrated to promoted ISC proliferation (Hochmuth et al, 2011). While we did not detect a major impact on proliferation by *Aats-ser* knockdown, it is known that proliferative signals cause increased levels of DI (Zielke et al, 2014). Therefore, a possible effect on DI levels could be explained through defects in mitochondrial ROS production and may contribute to promoting proliferation of *spen* mutant ISCs. Further investigation will be required to determine if increased levels of ROS or mitochondrial defects are linked to the *spen* phenotype.

Interestingly, the immune response genes *AttC* and *pirk* are upregulated in *spen* mutant ISCs, which may indicate activation of the Imd pathway. The Imd pathway is induced in the adult gut in response to bacterial infection (Buchon et al, 2009a). While it is not essential to promote ISC proliferation in response to infection, the effect of upregulation of the Imd pathway on ISC proliferation, to our knowledge, has not been investigated. *pirk* is both a downstream target of the Imd pathway and a negative regulator (Kleino,). Therefore it is possible that upregulation of *pirk* expression may actually lead to Imd pathway inhibition. Moreover, *Tg* is also upregulated in *spen* mutant ISCs and acts to inhibit the Imd component Relish/NFkB, which could also lead to pathway inactivation (Shibata, 2013). A role for *spen* in Imd regulation could be consistent with the immune deficiencies detected in *spen* mutant hemocytes (Jin et al, 2009).

We note that many genes related to chitin binding and metabolism are controlled by *spen*, which may explain defects of *spen* mutants noted by others occurring during development (Kuang et al, 2000; Mace et al, 2005; Wiелlette et al, 1999). In insects, chitin is a major component of the cuticle or exoskeleton. It is secreted by intestinal cells as well as

other cells exposed to the external environment and is required to form a barrier. In *spen* mutant ISCs, we detect downregulation of the chitin binding proteins CG33258, CG34240, and the Chitinase 2 (Cht2) coding genes, as well as upregulation of the gene *yellow*, associated with cuticle pigmentation. Interesting, defects in cuticle integrity have been noted in *spen* mutant embryos as well as defects in formation of the sclerites, a cuticular structure, and defects in the trachea (Kuang et al, 2000; Mace et al, 2005; Wiertellet et al, 1999). Could deficiencies in barrier function occur in *spen* mutant cells, which might induce defects in stem cell specification? Further investigation of the role of cuticle in the intestine will be required to address this.

Our work has identified *spen* as a critical regulator of ISCs and demonstrated that it regulates a number of target genes that impact ISC proliferation and DI protein accumulation. Our findings also shed light on the molecular function of *spen*.

Materials and Methods

Fly stocks

Fly stocks used in this study were the following: *FRT40A spen*^{9E34} [allele present a nonsense substitution C>T, which lead to a putative 631aa truncated protein]; *FRT40A spen*^{9C95} from C.P., F.S., A.J.B., unpublished genetic screen. From Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) : *FRT40A spen*⁵ (#BL8734) [mutation mapped in (Kuang et al, 2000)]. From the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) : *UAS-AKT RNAi*; *UAS-spen RNAi* (#KK-108828). The lines *NRE-GFP* and *su(H)GBE-LacZ* were a gift from S. Bray, *UAS-Notch*^{cdc10} [referred as *UAS-N^{act}*; is a truncated active version of intracellular Notch, (Brennan et al., 1999)] is a gift from M. Haenlin.

- For thermosensible RNAi expression, the following lines were used : *esgGAL4, tubGAL80ts, UAS-GFP (chr2)* (*esg*^{ts}; Jiang et al., 2009); *esg-GAL4, tub-GAL80^{ts}* ; *UAS-RFP* (made with line BL31417 from bloomington); *nre-GAL4, UAS-CD8-GFP* ; *tubGAL80ts* (*nre*^{ts}) and *esg-GAL4; nre-GAL80, tub-GAL80^{ts} nre-GAL80* (*esg*^{ts}, *nre-GAL80*) a gift from B. Edgar.

- MARCM clones were generated as describe in (Bardin et al. 2010) using the following stock : *w P[hs-FLP] P[pTub-GAL4] P[UAS- nlsGFP]; FRT40A P[pTub-GAL80]* and *w P[hs-FLP] P[pTub-GAL4] P[UAS- nlsGFP];;FRT82B P[pTub-GAL80]*.

Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) and RNAi experiments

Adult flies and crosses were kept at 25°C in rich yeasted medium tubes unless it is notified. MARCM clones were induced by a 35min heat shock at 36,5C° in 3 day old adults. Flies were then dissected either at 5 days after heat shock or 10 days. Thermosensible experiments were kept at 18°C and shifted at 29°C during indicating period before dissection.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Antibodies used in this study were the following: anti-Delta ECD C594.9B [mouse, ascites, 1/2000, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)]; anti-PH3 (Rabbit, 1/2000; Upstate); anti-Pros (Mouse, 1/2000; Y. N. Jan, UCSF, CA, USA); anti-Pdm1 (Guinea pig, 1/1000; W. Chia, National University of Singapore); anti-Sanpodo (1/2000; preabsorbed; J. Skeath, Washington University, St Louis, MO, USA); anti-Notch ECD C458.2H (mouse, ascites, 1/100, DSHB); anti-Gal (Goat, 1/500; Biogenesis); anti-GFP (Chicken, 1/2000, Molecular Probes). The Delta (C594.9B) antibody developed by S. Artavanis-Tsakonas, and the Prospero (MR1A) antibody developed by C.Q. Doe were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

The fixation protocol previously described in (Bardin et al., 2010) was used in this study on. A methanol fixation protocol described in (Lin et al., 2008), was used for the fig.S1K-L.

Quantification and Statistical Analysis

For all the analysis of this study, only posterior midgut was analysed and “stem cell clones”, i.e. clones containing two or more cells were scored. In fig. 2E-F, single cell clones were included in the analysis. Statistical analyses were performed with R, using a non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test. Means were compared using a Tukey-HSD test. In fig. 1G, a Fisher’s test was performed.

Intestinal cell FACS sorting

The following genotype was used: *esg-GAL4, tub-GAL80ts/ (UAS-spen KK RNAi or +); UAS-RFP/NRE-GFP*. RNAi expression was induced by a 2 day temperature shift from 18°C to 29°C. Entire intestines were dissected and collected in cold PBS. Dissociation step was performed as described in (Dutta, 2013) using PBS Elastase (1mg/ml) solution and mechanic pipetting. Dissociated cells were resuspended in PBS, 1% BSA and FACS (FACS Aria BD Biosciences) using the following parameters : 20psi, 100µm nozzle. Diploid RFP positive fraction were separated from the diploid RFP, GFP double positive fraction. Cells were directly collected in TRIzol (Life Technologies).

RNA-seq

RNAs was extracted by performing two series of Phenol-Chloroform at 4°C followed by DNase treatment according to the manufacturer’s instructions. Around 100ng total RNA were collected from 100 000 sorted cells and their quality and quantification were assessed on an Agilent Bioanalyzer using the Agilent RNA 6000 nano kit. A classical Illumina TruSeq protocol was used to build the libraries, from poly(A)⁺-enriched mRNA. Three biological replicats were sequenced per conditions on on the Illumina HiSeq 2500. Sequencing resulted in 50 million 100bp paired-reads from each library, which were then aligned against the *Drosophila melanogaster* r5.54 using TopHat default parameters (Trapnell et al, 2009). Reads were anotated using SummarizOverlap (Lawrence et al, 2013) based on ENSEMBL GENES 75, BDGP5 genome reference. Differential gene expression was analysed using DEseq2 (Love et al, 2014) default parameters. Differential exon usage was analysed using DEXseq (Anders et al, 2012).

Acknowledgements

We would like to thank I. Rebay, K. Cadigan, B. Mollereau, the Bloomington, Vienna, and Kyoto Stock centers, the for shared antibodies and fly lines. The Bardin lab is supported by project grants from the Association for International Cancer Research, ATIP-AVENIR, La Ligue Contre le Cancer, and the Fondation ARC as well as funding from the Laboratoires d'Excellence DEEP (ANR-11-LBX-0044) part of the IDEX IDEX PSL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL), CNRS, INSERM, and the Institut Curie. High-throughput sequencing has been performed by the NGS platform of the Institut Curie, supported by the grants ANR-10-EQPX-03 and ANR10-INBS-09-08 from the Agence Nationale de la Recherche (investissements d'avenir) and by the Canceropôle Ile-de-France. M.A. was founded by the DIM-STEM-Pôle Ile-de-France PhD fellowship and the Fondation pour la Recherche Médical (FDT20140930939) PhD fellowship. The authors greatly acknowledge the PICT-IBiSA@BDD (UMR3215/U934) Imaging facility of the Institut Curie, the cytometry platform of the Institut Curie.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

M.A. and A.J.B. conceived all experiments;

C.N.P. and A.J.B. conceived and performed the genetic screen;

P.S. and M.A. performed the spen transgene from Fig. S1

M.A. performed all other experiments

M.A. and A.J.B. wrote the manuscript

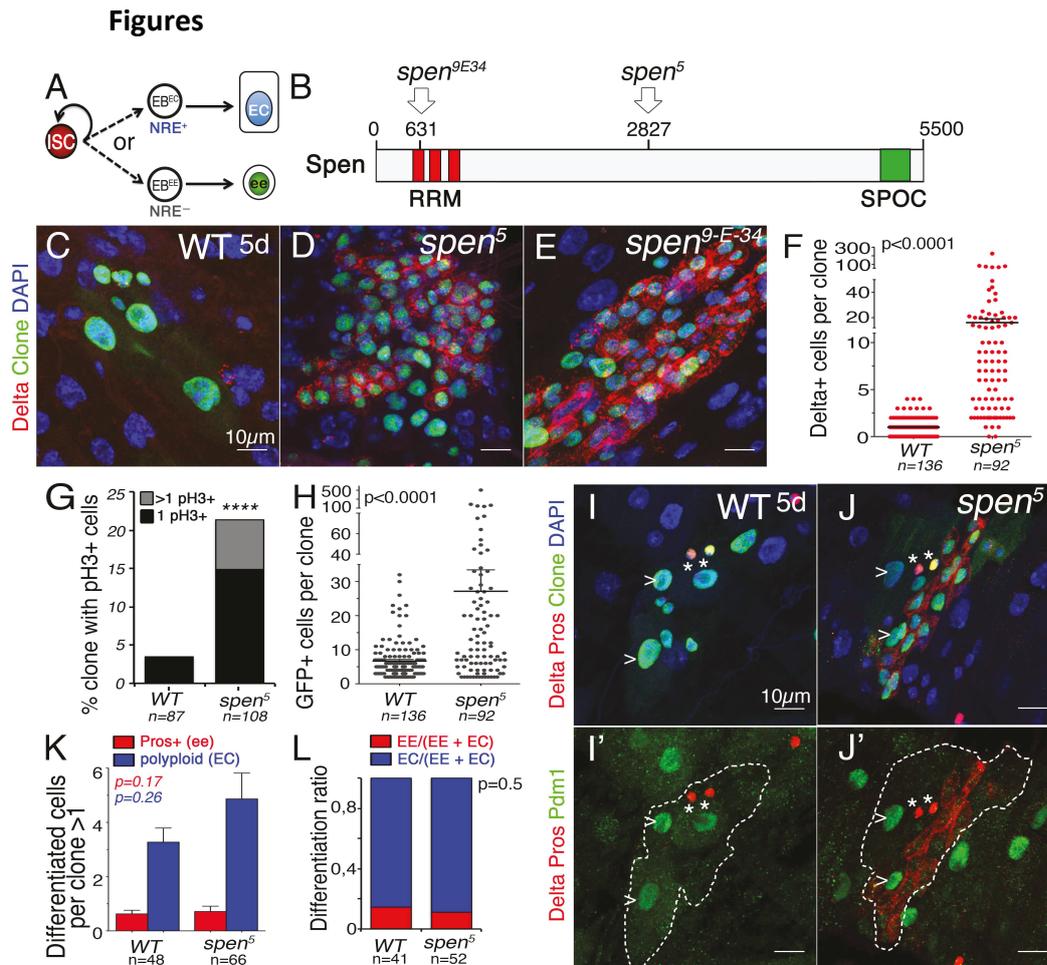


Figure 1. *spen* inactivation leads to an accumulation of intestinal stem cell-like cells in the adult midgut. (A) The intestinal lineage. Intestinal stem cells (ISCs) produce post-mitotic progenitor cells, called enteroblats (EBs) that directly terminally differentiate. Notch activated EBs (EB^{EC} NRE+) produce enterocytes (ECs) whereas enteroendocrine cells (EEs) derived from an EB in a Notch-independent manner (EB^{EE} NRE-) (B) Spen protein is a putative RNA binding protein, characterized by 3 RNA recognition motifs (RRM) in N-terminal part, and a SPOC (Spen Paralog Ortholog C-terminus) domain in C-terminal part of the protein. $spen^{9E34}$ allele is characterized by a C>T substitution leading to a putative 631 amino acids (aa) truncated protein. $spen^5$ allele derived from a nucleotide deletion, which leads to a putative 2827aa truncated protein. (C-E) Delta+ cells (Red) accumulate in $spen^5$ (D) and $spen^{9E34}$ (E) mutant marked clones (GFP, green) compared to wild-type (WT) (C). (DAPI, blue). (F) Quantifications revealed a significant increase in ISC-like cells in $spen^5$ mutant stem cell clones (13 Delta+ cells, n=92) compared to wild-type (1 Delta+ cells, n=136), $p < 0.0001$, 5 days AHS. (G-H) An increase in proliferation in $spen^5$ mutant background 5 days AHS is shown by a significant increase in stem cell clones with at least one dividing cell (pH3+) (21.3% of $spen^5$ clones, n=108) compared to WT (3.4% of WT clones, n=87), $p < 0.0001$. Interestingly, 6% of $spen^5$ mutant clones have more than 1 pH3+ cells. This increase in dividing cells is associated with an increase in clone size in $spen^5$ mutant clones (27 GFP+ cells, n=92) compared to WT (6.7 GFP+ cells, n=136), $p < 0.0001$ (Fisher's exact test). (I-L) Enterocyte (EC) and enteroendocrine (EE) cells are produced in $spen^5$ mutant clones. EC, (Pdm1+, green); EE (Pros+, nuclear red); ISC (Delta+, red); DAPI (blue) (I'-J'). Quantifications show a production of 4.9 ECs and 0.7 EEs per $spen^5$ clones (n=66), as in WT (3.3 ECs and 0.6 EEs per WT clones, n=48, $p_{EC}=0.26$, $p_{EE}=0.17$) (K), with no bias toward one of the two differentiated cell types ($n_{WT}=41$, $n_{spen^5}=52$, $p=0.5$) (L). When not specified, a non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test was performed followed by a Tukey-HSD test. Error bars represent the sem.

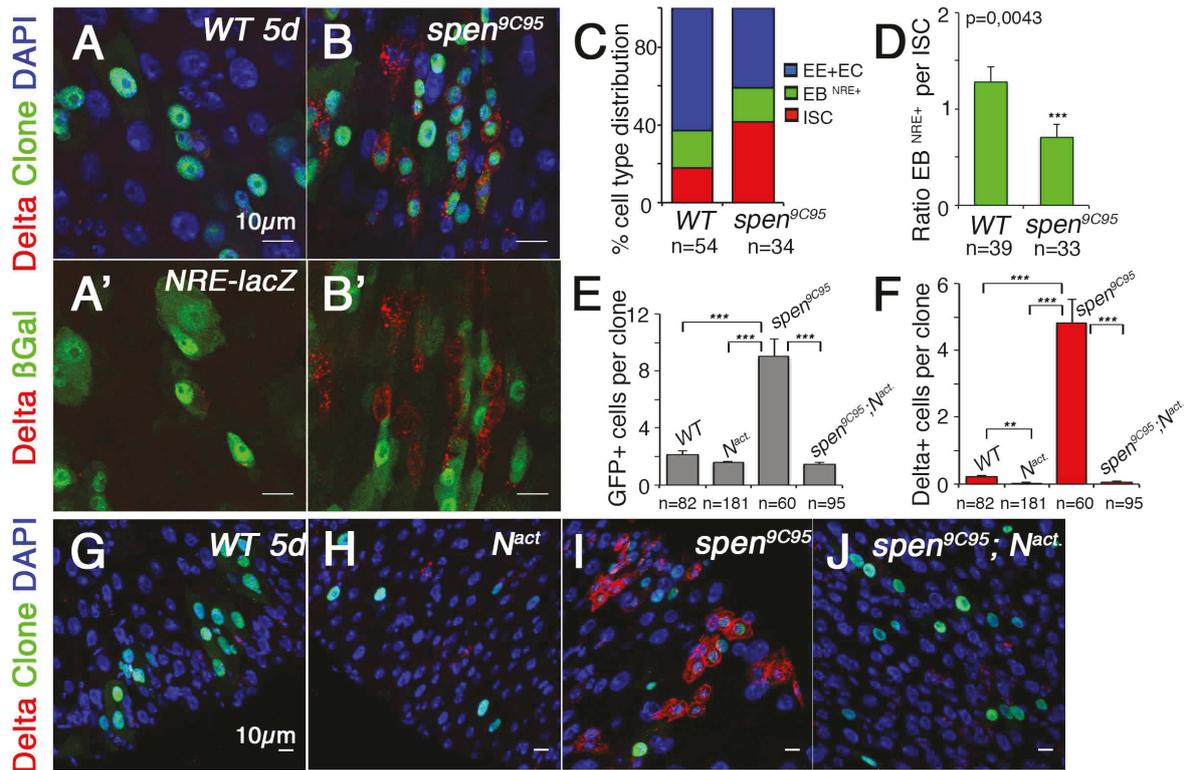


Figure 2. *spen* controls early stem cell commitment event, prior or in parallel to Notch nuclear activity. (A-D) *spen* mutant cells can activate the Notch pathway, as it is shown by the presence of Notch activated cells (NRE-lacZ, β Gal, Green) (A'-B') in *spen*^{9C95} mutant clones, 5 days AHS (A-A', B-B'). While the production of EB^{NRE+} cells per clone is clonally unaffected upon *spen* inactivation (19% of EB^{NRE+} cells per WT clones and 17.6% of EB^{NRE+} per *spen*^{9C95} clones, $p=0.29$), Delta+ ISC proportion is significantly increased from 17.7% in WT clones to 41.2% in *spen*^{9C95} clones, $p<0,0001$. Differentiated cell proportion is therefore reduced from 63% of differentiated cells (ECs+EEs) in WT to 40% cells in *spen*^{9C95} clones. $n_{WT}=54$, $n_{spen}=34$ (C). *spen* mutant ISC-like cells are producing less EB^{NRE+} cells. The ratio between EB^{NRE+} over DI+ ISCs is significantly reduced from 1.3 in WT clones ($n=39$) to 0.7 *spen*^{9C95} clones ($n=33$), $p=0,0043$ (D). (E-J) *spen* loss-of-function phenotype is suppressed by Notch overactivation. An activated form of the Notch receptor (UAS-N^{act}) has been clonally expressed in WT and *spen*^{9C95} backgrounds, 5 days AHS. ISC (Delta+, red); Mitotic clones (Green); DAPI (blue). Quantifications show 2.2 GFP+ cells per WT clones ($n=82$) and 1.6 GFP+ cells when UAS-N^{act} is expressed ($n=181$). The *spen*^{9C95} mutant large clone size (9 GFP+ cells per *spen*^{9C95} clones, $n=60$) is dramatically reduced by the expression of UAS-N^{act} (1.5 GFP+ cells per *spen*^{9C95} UAS-N^{act} clones, $n=95$) (E). UAS-N^{act} expression reduces ISC cell number from 0.22 Delta+ cells in WT clones ($n=82$) to 0.03 Delta+ cells in UAS-N^{act} clones ($n=181$), and from 4.8 Delta+ cells in *spen*^{9C95} clones ($n=60$) to 0.05 Delta+ cells per *spen*^{9C95} UAS-N^{act} clones ($n=95$). $p<0.01$, **, $p<0.001$, ***. One cell clones have been included in this quantification. When not specified, a non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test was performed followed by a Tukey-HSD test. Error bars represent the sem.

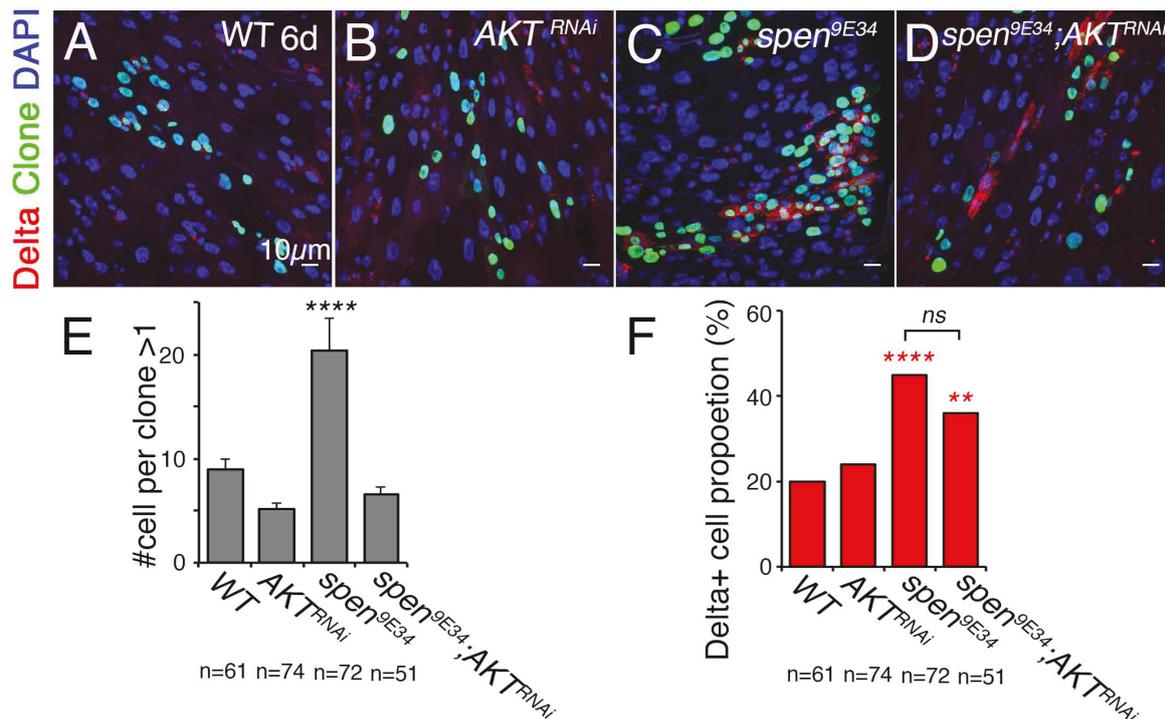


Figure 3. Stem cell-like cell accumulation upon *spen* inactivation is independent of proliferation. (A-D) AKT^{RNAi} has been clonally expressed in WT (B) and *spen*^{9E34} (D) backgrounds, 6 days AHS. ISC (Delta+, red); Mitotic clones (Green); DAPI (blue) (E) AKT downregulation reduces *spen*-dependent proliferation. Quantifications show 8.9 GFP+ cells per WT clones (n= 61) and 5.2 GFP+ cells when UAS-AKT^{RNAi} is expressed (n=74). The *spen*^{9E34} mutant large clone size (20.4 GFP+ cells per *spen*^{9E34} clones, n=72) is reduced to 6.5 GFP+ cells per clones, n=51, by UAS-AKT^{RNAi} expression (*spen*^{9E34} UAS-AKT^{RNAi}). (F) Stem cell-like cell accumulation was not abrogated by an AKT downregulation. Quantifications show 20.13% of Delta+ ISC per WT clones (n= 61) and 24.44% of Delta+ ISC cells when UAS-AKT^{RNAi} is expressed (n=74). The *spen*^{9E34} ISC proportion (44.66% of Delta+ ISC cells per *spen*^{9E34} clones, n=72) is similar to *spen*^{9C95} UAS-AKT^{RNAi} (37.5% Delta+ ISC cells per clones, n=51). p<0.01, **. p<0.001, ***. One cell clones have been included in this quantification. When not specified, a non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test was performed followed by a Tukey-HSD test. Error bars represent the sem.

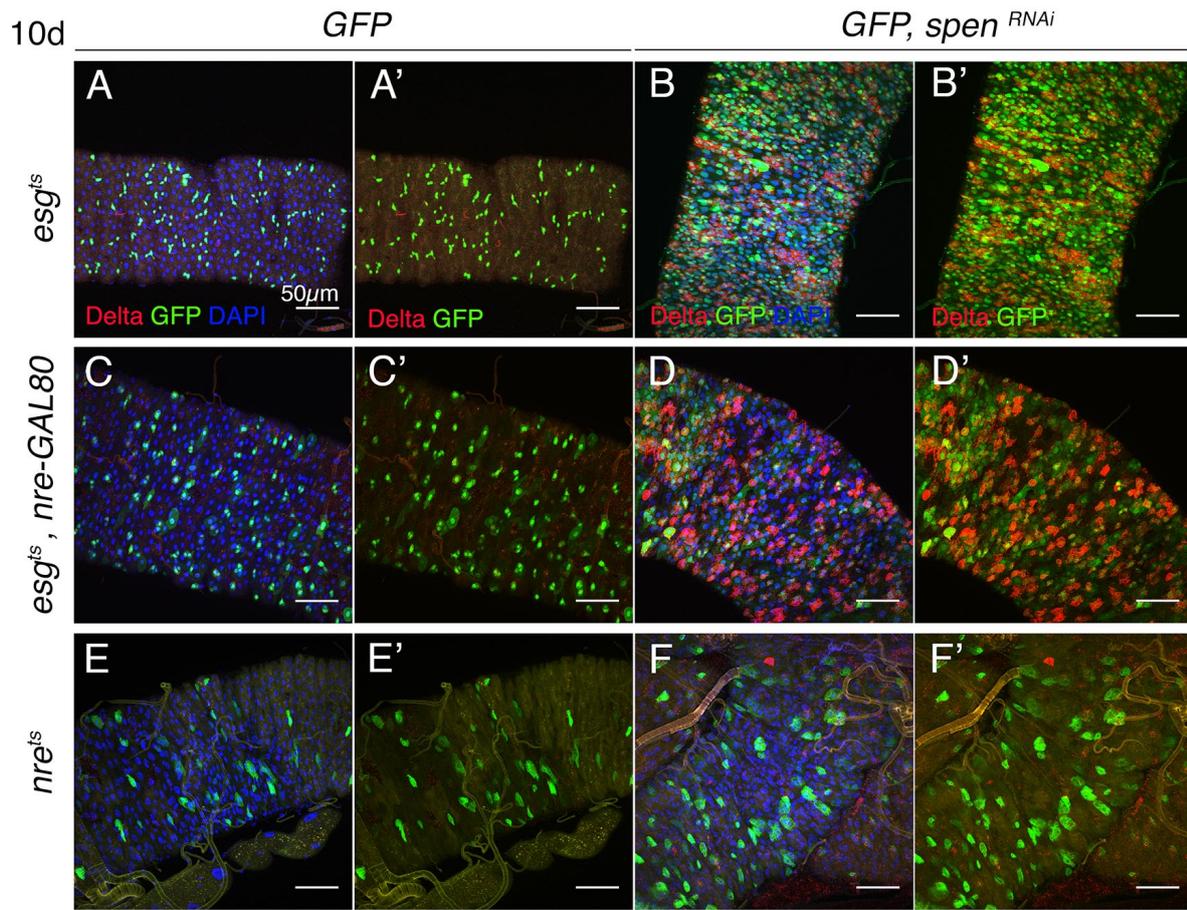


Figure 4. *spen* knockdown in stem cell is sufficient to trigger stem cell expansion in the intestine. A *spen*^{RNAi} (B-B', D-D', F-F') or a UAS-GFP control (A-A', C-C', E-E') were expressed specifically in both stem cell (ISC) and Entéroblastes (EB) (*esg*^{ts}) (A-B), or in ISC only (*esg*^{ts}, *nre*-GAL80) (C-D) or in EB only (*nre*^{ts}) (E-F), during 10 days at 29°C. GFP (Green) referred to the cell type expression. ISC (Delta+, Red), DNA (DAPI, Blue).

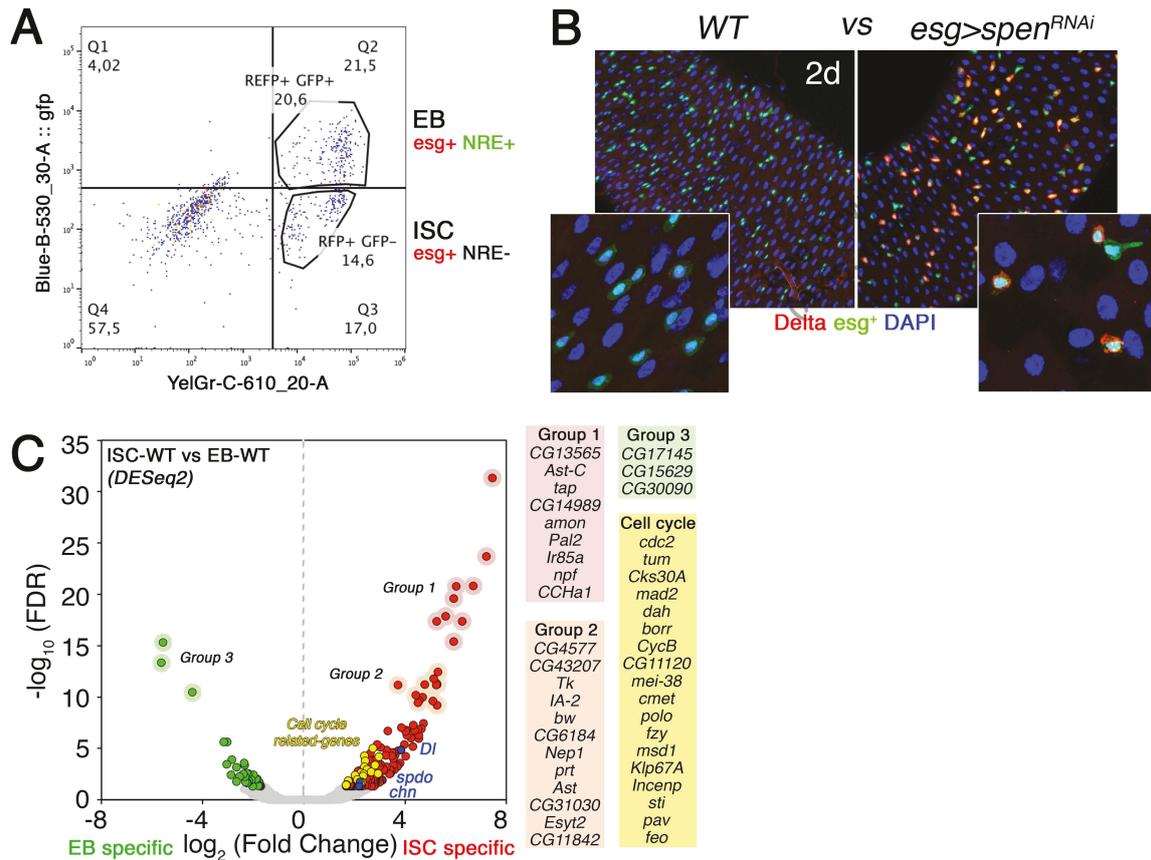


Figure 8. RNAseq analysis from two-color FACS sorted ISC and EB. (A) Intestinal Stem Cells (ISC, *esg+* NRE-) and Entéroblasts (*esg+* NRE+)(EB) were sorted using two-color FACS sorting approach. *esgGal4 Gal80^{ts}* system was used to expressed *spen^{RNAi}* in both ISCs and EBs and RFP marker.during 2 days. NRE-GFP was additionally used to discriminate EB. (B) After 2 days of *spenRNAi* expression, Delta protein (Red) was enriched at the membrane and in vesicles, but proliferation was not induced as previously shown. *Esg* (in Green) referred to ISC and EB population. DNA (DAPI, Bue). (C) Differential gene expression comparison between wild-type ISCs and EBs reveals 185 differentially expressed genes, FDR=0.05. Known ISCs markers and cell-cycle related-genes were upregulated in ISCs.

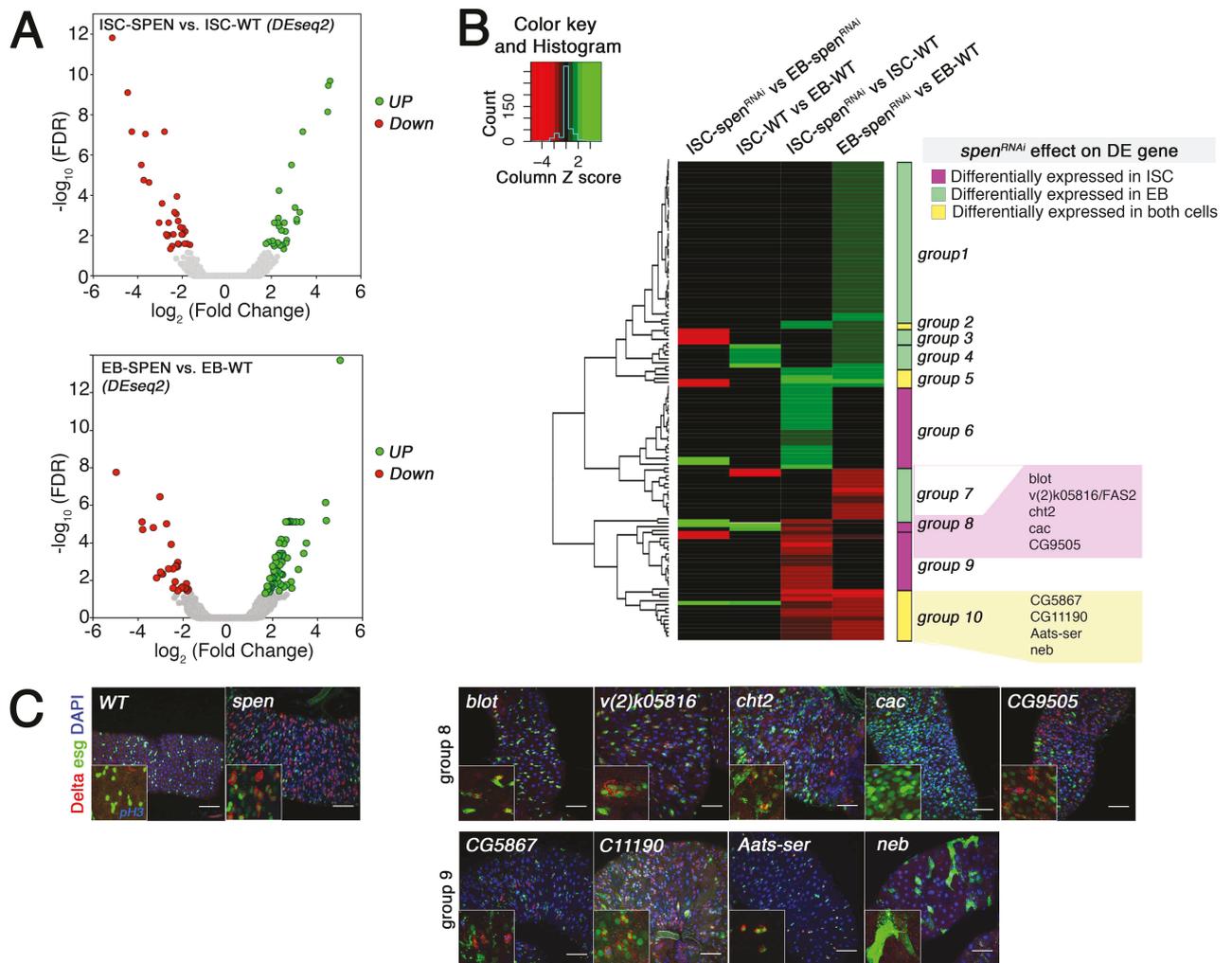


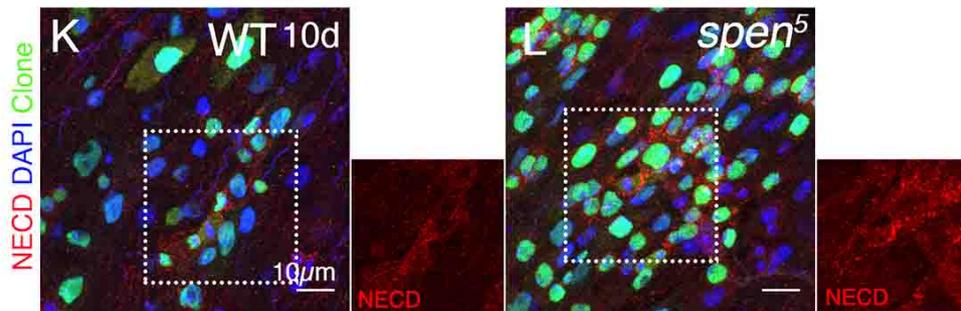
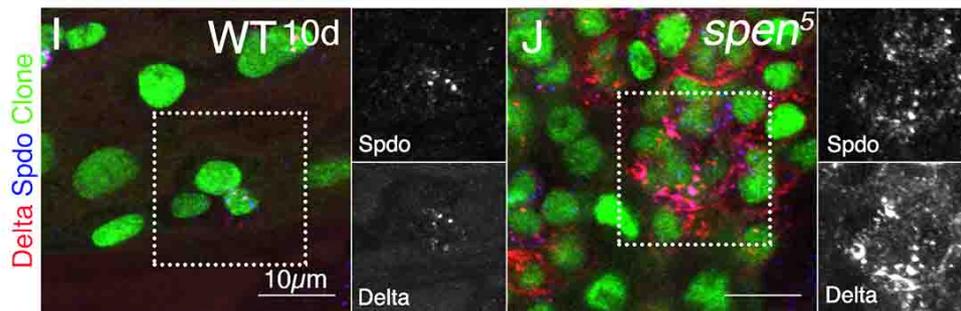
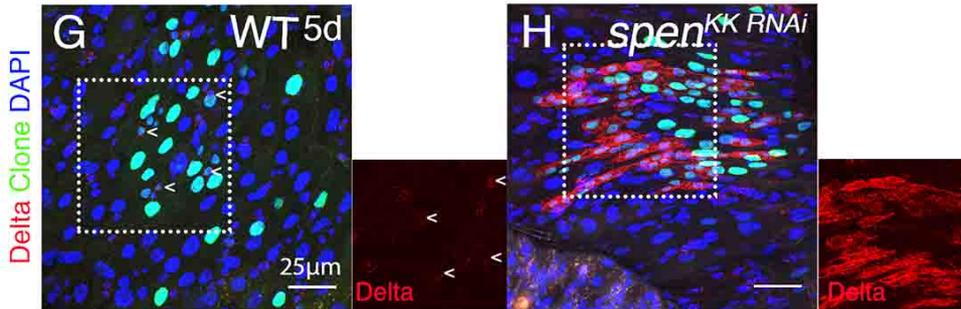
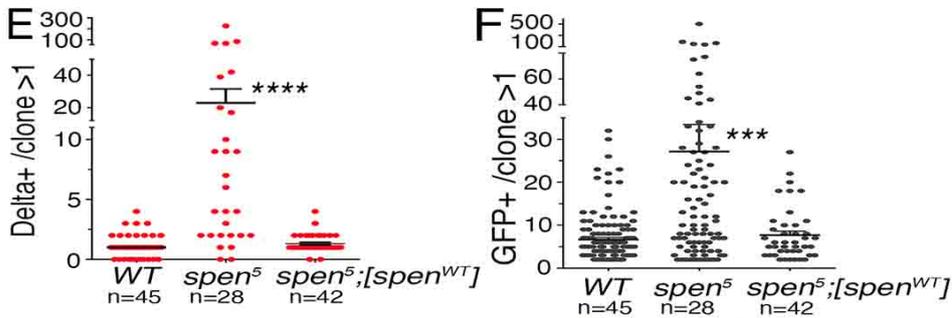
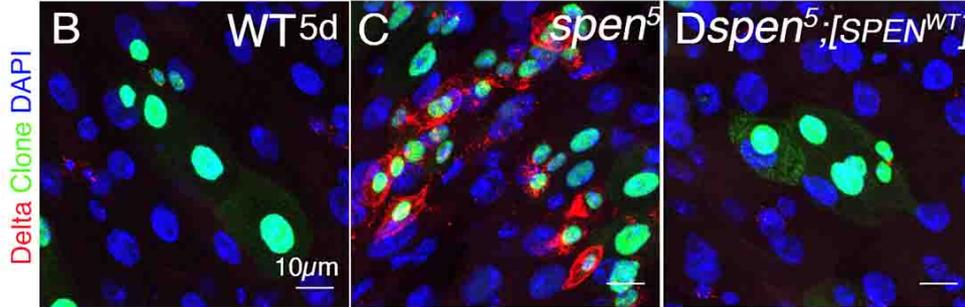
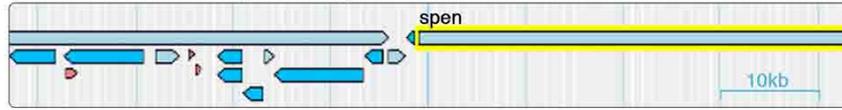
Figure 6. *spen*-dependent transcript identification by RNAseq. (A) Differential gene expression comparison between 2 days *spen*^{RNAi} expressing ISCs vs. wild-type ISC reveals 58 differentially expressed genes, FDR=0.05. (top panel). Comparison of 2 days *spen*^{RNAi} expressing EBs vs. wild-type EB reveals 84 differentially expressed genes, FDR=0.05 (bottom panel). (B) Cluster analysis revealed 3 major categories of genes depending on their expression profile. Genes differentially expressed in both cell types (Yellow), genes differentially expressed only in stem cells (Pink) or in EB cells (light green). (C) Downregulated-genes upon *spen*RNAi in ISCs were tested by expressing candidate gene-RNAi using *esg*Gal4, Gal80ts system (Green) during 10 days. ISCs were identified using Delta (Red). DNA (DAPI, Blue). In small window : Delta is in red, *esg* in Green and Ph3 in Blue..

Table 1. GO Term Enrichment in Intestinal Stem Cells and in Enteroblastes

ISC-associated GO Term			
Signaling: Intracellular signal transduction	Enrichment Score: 5,23	(post-) Transcriptional regulation	Enrichment Score: 0,89
Signaling: Extracellular signal transduction	Enrichment Score: 3,07	Transport: Channel activity	Enrichment Score: 0,86
Cell cycle: Cytokinesis	Enrichment Score: 2,58	Transport: Ions transport	Enrichment Score: 0,85
Signaling: Trafficking/Secretion	Enrichment Score: 2,55	Kinase/Phosphatase activity and regulation	Enrichment Score: 0,79
Cell cycle: Microtubule-related processes	Enrichment Score: 2,07	Signaling: Trafficking/Endocytosis	Enrichment Score: 0,75
Transport: Intracellular localization	Enrichment Score: 1,75	Metabolic processes: Nucleotide metabolic processes	Enrichment Score: 0,63
Cell determination	Enrichment Score: 1,43	Courtship behavior	Enrichment Score: 0,63
Signaling: GTPase activity	Enrichment Score: 1,36	Cell determination: Morphogenesis	Enrichment Score: 0,51
Cell cycle: Cell cycle regulation	Enrichment Score: 1,30	Metabolic processes: Proteolysis	Enrichment Score: 0,39
Transport: Amine transport	Enrichment Score: 1,04	Metabolic processes: Ion binding	Enrichment Score: 0,29
Cell cycle: M phase	Enrichment Score: 0,99	Developmental processes	Enrichment Score: 0,13
Metabolic processes: Lipid binding	Enrichment Score: 0,95	Oogenesis	Enrichment Score: 0,09
Cell determination: negative regulation	Enrichment Score: 0,91		
EB-associated GO Term			
Metabolic processes: Proteolysis	Enrichment Score: 1,02		
Metabolic processes: Ions binding	Enrichment Score: 0,43		

Figure S1. *Spn* inactivation leads to stem cell-like cells accumulation expressing several ISC markers. (A-F) A transgenic BAC construct containing the *spn* wild-type genomic region (A) can suppress *spn* inactivation associated phenotype in 5 days MARCM clones. **(B-D)**. Clonal expansion is reduced **(E)** as well as Delta+ ISC-like cell accumulation. **(F)**. **(G-H)** *spn* mutant phenotype can be reproduced by clonally expressing a *spn*^{RNAi} during 5 days. **(I-L)** *spn*^{9E34} mutant stem cell-like cells expressed known stem cell marker as in wild-type such as Sanpodo (Spdo) **(I-J)** and Notch receptor **(K-L)**

A BAC CH321-56B18 [*SPEN*^{WT}]



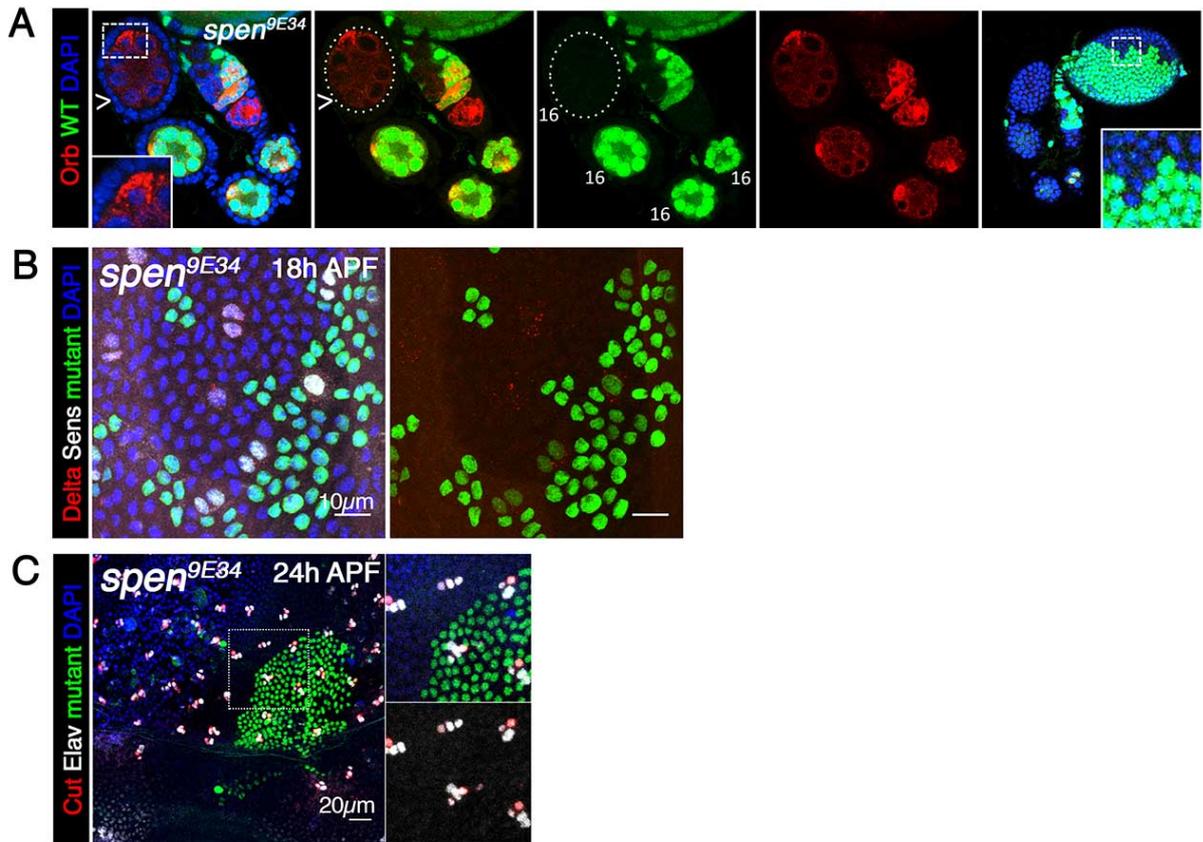


Figure S2. *spen* inactivation has no phenotype in the notum or the ovaries. (A) *spen*^{9E34} unmarked mutant clones were generated in the germ line and the follicular cells do not present visible phenotypes nor in the notum when MARCM *spen*^{9E34} clones were generated at 18h after pupation (APF) (B) or 24h APF (C)

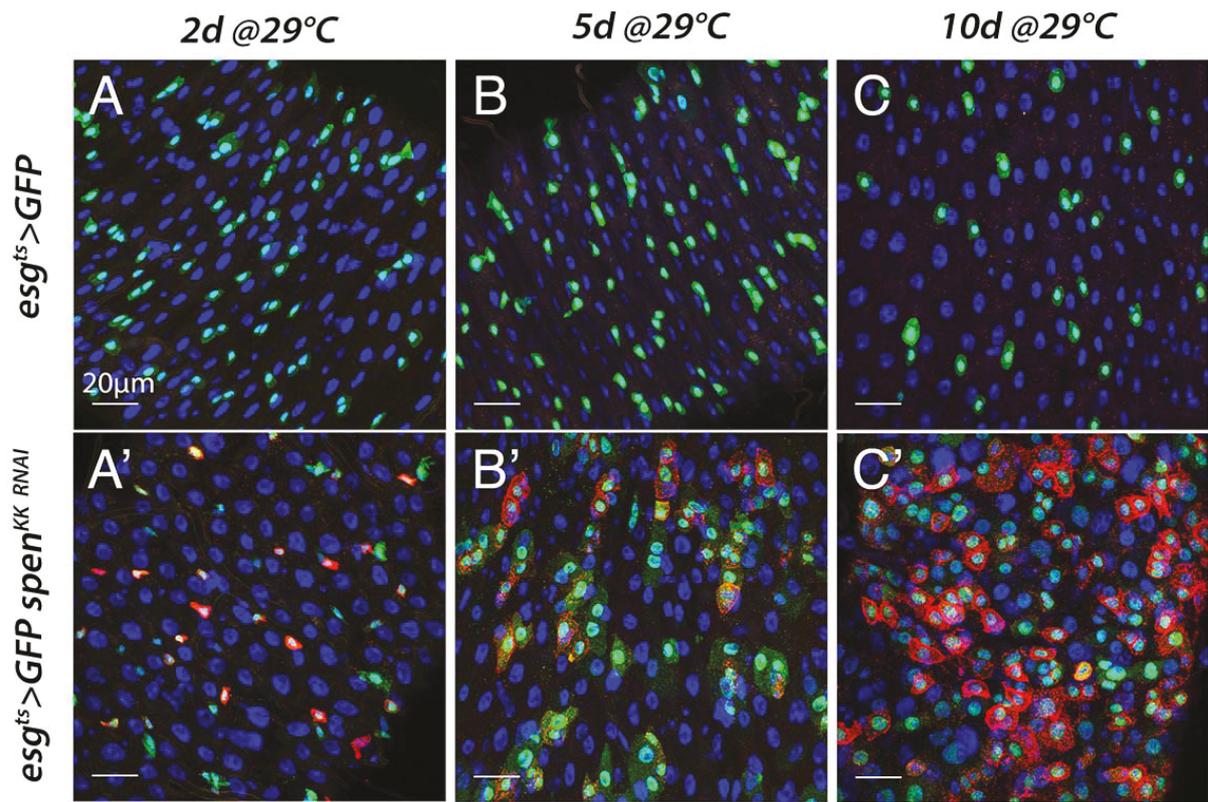


Figure S3. Delta protein accumulation upon *spen* inactivation occurs earlier than proliferation. UAS-GFP control (A-C) or a *spen*^{RNAi} (A'-C') were expressed specifically in both stem cell (ISC) and Entéroblastes (EB) (*esg*^{te}) at 29°C during 2 days (A,A'), 5 days (B-B') and 10 days (C,C'). GFP (Green) referred to the cell type expression. ISC (Delta+, Red), DNA (DAPI, Blue).

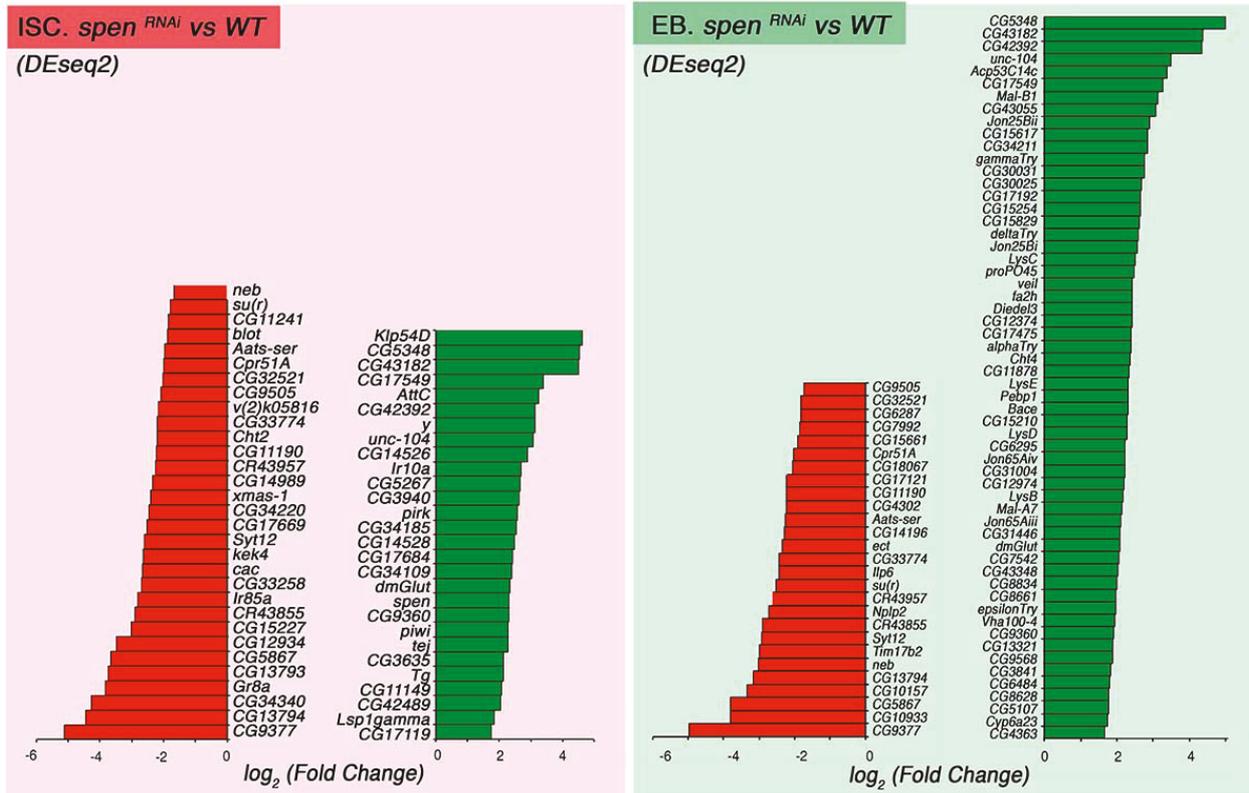


Figure S4. *Spn*-dependent transcripts. (A) Differential gene expression comparison between 2 days *spen*^{RNAi} expressing ISCs vs. wild-type ISC reveals 58 differentially expressed genes, FDR=0.05. (left panel). Comparison of 2 days *spen*^{RNAi} expressing EBs vs. wild-type EB reveals 84 differentially expressed genes, FDR=0.05 (right panel).

Partie II.
**Résultats complémentaires sur la fonction de Spen dans la
régulation des cellules souches intestinales
de *Drosophila melanogaster*.**

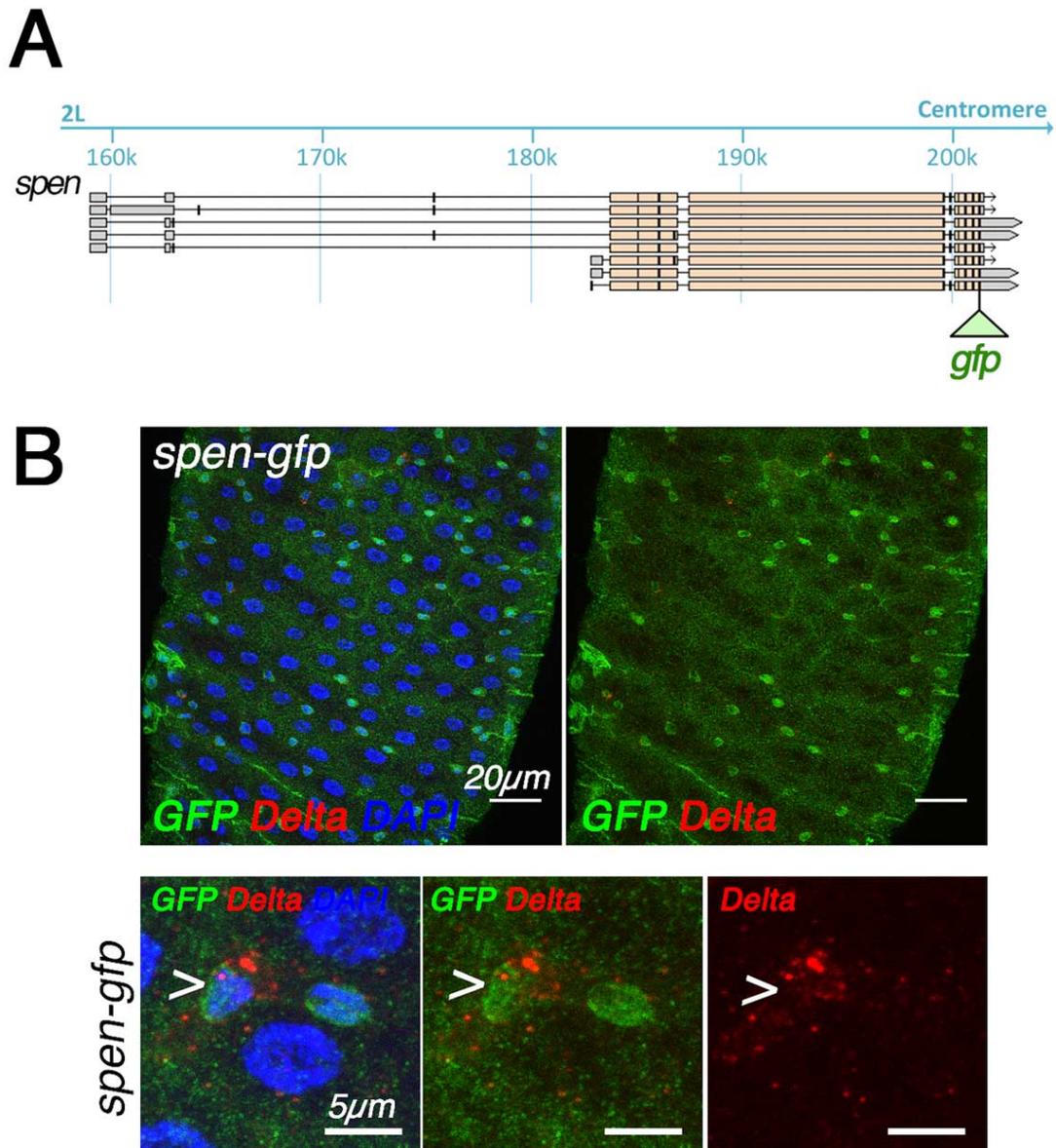


Figure 9. *spen* gene is expressed in intestinal stem cells. (A) Using CRISPR technology, we inserted a GFP tag in frame with the CDS 3' end of the *spen* gene endogenous locus. (B) The endogenous *spen* GFP-tagged gene is expressed in diploid cells including stem cells (Delta+, red). The fused protein (GFP, green) has a nuclear localization. At the bottom, 6X zoom in view. DNA (DAPI, blue).

I. Le gène *spen* est exprimé dans les cellules souches intestinales de drosophile.

Nous avons montré qu'une inactivation du gène *spen* par ARN interférence (ARNi) dans les cellules souches intestinales, mais pas dans les cellules progéniteurs, était suffisante à l'induction d'une accumulation de cellules de type souche dans l'épithélium, reproduisant ainsi le phénotype d'une perte de fonction du gène *spen*. Afin de compléter cette information fonctionnelle sur le gène *spen*, nous avons souhaité analyser son profil d'expression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle au sein du tissu, afin de déterminer dans quel(s) type(s) cellulaire(s) *spen* est exprimé. Nos données de séquençage d'ARN des cellules souches sauvages et des progéniteurs suggèrent la présence de transcrits *spen* dans ces deux types cellulaires. Afin d'étendre cette analyse à tous les types cellulaires du lignage intestinal, nous avons souhaité évaluer l'expression de la protéine Spen au sein de l'épithélium *in vivo*.

Nous avons dans un premier temps testé les anticorps disponibles (Chen & Rebay, 2000; Querenet et al, 2015), ainsi que produit nos propres anticorps dirigés contre la protéine Spen endogène. Cependant, aucun changement de profils d'expression n'a pu être observé dans des clones sauvages et mutants pour l'allèle *spen*^{9E34}. La spécificité de ces anticorps n'a ainsi pas pu être validée dans ce tissu. Notre seconde stratégie a été de développer un outil permettant la visualisation de l'expression de *spen in vivo*, en construisant une lignée de drosophile exprimant un transgène *spen-FLAP*¹¹ (« *Fluorescent Localization and Affinity Purification* »), grâce à la technique du clonage de BAC (Chromosome Artificiel Bactérien) par recombinaison homologue chez la bactérie (Venken et al, 2006). Cette technique permet notamment la manipulation de larges fragments d'ADN (100kb dans le cadre de cette construction). Différents transgènes ont été générés avec l'aide de Patricia Skorski. Ils sont constitués d'une région génomique sauvage du gène *spen*, fusionnée avec une étiquette FLAP en région 5' ou en région 3' de la séquence codante de *spen*. Une protéine de fusion peut ainsi être exprimée *in vivo*, sous le contrôle du promoteur et des régions non traduites (UTR et introns) du gène *spen*. Néanmoins, seules des lignées

¹¹ L'étiquette FLAP résulte d'une fusion entre une protéine GFP et un peptide FLAG, séparés par un site de coupure de la protéase TEV (« Tobacco Etch Virus »). Tout en permettant la génération d'une protéine de fusion fluorescente, elle permet deux purifications par affinité successives de cette protéine de fusion.

présentant un transgène d'une version étiquetée en région N-terminale de la protéine ont pu être générées avec cette technique. L'observation par immunofluorescence de la GFP et du peptide FLAG présente un schéma d'expression ponctiforme sur l'ensemble du tissu, cette construction n'a cependant pas pu être validée compte tenu de l'absence de co-localisation par immunofluorescence de la GFP et du peptide FLAG. Nous nous sommes donc tournés vers une troisième alternative.

La récente découverte de la technique d'édition des génomes par CRISPR/Cas9 (Beumer & Carroll, 2014) nous a permis de générer un allèle du gène *spen* endogène, portant une séquence *GFP* en région 3' de la séquence codante de *spen*. Celui-ci permet de visualiser une expression de la GFP gouvernée par les éléments régulateurs endogènes de *spen* (**Fig. 1A**). Fusionnée en phase avec la région C-terminale de la protéine Spen, la GFP constitue un rapporteur de l'expression protéique du gène *spen*, sous réserve que son insertion ne perturbe pas la stabilité, les fonctionnalités ou les éventuelles régulations post-traductionnelles de Spen.

L'analyse de l'expression de la GFP au sein de l'épithélium révèle un marquage nucléaire des cellules diploïdes (**Fig. 1B**), dont certaines exprimant le marqueur des cellules souches intestinales Delta (**Fig. 1B, panel inférieur**). Ceci confirme ainsi l'expression du gène *spen* dans les cellules souches. Une analyse plus approfondie des marqueurs des cellules Entéroendocrines et des cellules progéniteurs (les Entéroblastes) nous éclairera sur l'identité de ces autres cellules diploïdes *spen+*. La localisation nucléaire de cette protéine GFP de fusion est en cohérence avec les précédentes localisations de la protéine Spen observées dans d'autres tissus (**Chen & Rebay, 2000; Wielllette et al, 1999**). La présence d'individus homozygotes indique que l'allèle *spen-gfp* ne semble pas délétère. Ainsi, ces premières observations de l'expression de l'allèle *spen-gfp* suggèrent entre autres une expression du gène *spen* dans les cellules souches intestinales de drosophile.

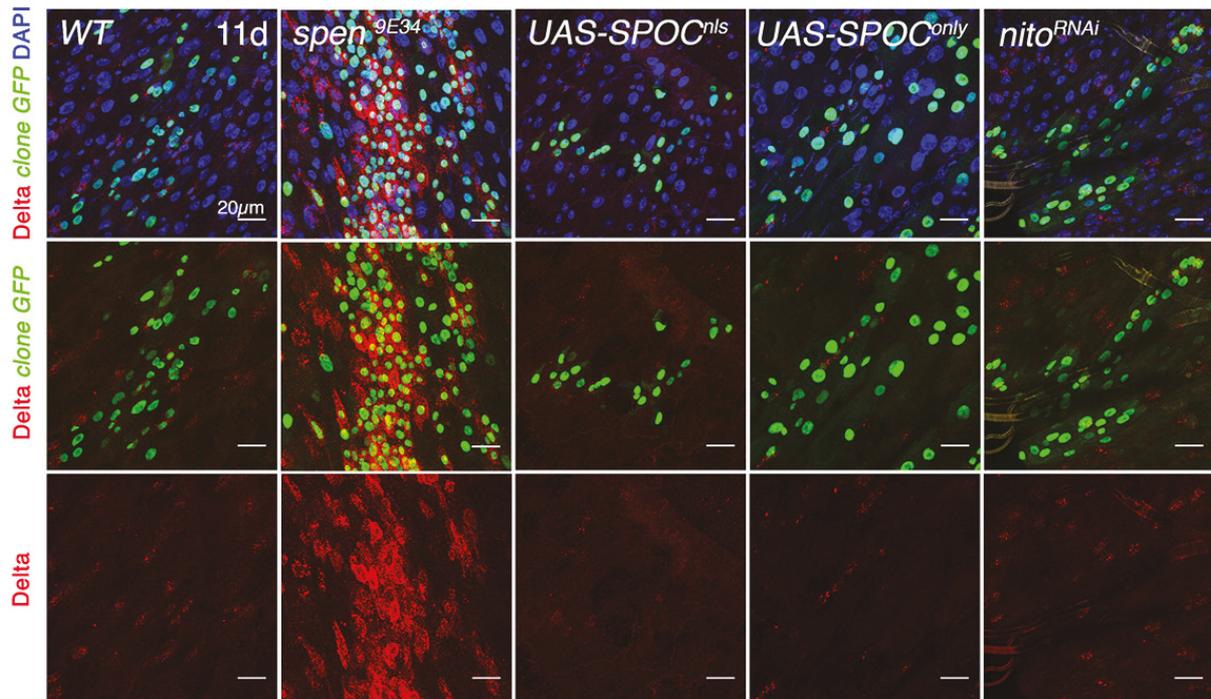


Figure 2. SPOC domain overexpression and *spenito* downregulation do not affect stem cell homeostasis. 11d MARCM clones (in green) were generated using *wild-type* alleles (*WT*, column 1), *spen*^{9E34} mutant allele (column 2), overexpression Spen SPOC domain containing nuclear localization signal – NLS (*UAS-SPOC*^{nls}, column 3) or without NLS signal (*UAS-SPOC*^{only}, column 4) and expressing a *spenito* RNAi (*nito*^{RNAi}, column 5). Stem cells were assessed by Delta+ expression (in red). Nuclei are stained with DAPI (in blue).

II. *Spenito* ne semble pas être un régulateur majeur des cellules souches intestinales de drosophile.

Le génome de drosophile présente deux gènes paralogues de la famille SPEN : *split-ends* (*spen*), et le gène *spenito* (*nito*) qui code une protéine de 793aa. Chez la drosophile, des interactions génétiques les présentent soit comme des antagonistes ((Jemc, 2006), soit comme des agonistes (Chang et al, 2008). Afin de tester si la fonction de *spen* dans la régulation des cellules souches intestinales est généralisable aux autres membres de la famille SPEN, nous avons analysé les effets liés à une diminution de l'expression du gène *nito* sur la composition en cellules de clones mitotiques, 11 jours après induction de la recombinaison mitotique. Celle-ci ne révèle pas de phénotypes apparents de dérégulation de la production de cellules souches au sein du tissu (**Fig. 2**). Ainsi, *spenito* ne joue pas de rôle dans l'homéostasie tissulaire intestinale.

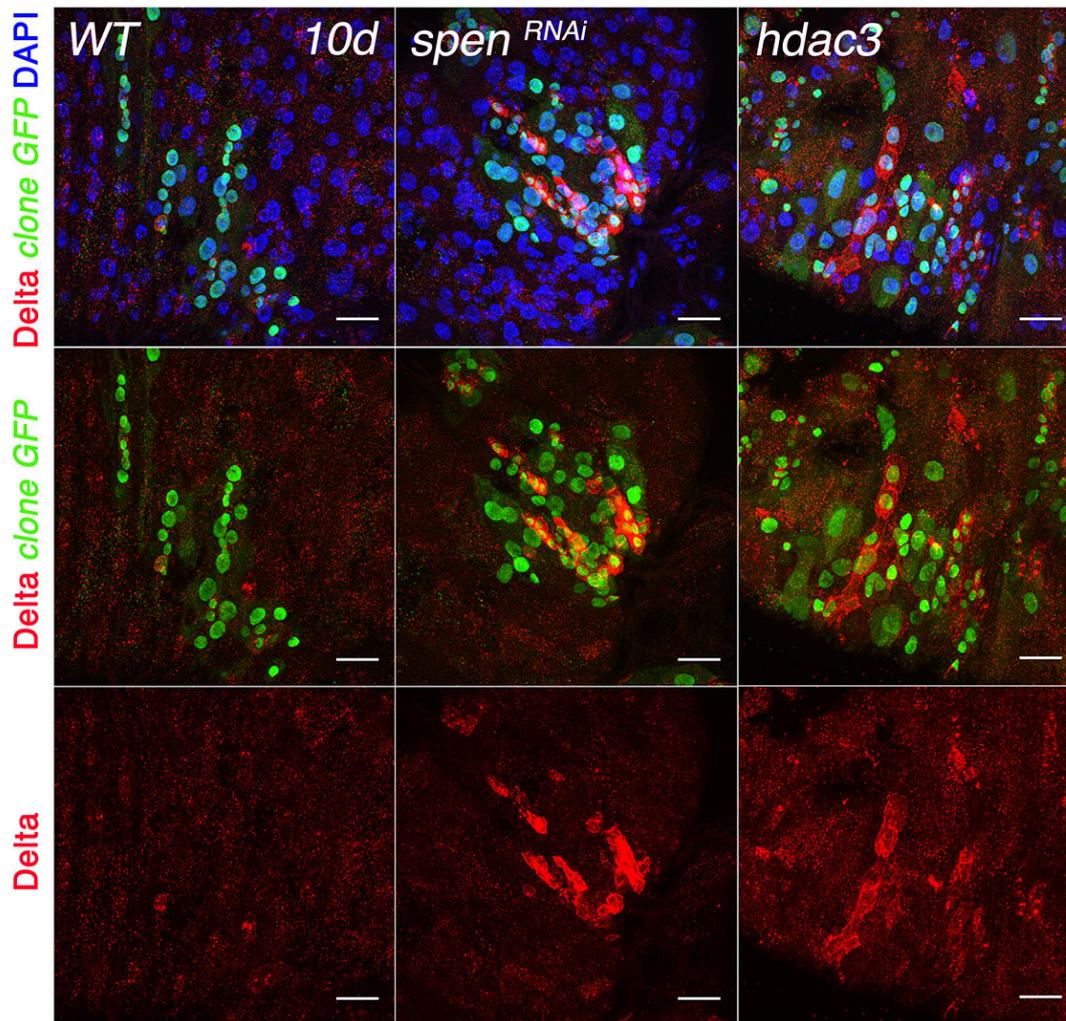


Figure 3. *hdac3* loss-of-function leads to an accumulation of stem cell-like cells with an enrichment of Delta protein at the membrane. Autonomous effect of a *hdac3* loss-of-function was assessed by MARCM clone. *Wild-type* clones (*WT*, column 1), clones expressing a *spen RNAi* (column 2) or *hdac3* mutant clones (*hdac3*, column 3) were observed 10d after heat shock induction (in green). Stem cells were assessed by Delta+ expression (in red). Nuclei are stained with DAPI (in blue).

III. HDAC3, un composant du complexe SPEN/NCoR/HDACs limite la production de cellules souches dans le tissu.

Les protéines de la famille SPEN sont des protéines associées à la régulation de mécanismes moléculaires se déroulant principalement dans le noyau (transcription, épissage et régulation de la polyadénylation alternative, export des ARNs vers le cytoplasme...) (Hiriart, 2005; Hornyik et al, 2010; Ma et al, 2007; Oswald et al, 2005; Yang et al, 2005). Elles sont également impliquées dans la répression de la transcription de gènes spécifiques en interagissant avec le complexe de Co-Represseurs NCoR/HDAC chez les mammifères (Malovannaya et al, 2011; Newberry et al, 1999).

Afin de tester si les partenaires connus de Spen connus chez les mammifères ont une fonction similaire dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches intestinales, nous avons analysé le phénotype d'une perte de fonction clonale du gène *hdac3* (**Fig. 3**). La composition en cellules souches des clones mitotiques a été évaluée par la présence de cellules exprimant le marqueur Delta. 10 jours après induction des clones MARCM, une accumulation de cellules de type souche chez le mutant *hdac3*, semble être similaire à celle observée lors d'une perte de fonction du gène *spen*. Le marqueur γ est également enrichi à la membrane. Ainsi, une inactivation du gène *hdac3* phénocopie le phénotype d'une perte de fonction du gène *spen*. Ces résultats préliminaires suggèrent que Hdac3 est important dans le contrôle de la production des cellules souches intestinales de drosophile.

Les interactions entre Spen et le complexe de co-répresseurs NCoR/HDAC sont entre autres dépendantes du domaine SPOC chez les mammifères (Ariyoshi & Schwabe, 2003 ; Mikami et al, 2013; Shi et al, 2001).

Afin d'évaluer les implications de ce domaine dans la régulation des cellules souches intestinales, une approche préliminaire a consisté à tester les phénotypes liés à une surexpression de ce-dernier. Chez la drosophile, une expression ectopique du domaine SPOC, s'avère avoir un effet de dominance négative vis-à-vis de *spen*. Elle reproduit en effet les phénotypes liés à une perte de fonction du gène *spen* au cours de l'embryogénèse et du développement de l'œil (Chen & Rebay, 2000; Lin et al, 2003). Ces effets seraient liés à la capacité de ce domaine à s'homodimériser (Li et al, 2005), agissant potentiellement comme un inhibiteur des protéines Spen endogènes. Dans l'intestin de drosophile, une surexpression clonale du domaine SPOC avec ou sans séquences de localisation nucléaire ne présente aucun phénotype apparent (**Fig. 2**). Une surexpression du domaine SPOC n'est ainsi

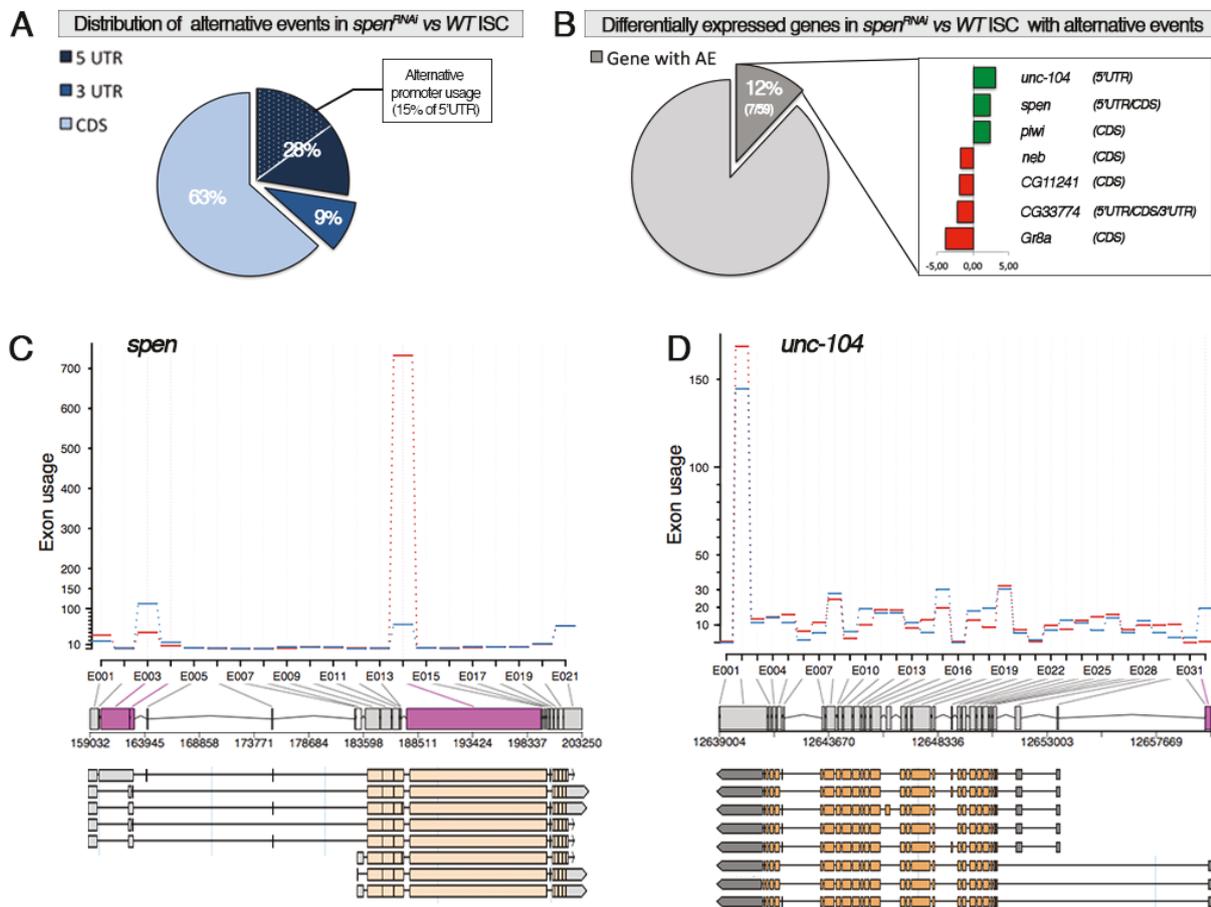


Figure 4. Distribution of alternative events dependent of Spen function. (A) Alternative event (AE) distribution between WT ISCs and *spen*^{RNAi}-expressing ISC, according to their gene body localization. 221 differentially expressed exons have been scored among 147 genes that present alternative event variations. **(B)** Distribution of genes with alternative event variations (7 genes) among the differentially expressed genes (59 genes) between WT ISCs and *spen*^{RNAi}-expressing ISC. **(C)** Exon usage between *spen*^{RNAi} (Red) vs WT ISC (Blue) for *spen* gene and *unc-104* gene. Quantification of the differential exon usage in *spen*^{RNAi} ISC compare to WT ISC using DEXseq reveals in *spen* gene, a significant downregulation of the exon E3-E4 expression level ($p_{\text{adj}}=1.1\text{e-}2$ and $p_{\text{adj}}=2.92\text{e-}8$ respectively) and a significant upregulation of the exon E14 expression level ($p_{\text{adj}}=5.33\text{e-}3$), which actually reflects *spen* shRNA overexpression. In *unc-104* gene, the exon E32 expression level was downregulated ($p_{\text{adj}}=1.03\text{e-}9$) in *spen*^{RNAi} ISC compare to WT ISC.

pas suffisante pour perturber la production de cellules souche dans l'intestin. Une expression ectopique de ces versions du domaine SPOC dans un contexte mutant pour le gène *spen* nous permettrait de savoir si ces constructions sont suffisantes à la suppression du phénotype lié à une perte de fonction du gène *spen*.

IV. Spen et la biogénèse des ARN

Etude de l'usage exonique dépendant de la fonction de Spen

En plus d'être impliquées dans la régulation transcriptionnelle, les protéines de la famille SPEN se révèlent également être importantes pour la régulation de processus liés à la biogénèse des ARN (épissage, polyadénylation alternative, export). Dans le but de déterminer si *spen* est impliqué dans des processus similaires, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une déplétion du gène *spen* sur la régulation post-transcriptionnelle, et plus précisément sur l'utilisation alternative de promoteurs et sur l'épissage polyadénylation alternatifs des transcrits exprimés dans les cellules souches. Notre stratégie a été de comparer l'usage exonique différentiel des transcrits issus de cellules souches sauvages ou exprimant un ARNi contre *spen*, en utilisant le programme DEXseq (Anders et al, 2012). Le calcul de l'usage exonique revient à estimer la fréquence d'usage d'un exon parmi l'ensemble des transcrits d'un gène donné. Pour cela, la couverture de l'exon étudié est calculée, c'est-à-dire le nombre de « *read* » couvrant cette région exonique, par rapport à la couverture de l'ensemble des autres exons du gène.

Cette analyse a mis en évidence 147 gènes présentant une variation significative de leur usage exonique en absence de Spen par rapport à des cellules souches sauvages. 63% de ces gènes présentent des variations d'usage exonique au niveau de leurs séquences codantes, 28% ont un défaut au niveau de leur région 5' non traduite (UTR) et 9% au niveau de leur 3'UTR. De manière intéressante, 54% des gènes avec une variation dans leur 5'UTR présentent un biais dans l'usage alternatif de leurs promoteurs, soit 15% des gènes totaux présentant un changement d'événements alternatifs (**fig. 4A**). Ainsi, Spen semble avoir un impact sur la régulation de la transcription au niveau de l'usage du type de promoteurs de gènes spécifiques ainsi que sur la maturation des ARNm dans les cellules souches.

Afin de tester si l'expression différentielle des gènes observée en absence de Spen n'est pas due à un défaut de maturation des transcrits ou à un biais dans l'utilisation des

promoteurs alternatifs, nous avons évalué la proportion de ces gènes présentant une variation de leur usage exonique (**fig. 4B**). Parmi les 59 gènes différentiellement exprimés en absence de *Spen* dans les cellules souches, 7 gènes (*Gr8a*, *CG33774*, *CG11241*, *neb*, *piwi*, *spen*, *unc-104*), soit 12%, présentent un usage exonique différentielle, pour la majorité localisée dans leur région codante.

De manière intéressante, le gène *spen* présente une surexpression significative de l'exon E14 ($p_{\text{adj}}=5.33\text{e-}3$), corrélée avec une surexpression de son expression génique. Ces données reflètent la surexpression de l'ARNi double brin utilisé pour dépléter *spen*. En cohérence avec ces observations, nos données de transcriptome présentent un pic de couverture spécifique localisée au niveau de l'exon E14 (données non montrées). Cette région correspond à la séquence d'hybridation de l'ARNi surexprimé. Le gène *spen* présente également une diminution significative ($\log_2(\text{E3}) = -1.47$ et $\log_2(\text{E4}) = -1.11$, $p_{\text{adj}} < 0.01$) des exons E3-E4, affectant ainsi sa région 5'UTR. Il n'est ainsi pas impossible d'exclure une éventuelle autorégulation de gène *spen*.

Le gène *unc-104*, surexprimé en absence de *Spen*, présente quant à lui une diminution significative de l'usage de son exon E32 ($\log_2 = -5.15$, $p_{\text{adj}} = 1.03\text{e-}9$) (**fig. 4D**) lors d'une inactivation du gène *spen* comparé au sauvage dans les cellules souches. Aucun défaut de l'usage exonique n'a été observé pour ce gène entre les cellules souches et les cellules Entéroblastes (données non montrées). Ces résultats suggèrent une utilisation préférentielle du promoteur proximal du gène *unc-104* en absence de *Spen*. Celui-ci régule la transcription des isoformes RI, RH, et RB du gène *unc-104*. Les deux promoteurs du gène *unc-104* semblent équitablement utilisés dans des cellules sauvages souches et des Entéroblastes. Ainsi en absence de *spen*, bien que le gène *unc-104* soit surexprimé, une hypothèse serait que seules les isoformes issues de l'activité du promoteur proximal seraient présents.

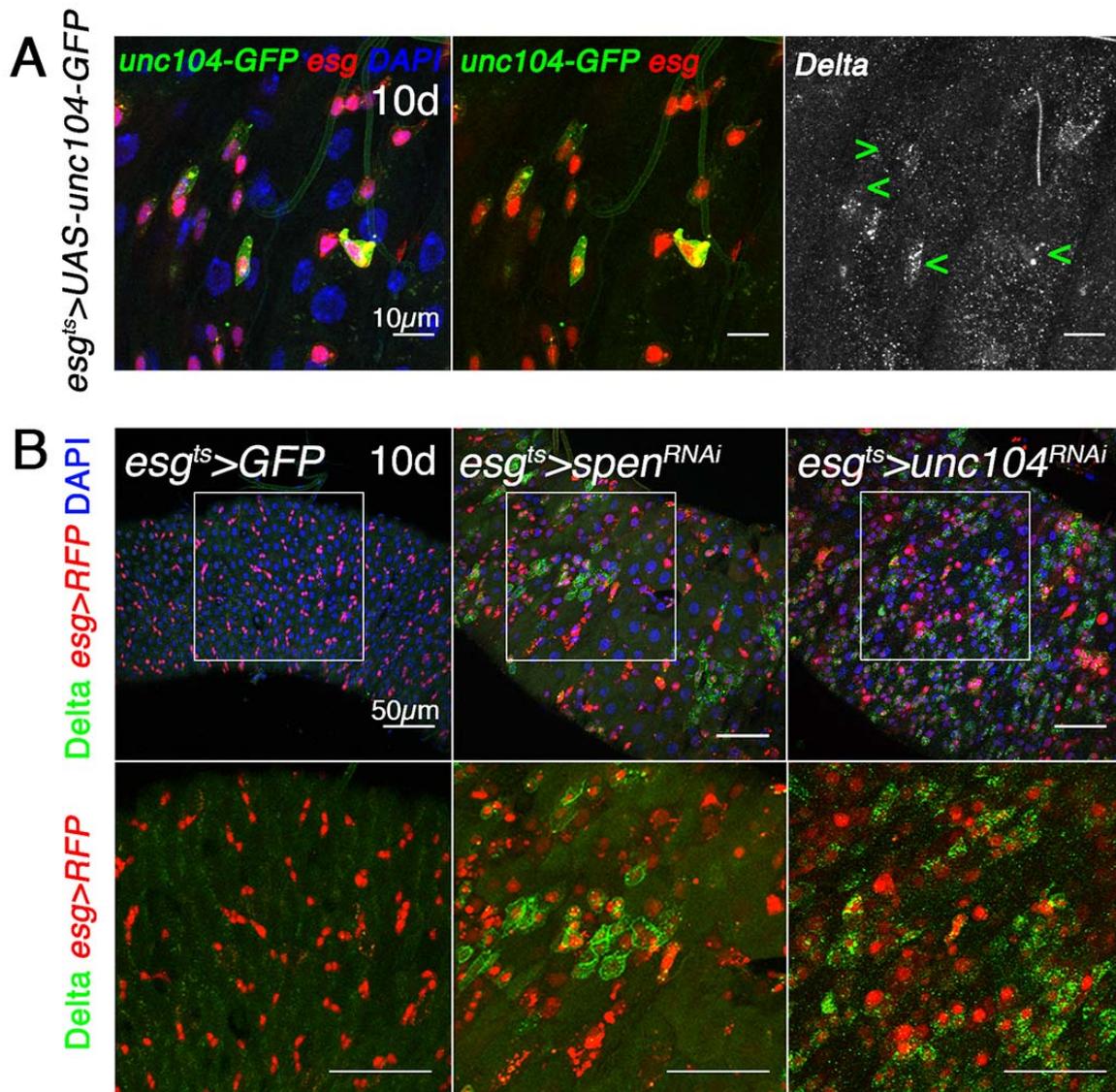


Figure 5. The Kinesin Unc-104/Klp53D/KIF1A is required for intestinal stem cell homeostasis (A) Localization of a GFP-fused Unc-104 protein (Green), ectopically expressed in stem cell and Enteroblasts (Red), under the control of $esg^{ts}>GAL4$ system. DNA (DAPI, Blue). **(B)** $spen^{RNAi}$ (column 2), $unc-104^{RNAi}$ (column 3) or $Klp61F^{RNAi}$ (column 4) were expressed specifically in stem cells and Enteroblast (Red) during 10 days, using $esg^{ts}>GAL4$ system. Delta were used as a stem cell marker (Green). DNA (DAPI, Blue).

Le cas de la régulation de la biogénèse des transcrits codant la Kinésine Unc-104/KIF1

Le gène *unc-104/KIF1* code une protéine de la famille des Kinésines-3, conservée chez *Dictyostelium*, *C. elegans*, *Drosophila* et chez les mammifères. Elle est impliquée dans le transport antérograde, c'est-à-dire vers la membrane en direction du pôle positif des microtubules, notamment des organelles, complexes protéiques et ARNm. Elle est également nécessaire à la synaptogénèse et processus impliqués dans la morphogénèse des dendrites (Bloom, 2001; Hirokawa et al, 2009; Kern et al, 2013).

Afin d'approfondir le rôle de *unc-104* dans la régulation des cellules souches intestinales, nous avons dans un premier temps surexprimé dans les cellules souches et les cellules Entéroblastes, une protéine de fusion Unc-104-GFP. Ce transgène présente une séquence d'ADN complémentaire du transcrit *unc-104* clonée en phase avec la *gfp*, sous le contrôle d'un élément UAS (Barkus et al, 2008). Le type d'isoforme exprimé n'a cependant pas été renseigné par les auteurs. Nous avons vérifié que cette expression ectopique ne produit pas de phénotype apparent de perturbation de l'homéostasie des cellules souches. Néanmoins, des variations d'expression de la protéine Unc-104-GFP au sein des cellules *esg+* (cellules souches et cellules Entéroblastes) ont pu être observées. Deux types de populations peuvent être définis d'après l'expression de Unc-104-GFP, mais ne corrélient pas avec un type cellulaire particulier. Une première est composée de cellules souches (Delta+ *esg+*) et cellules Entéroblastes (Delta- *esg+*) exprimant Unc-104-GFP, et une seconde présente des cellules souches et cellules Entéroblastes négatives pour l'expression de Unc-104-GFP (**Fig. 5A**). Cette expression non homogène du transgène *UAS-unc-104-GFP* semble ainsi être régulée de manière post-transcriptionnelle.

Curieusement, une inactivation de ce gène candidat dans les cellules souches et les cellules Entéroblastes produit l'opposé du phénotype escompté. En effet, dans l'hypothèse où la surexpression du gène *unc-104* serait l'une des causes de l'accumulation de cellules souches observée en absence de *Spen*, un phénotype opposé (perte de cellules souches) ou assimilé à un sauvage aurait été attendu lors d'une diminution de l'expression de *unc-104*. Nous observons cependant une accumulation de cellules souches lors d'une déplétion de *unc-104* (**Fig. 5B**), suggérant ainsi que la présence d'au moins un type d'isoforme de *unc-104* est important pour le maintien de l'homéostasie des cellules souches intestinales. En association avec les résultats obtenus lors de l'analyse des effets d'une déplétion de *spen* sur l'usage exonique, une hypothèse serait que l'augmentation de cellules souches mutantes

pour le gène *spen* pourrait en partie être due à une absence des isoformes issues du promoteur distal du gène *unc-104*.

V. Lark : un nouveau régulateur de l'homéostasie des cellules souches intestinales.

Une démarche parallèle à la caractérisation de la fonction du gène *spen* a consisté à mettre en place un « mini » crible par shARNi exprimés soit de manière spécifique dans les cellules souches et cellules Entéroblastes ($\text{esg}^{\text{ts}} > \text{GAL4}$), soit de manière clonale. Le but était d'identifier des gènes codant des protéines de liaison aux ARN ou impliquées dans leur biogénèse, importants pour la régulation de l'homéostasie des cellules souches intestinales. Deux gènes ont pu être identifiés : le gène *staufen* et le gène *lark*.

Le gène *lark* code une protéine de liaison aux ARN impliquée dans de multiples étapes de la biogénèse des ARN (Markus & Morris, 2009) : épissage, export des ARN, régulation de la traduction ou encore de leur stabilité. Dans l'intestin de drosophile, une inhibition de ce gène dans les cellules souches et cellules Entéroblastes, ou une inhibition de manière clonale, révèle une accumulation de cellules souches, avec un enrichissement en protéine Delta à leur membrane (**Fig. 6**). Ce phénotype n'est pas sans rappeler les effets observés lors d'une perte de fonction du gène *spen*. Ainsi, le gène *lark* semble être important pour limiter la production de cellules souches dans l'intestin de drosophile.

Le gène *staufen* code une protéine impliquée dans la localisation des ARNm au cours de processus développementaux comme l'ovogénèse, l'embryogénèse ou encore la neurogénèse. Une inhibition de *staufen* dans les cellules souches et cellules Entéroblastes est à l'origine d'une expansion de cellules Entéroblastes (esg^+ Delta-), sans accumulation massive de cellules souches, suggérant une augmentation de la prolifération plutôt qu'un défaut de différenciation (**Fig. 7**). Une analyse plus détaillée du phénotype lié à une perte de fonction du gène *staufen*, par une caractérisation précise de la composition en types cellulaires et de la croissance de clones mitotiques, permettra de corroborer ces observations.

Il est également à noter que l'inactivation des gènes *eiF4G*, *arrest*, *RsF1*, *SF1* et *SmD3*, impliqués dans le contrôle de la traduction, ou de l'épissage ne présentent aucun phénotype

apparent. Une réduction de la croissance clonale a cependant été observée lors d'une perte de fonction du gène *Rpp30*, qui code une ribonucléase impliquée dans la biogénèse des ARN de transferts (**Fig. 7**).

Bien qu'une étude plus approfondie de ces gènes soit nécessaire, ces résultats offrent de nouvelles pistes pour l'étude du rôle des protéines de liaison aux ARN dans la régulation des cellules souches adultes de l'intestin de drosophile.

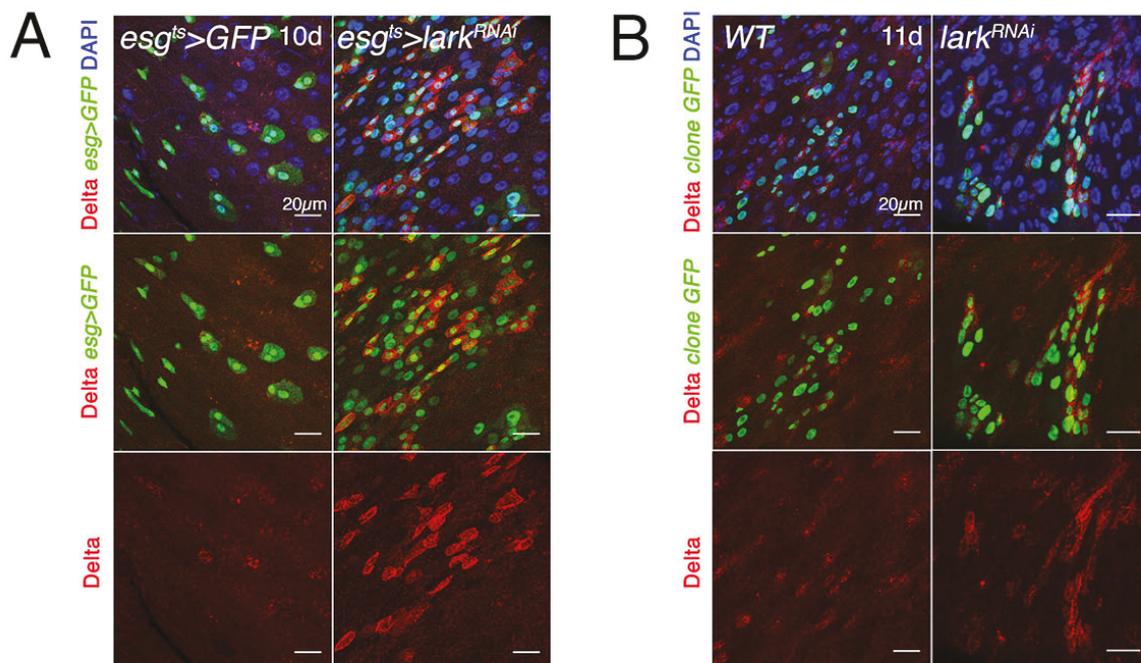


Figure 6. The RNA binding protein Lark is required in stem cell and/or progenitor cells to limit stem cell production in the intestine. (A) Inactivation of *lark* in ISC and EB (*esg*^{ts}>*GFP*) during 10d (in green). **(B)** Autonomous effect of a *lark* inactivation was assessed by MARCM clone. Clones (in green) expressing *lark*^{RNAi} were observed 11 days after heat shock induction. Stem cells were assessed by Delta+ expression (in red). Nuclei are stained with DAPI (in blue).

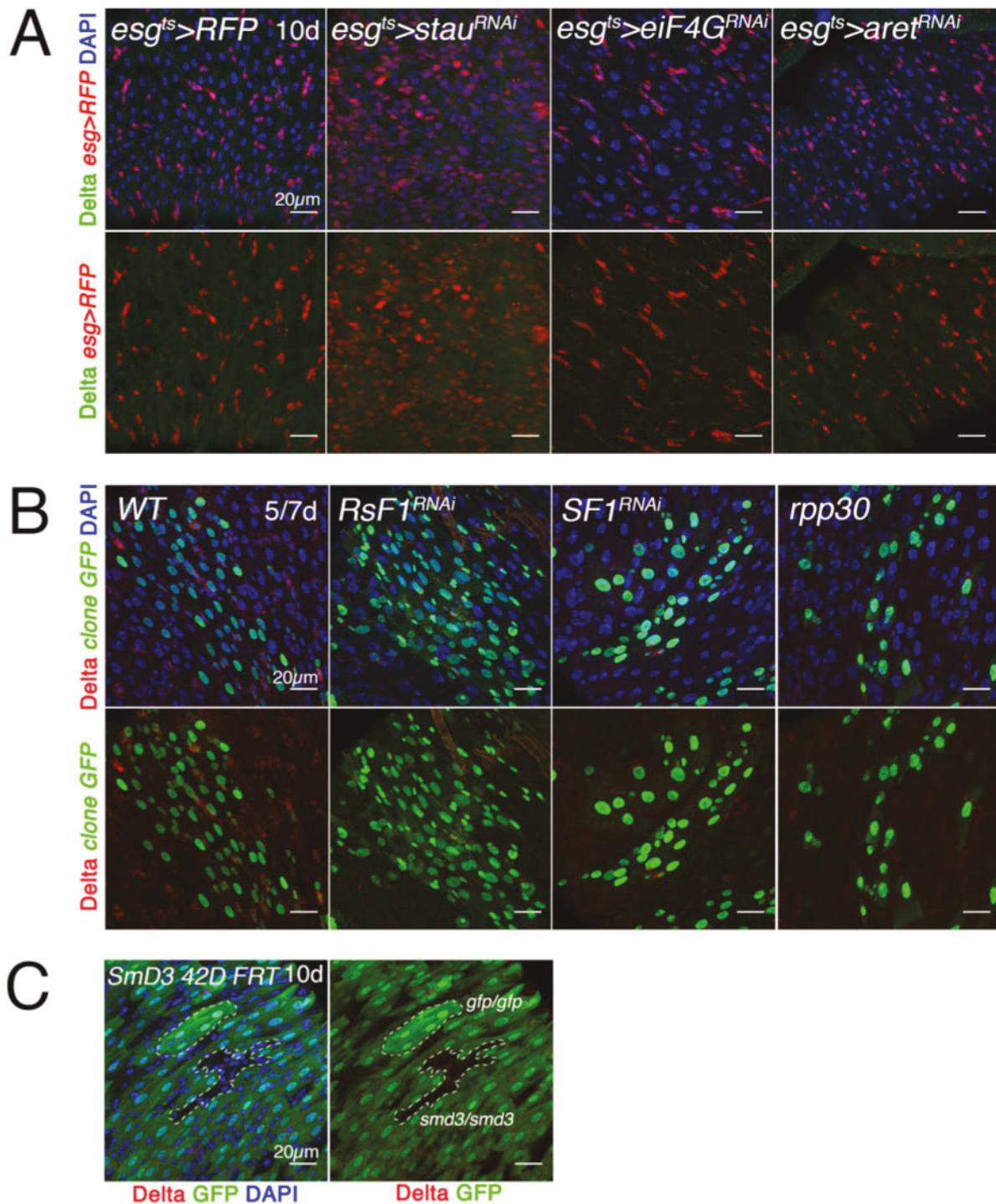


Figure 7. *staufen* is required to limit stem cell proliferation and expansion. (A) Inactivation of *staufen* (*stau*, column 2), *eiF4G* (column 3) or *arrest* (*aret*, column 4) in ISC and EB (*esg^{ts}>RFP*) during 10d (in red). Stem cells were assessed by Delta+ expression (in green). **(B)** Autonomous effect of the inactivation of the splicing factors *RsF1* and *SF1* and a loss-of-function of *rpp30* gene on intestinal stem cell MARCM clone growth and composition. Clones (in green) of wild-types alleles (column 1), expressing *RsF1^{RNAi}* (column 2) or *SF1^{RNAi}* (column 3), and homozygous for an *rpp30* mutant allele (column 4) were observed 11 days after heat shock induction. **(C)** Unmarked homozygous clones of a mutant allele of the Spliceosome protein encoding gene *Smd3* were observed 10 days after clone induction. Circle brighter GFP cells represent a WT homozygous clone. Stem cells were assessed by Delta+ expression (in red). Nuclei are stained with DAPI (in blue).

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. Quels sont les processus affectés par une perte de fonction du gène *spen* ?

L'identité moléculaire des cellules souches intestinales et de leurs progéniteurs

Nous avons pu montrer que d'une manière générale, les cellules souches intestinales sont associées à des fonctions liées à la régulation de la prolifération cellulaire, de la transduction de signaux intra- et extracellulaires, du trafic intracellulaire, ou encore de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes, alors que les cellules Entéroblastes sont associées à la régulation des processus métaboliques et des concentrations ioniques et protéiques intracellulaires. Ces fonctions moléculaires illustrent bien l'idée que les cellules souches sont des cellules sensibles aux variations environnementales, envoyant et recevant des signaux moléculaires leur permettant d'intégrer l'état tissulaire de leur lieu de résidence et donc de répondre en conséquence. Bien que certaines fonctions soient globalement communes à différentes cellules souches, en lien par exemple à leur capacité d'auto-renouvellement, d'autres fonctions moléculaires semblent être spécifiques d'un type de cellules souches données. Cette spécificité peut par exemple être en lien avec un mode de régulation qui leur est propre, comme la présence d'une niche pour les cellules souches germinales, ou une régulation systémique pour les cellules souches intestinales (Zeng et al, 2015).

De manière intéressante, la combinaison de nos données de séquençage des transcrits exprimés dans les cellules souches et dans les cellules Entéroblastes avec les données de crible par ARNi de Zeng *et al.* 2015 révèlent une absence de corrélation stricte entre le fait d'être spécifiquement exprimé dans les cellules souches comparé aux cellules Entréroblastes (c'est-à-dire le fait d'être un marqueur des cellules souches) et le fait d'avoir une fonction dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches. Inversement, un gène exprimé dans les deux types cellulaires peut avoir une fonction dans l'homéostasie aux cellules souches.

Une régulation de l'efficacité d'activation de la voie Notch

L'activation de la voie Notch constitue l'un des signaux majeurs de l'engagement des cellules souches intestinales sur la voie de la différenciation (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Une absence de signal est à l'origine d'une accumulation de cellules souches et de cellules entéroendocrines. Au contraire, une sur-activation de la voie force la différenciation des cellules souches en cellules Entérocytes. Dans le cadre d'une inactivation du gène *spen*, nous avons montré que les cellules souches étaient capables de répondre et d'activer la voie Notch, ce qui se traduit par leur différenciation en cellules Entérocytes. Nos résultats présentent Spen comme un agoniste de la voie Notch, dont l'action se positionnerait génétiquement en parallèle de l'activité nucléaire du récepteur Notch. Nous ne pouvons cependant pas exclure une fonction en amont de la voie Notch. Dans ce cas de figure, une hypothèse serait que Spen module l'efficacité d'activation de la voie Notch. En effet, une diminution partielle de l'activité de la voie Notch conduit à un défaut de spécification, traduit par une accumulation de cellules souches, sans que la production de cellules différenciées ne soit perturbée (Perdigoto et al, 2011). En d'autres termes, un biais en faveur des divisions symétriques est observé. Un certain niveau d'activation de la voie Notch est ainsi nécessaire au maintien des divisions asymétriques dans le tissu.

Comment expliquer l'action de *spen* dans la modulation de l'activation de Notch ? Une première hypothèse résulte de l'observation d'un enrichissement vésiculaire et membranaire du ligand Delta dans les cellules souches mutantes pour le gène *spen*. Spen pourrait ainsi être impliquée spécifiquement dans la régulation du ligand Delta à différents niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel ou protéique), influençant ainsi l'efficacité d'activation de la voie Notch. Cet enrichissement pourrait par exemple s'expliquer par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène *Delta* ou par une stabilisation de ses transcrits. Une augmentation de la production de transcrits *Delta* serait alors attendue. Nos données de séquençage des ARNm de cellules souches déplétées intestinales du gène *spen*, révèlent une absence d'expression différentielle de *Delta*, suggérant ainsi une potentielle régulation de son expression à un niveau traductionnel ou protéique, plutôt que transcriptionnel ou de ses transcrits.

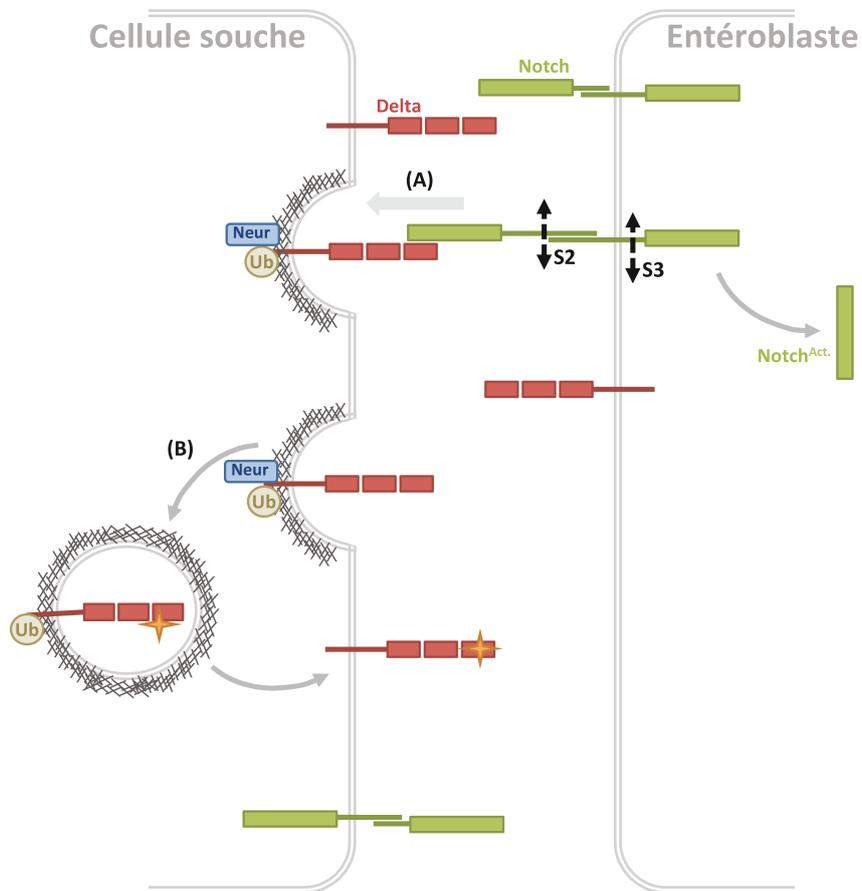


Figure 1. Schématisation de l'activation du récepteur Notch et de la régulation de son ligand Delta.
(A) L'interaction entre Notch et son ligand Delta entraîne un changement de conformation du récepteur Notch permettant le clivage (S2) de son domaine extracellulaire. À cette étape, l'endocytose de Delta faciliterait l'accessibilité du site de clivage S2. Ces événements sont suivis du dernier clivage (S3) à l'origine de la libération de son domaine intracellulaire, la forme active du récepteur (Notch^{Act.}). **(B)** L'endocytose de Delta est initiée par l'E3 Ubiquitine ligase Neuralized (Neur). Le recyclage de Delta permettrait la présentation d'une molécule plus efficace pour l'activation du récepteur Notch.

Une seconde question est de savoir si une augmentation du niveau intracellulaire de protéines Delta est suffisante à produire une accumulation de cellules souches. Au sein de l'intestin, une surexpression de *Delta* entraîne une perte de la formation de cellules Entéroendocrines en faveur de la production de cellules Entérocytes, sans affecter la croissance clonale (Beebe et al, 2010; Jiang et al, 2009). Ainsi, la surexpression seule de protéines Delta ne suffit pas à expliquer le phénotype d'une perte de fonction du gène *spen*. Une possibilité serait alors que l'absence de *Spen* ait un impacte sur le trafic intracellulaire de la protéine Delta.

L'efficacité d'activation de la voie Notch est finement régulée, au niveau des modifications post-traductionnelles du récepteur et de son ligand. En effet, différents modèles ont été proposés pour le rôle de la régulation du trafic intracellulaire de Delta dans le fonctionnement de la voie Notch (**fig. 1**). L'endocytose de Delta faciliterait d'une part le second clivage du récepteur Notch (pour revue : (Chitnis, 2006)) et donc son activation, et permettrait d'autre part la présentation d'une molécule Delta plus efficace à la membrane (Emery et al, 2005). L'inhibition de l'endocytose de Delta, par une inactivation de l'ubiquitine-ligase E3 Neuralized (Neur) (Bardin et al, 2010; Ohlstein & Spradling, 2007), phénocopie une absence d'activation de la voie Notch, c'est-à-dire une accumulation de cellules souches présentant une protéine Delta membranaire et de cellules Entéroendocrines, au détriment de la production de cellules Entérocytes. Une perturbation partielle de l'endocytose de Delta à l'origine du phénotype d'une inactivation de *spen* ne peut ainsi pas être exclue. Cette idée est confortée par l'interaction génétique de *spen* avec le gène *liquid facet/epsine* (Eun et al, 2007), qui code un adaptateur de Clathrine. Cette fonction de *Spen* ne semble cependant pas être conservée dans d'autres tissus, comme le montre une absence de perturbation de la localisation de la protéine Delta dans le *notum* (cf. nos données) et le disque d'aile de drosophile au cours du développement (Mace & Tugores, 2004).

Pour finir, une hypothèse non exclusive que nous développerons ultérieurement, découle de la fonction connue des homologues mammifères de *Spen* à réguler transcriptionnellement l'expression des gènes cibles de Notch par l'intermédiaire de la protéine de liaison à l'ADN Su(H)/RBPj. Dans ce dernier cas de figure, *Spen* participerait à la

détermination de la future cellule Entéroblaste, en parallèle de la voie Notch, en réprimant les gènes de l'identité souche. Ceci expliquerait par exemple le défaut de spécification des cellules souches observé en absence de *spen*.

L'absence de *spen* : un état de stress intestinal et une perte de l'intégrité tissulaire ?

En plus d'un défaut de spécification des cellules souches en absence de *spen*, un second aspect du phénotype repose sur une augmentation de la prolifération des cellules souches. Cette augmentation est certes liée à l'augmentation du nombre de cellules souches, mais est également causée par une augmentation de leur taux de division intrinsèque. En effet, la croissance clonale de cellules mutantes pour le gène *spen* peut être réduite par une déplétion de la voie de l'Insuline, une voie impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules souches intestinales (Amcheslavsky et al, 2009; Biteau et al, 2010; O'Brien et al, 2011; Wang et al, 2011). D'autres indices issus de nos données de séquençage, comme la surexpression des gènes cibles de la voie de la réponse immunitaire Imd (*pirk*, *AttC* et *cht2*) (Buchon et al, 2009b ; Kleino et al, 2008; Kuraishi et al, 2011; Lhocine et al, 2008), suggèrent une potentielle augmentation de la prolifération liée à une activation de la réponse immunitaire.

Au cours d'un stress environnemental, comme un dommage tissulaire, une exposition à des détergents ou une infection microbienne, différents signaux vont être perçus par les cellules souches. Ils sont le signal d'un tissu en état de « stress ». Ils sont généralement à l'origine de l'activation de la prolifération des cellules souches, permettant la production de nouvelles cellules épithéliales et donc le remplacement des cellules lésées. La voie de signalisation Imd est activée en réponse à une infection bactérienne Gram- et est nécessaire à la production de peptides antibactériens (Aggarwal et al, 2008; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Bien qu'elle ne soit pas nécessaire à la prolifération des cellules souches intestinales (Buchon et al, 2009b), est-elle suffisante à la stimulation de la prolifération ? Cette information n'est pas connue à ce jour. Une possibilité serait qu'une sur-activation de la voie Imd, rapportée par l'expression de ces gènes cibles, signalerait l'état d'un épithélium en stress. Les cellules souches activeraient alors leur prolifération en réponse.

Un autre point de vue serait qu'une dérégulation de la voie Imd en absence de *Spn*, du fait de la surexpression des répresseurs *Pirk* et *Tg* (Kleino et al, 2008; Shibata et al, 2013), favoriserait le développement des microorganismes pathogènes et commensaux de la flore

intestinale. Ainsi, l'augmentation de la prolifération observée lors d'une perte de fonction de *spen* pourrait refléter une infection bactérienne. Cette incapacité à limiter l'expansion de la flore intestinale pourrait expliquer l'hypersensibilité des mutants *spen* face aux infections microbiennes (Jin et al, 2009; Jin et al, 2008).

En contradiction avec l'observation d'une augmentation de la prolifération en absence de *Spn*, nos données transcriptomiques ne révèlent pas d'augmentation de l'expression de gènes associés à la régulation du cycle cellulaire ou à l'activation de voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération des cellules souches. Comment expliquer ce constat ? L'analyse de l'expression différentielle des gènes exprimés en absence de *Spn* révèle les transcrits exprimés deux jours après une inactivation du gène *spen*. Pendant cette fenêtre de temps, les cellules souches présentent un enrichissement vésiculaire et membranaire de protéines Delta, mais ne prolifèrent pas de manière aberrante. L'expansion des cellules souches est un phénotype tardif qui n'apparaît qu'à partir de 10 jours d'inactivation de *spen*.

Bien que nos données ne présentent pas de signe d'une augmentation de la prolifération, il est intéressant de noter qu'en cohérence avec cette apparition tardive du phénotype de prolifération lié à une déplétion de *spen*, que certains gènes candidats sous-exprimés comme le gène *cac*, semblent également être associés à une augmentation de la prolifération après dix jours d'inhibitions de leur expression.

Comment alors expliquer l'apparition tardive du phénotype de prolifération dans des mutants *spen* ? De manière intéressante, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des composants de la membrane péritrophique comme les polymères de chitin (*Cht2*, *Cpr51A*, *CG33258*), pourraient être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité de cette membrane (Kuraishi et al, 2011) et ainsi expliquer cette potentielle hypersensibilité aux infections microbiennes lors d'une perte de *spen* dans l'intestin. Ce phénomène pourrait également expliquer le phénotype lié à une inactivation embryonnaire du gène *spen*, à l'origine d'une perte de l'intégrité tissulaire (Mace & Tugores, 2004).

Les gènes cibles de Spen

Le gène *spen* est impliqué dans de nombreux processus cellulaires et développementaux (prolifération, différenciation, migration ou mort cellulaire), interagissant avec les voies de signalisation Notch, EGF-R et Wingless. Une hypothèse serait que Spen régule la production de cellules souches en contrôlant les voies de signalisation impliquées dans la régulation de leur auto-renouvellement et de leur spécification. En effet, nous avons montré que *spen* interagit génétiquement avec la voie Insuline, et également en amont ou en parallèle de la voie Notch. De manière intéressante, aucun gène codant des composants canoniques de voies de signalisations ne voit son expression affectée par une perte de fonction de *spen*. À l'inverse, une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de protéines membranaires ou sécrétées (Glycoprotéines, Hormones, protéines liées à une ancre Glycosyl-phosphatidylinositol [GPI]) est observée, et plus précisément une diminution de l'expression des gènes *CG11190* codant une Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-transamidase, *CG9505* codant une Metaloendopeptidase, *cht2* codant une Glycoside hydrolase, *Aats-ser* codant une Aminoacyl-tRNA synthase, *CG5867* codant une protéine de liaison aux hormones, *FAS2* codant une Acide gras synthase. Nous avons pu montrer qu'une déplétion de ces gènes par ARNi reproduisait partiellement le phénotype d'une perte de fonction du gène *spen*, montrant ainsi que ces gènes régulés par Spen sont importants pour la régulation des propriétés des cellules souches intestinales. Spen semble davantage participer à la régulation de mécanismes cellulaires précis qu'à une régulation directe des voies canoniques de signalisation.

La biosynthèse des ancrs GPI, un processus fondamental de l'homéostasie des cellules souches.

Les protéines liées à la membrane par des ancrs GPI (GPI-AP, pour « *GPI-anchored protein* ») constituent environ 0,5% des protéines des *Eumétazoaires* (Eisenhaber et al, 2001). On les retrouve notamment dans des processus tels que la reconnaissance immunitaire, la communication cellulaire ou encore la transduction de signaux. De manière intéressante, les GPI-transamidases, des enzymes importantes pour l'ajout des ancrs GPI aux protéines, ont suscité l'attrait des chercheurs du fait de leur association à certains cancers (Guo et al, 2004) (pour revue : (Gamage & Hendrickson, 2013)).

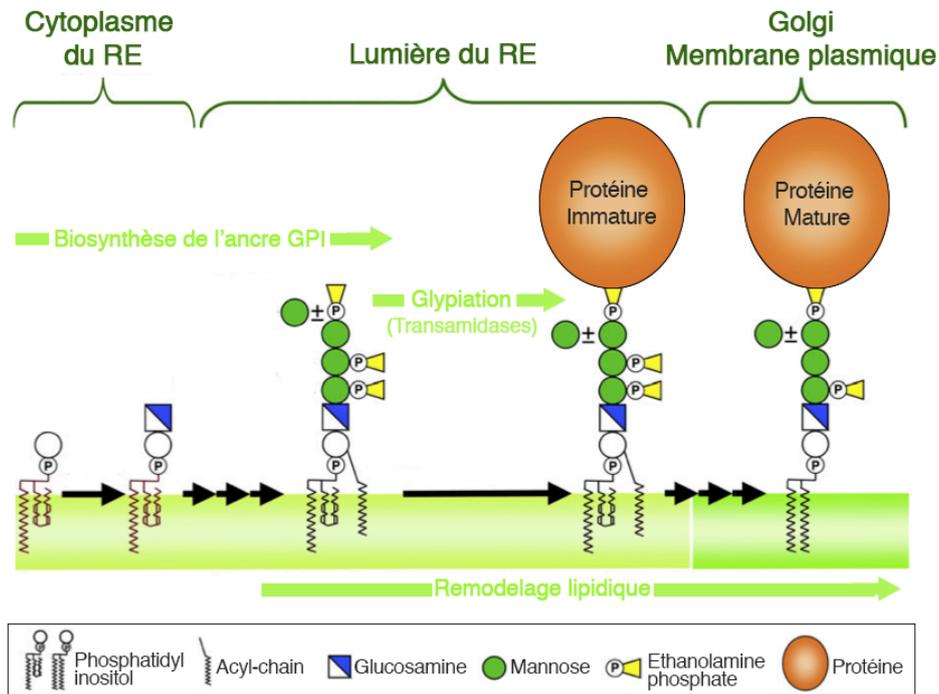


Figure 2. Les étapes de Biosynthèse des protéines liées aux ancres GPI. Cette chaîne de réactions est initiée dans le Réticulum Endoplasmique (RE) par le transfert d'un monosaccharide modifié par la suite dé-acétylé (Glucosamine) sur un Phosphatidylinositol (PI), puis de l'ajout séquentiel de groupements de mannose et l'éthanolamine-phosphate. Après biosynthèse, cette ancre GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol) est liée covalamment aux protéines dans la lumière du RE par des GPI-transamidases. On parle alors de Glypiation. La protéine liée à l'ancrage GPI est alors exportée vers l'appareil de Golgi où elle va subir d'autres modifications avant, son export cytoplasmique. (Adapté de (Fujita & Kinoshita, 2012))

Au cours de notre analyse de l'expression des gènes dépendante d'une activité du gène *spen*, nous avons pu mettre en évidence que le gène *CG11190*, homologue de la GPI-transamidase PIG-T (Ohishi et al, 2001), est important pour le contrôle de la production de cellules souches intestinales. Ainsi, une perte de la fonction du gène *spen* serait potentiellement associée à un dysfonctionnement de la chaîne de biosynthèse des ancres GPI.

Cette réaction en chaîne de biosynthèse est principalement localisée dans le Réticulum Endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi et fait intervenir des enzymes impliquées dans la synthèse, l'ancrage aux protéines, puis la maturation de l'ancre dans le Golgi avant l'export (**fig. 2**). Une question intéressante est de savoir si les effets observés lors d'une inactivation de *spen* sont dus à une perturbation globale de cette voie d'ancrage des GPI aux GPI-AP, ou alors dus à l'inactivation spécifique de la GPI-transamidase PIG-T. Dans le premier cas de figure, une récapitulation du phénotype *spen* est attendue, alors qu'une reproduction du phénotype *spen* en absence des membres du complexe des transamidases suggérera que cette étape de glypiation est importante pour la fonction de *spen* dans la régulation des cellules souches (**fig. 2**). Pour finir, une reproduction du phénotype limitée à la perte de fonction du gène *CG11190/PIG-T* suggérera une fonction spécifique de ce gène dans le contrôle de la production des cellules souches.

Un défaut de la biosynthèse des ancres GPI à l'origine d'une potentielle perturbation du réseau de molécules de signalisations ?

Les ancres GPI sont fusionnées à un nombre varié de molécules comprenant des récepteurs, des molécules d'adhésion cellulaire, ou encore des protéines sécrétées. La présence de ces ancres confère une localisation membranaire à ces protéines. Plus précisément, elles permettent l'adressage apical ou basal des GPI-AP selon le contexte cellulaire (pour revue : (Paladino et al, 2015)), et participent à l'organisation de la surface cellulaire et de leurs protéines associées au niveau des micro-domaines riches en cholestérol et sphingolipide (pour revue : (Fujita & Kinoshita, 2012)). Ainsi, de manière générale, la biosynthèse des ancres GPI semble être un mécanisme central de la diffusion, du trafic, de l'adressage et de la présentation à la membrane des molécules de signalisations. Cette idée est par exemple illustrée par la fonction des protéines liées à des ancres GPI : Dally et Dally-

like, dans la régulation des voies de signalisations Jak/STAT, Wingless et Hedgehog/Dpp (Wu et al, 2010; Zhang et al, 2013) (Takeo et al, 2005)(pour revue : (Beckett et al, 2008)), des voies également impliquées dans l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales. Ainsi, il n'est pas à exclure qu'une perturbation de la biosynthèse des ancrés GPI soit indirectement à l'origine d'une dérégulation du réseau des voies de signalisations. Ceci expliquerait la prolifération aberrante des cellules souches intestinales en absence de Spen.

De manière intéressante, l'endocytose des GPI-AP semble pouvoir influencer la présence membranaire du récepteur Notch (Shimizu et al, 2014). Habituellement dépendante des Clathrines, l'endocytose du récepteur Notch peut être orchestrée par un second mécanisme dépendant des micro-domaines lipidiques membranaires riches en stérol et des protéines associées aux ancrés GPI (Shimizu et al, 2014). Une possibilité, non démontrée à ce jour, serait que ces mécanismes contrôlent également le trafic intracellulaire de Delta, expliquant ainsi son enrichissement à la membrane observé lors d'une perte de fonction du gène *spen*, mais également l'accumulation de cellules souches.

II. Quelle est la fonction moléculaire de Spen dans la régulation du lignage intestinal ?

A la lumière de la combinaison d'études à grande échelle des interactomes chez les mammifères (Malovannaya et al, 2011; Vinayagam et al, 2011), et des propriétés biochimiques et structurales des domaines signatures de la famille SPEN, la protéine Spen semble être définie comme un facteur multifonctionnel, au cœur de la régulation de l'expression génique à différents niveaux : transcriptionnel (Newberry et al, 1999; Oswald et al, 2002; Sierra et al, 2004), post-transcriptionnel, avec le contrôle de l'épissage, de la polyadénylation alternative ou l'export de des ARN (Hornyik et al, 2010) (Wang et al, 2010) (Duc et al, 2013), ou encore des modifications post-traductionnelles des histones par l'intermédiaire de leurs interactions avec des histones déacétylases et méthyltransférases (Lee & Skalnik, 2012; Mikami et al, 2013; Shi et al, 2001). Compte tenu de ces détails sur la fonction moléculaire des homologues du gène *spen*, il serait intéressant de savoir si ces fonctions sont conservées chez la drosophile et plus précisément dans la régulation du lignage intestinal.

Spen, un potentiel répresseur de la transcription dans le contrôle de la production des cellules souches intestinales

Au cours de la spécification de l'une des cellules filles en cellule Entéroblaste après division de la cellule souche, il est intéressant de penser que les gènes nécessaires à la mise en place de l'identité « Entéroblaste » soient activés en parallèle d'une répression du programme d'identité « souche ». Ainsi, l'accumulation de cellules souches observée en absence de *spen* pourrait être due à une incapacité partielle à réprimer le programme d'identité « souche ». Cette potentielle fonction est par exemple illustrée par la présence de gènes spécifiquement exprimés dans les cellules souches intestinales, et qui se retrouvent « dé-réprimés » dans les cellules Entéroblastes en absence de Spen (*CG30031*, *Pebp1*, *CG8628*, *veil*, *CG15829*, *MalB1*) (**fig. 3**). Il serait intéressant de tester si une inhibition de ces gènes dans un contexte mutant pour *spen*, peut supprimer l'accumulation de cellules souches aberrantes. Inversement, aucun gène spécifiquement exprimé dans les cellules Entéroblastes ne se retrouve exprimé dans les cellules souches en l'absence de *spen*. La répression de ces gènes de l'identité « Entéroblaste » dans les cellules souches serait ainsi indépendante de la fonction de *spen*.

Ce mécanisme de répression transcriptionnelle pourrait potentiellement nécessiter la fonction de la protéine HDAC3, un partenaire connu de Spen chez les mammifères (McHugh et al, 2015), comme le suggère la reproduction de phénotype d'une perte de fonction du gène *spen* par une mutation du gène *hdac3*. Ainsi, une hypothèse intéressante serait que Spen ait une fonction de co-répresseur transcriptionnel en concomitance de l'action de l'HDAC3, dans la cellule fille destinée à devenir un progéniteur post-mitotique. Au vu de nos connaissances sur les propriétés des homologues de Spen, plusieurs approches peuvent être alors envisagées. Premièrement, l'acquisition récente d'une protéine endogène étiquetée avec la GFP compensera l'absence d'un outil biochimique comme l'absence d'anticorps, nous permettant ainsi de tester l'appartenance à un même complexe de Spen et HDAC3.

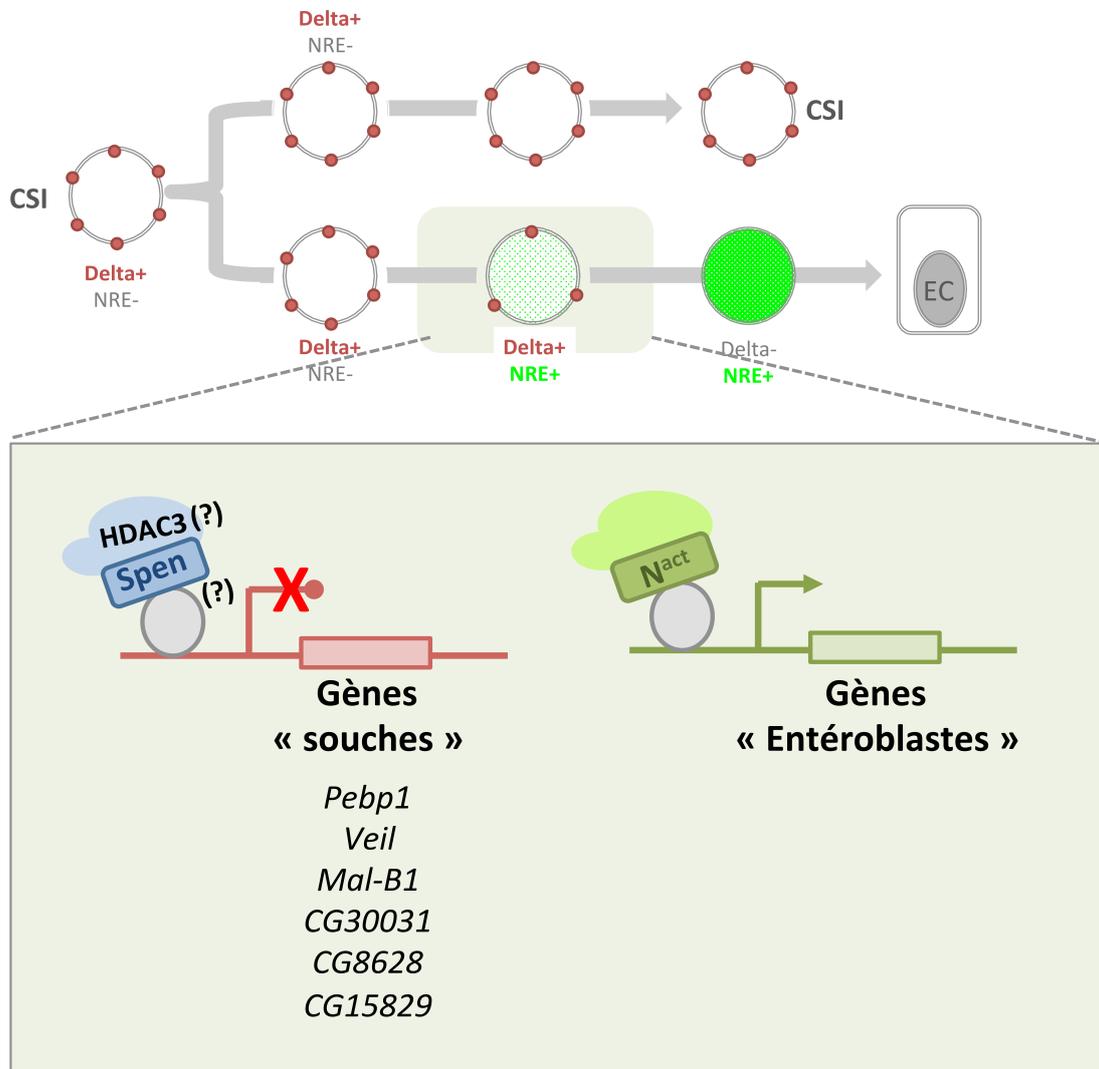


Figure 3. Un modèle d'action de Spen sur la répression transcriptionnelle au cours de la spécification des cellules souches. Au cours de la spécification de l'une des cellules filles en cellule Entéroblaste (Delta- NRE+) après division de la cellule souche (CSI), les gènes nécessaires à la mise en place de l'identité « Entéroblaste » seraient activés en parallèle d'une répression du programme d'identité « souche ». Spen, potentiellement aidé de l'histone déacétylase 3 (HDAC3) aurait un rôle de co-répresseur de l'activité des gènes de l'identité « souche ». Il s'agit ici d'une hypothèse qui reste à être démontrée.

Une solution alternative serait de mettre en place un test de lien entre protéines (traduis de l'anglais, « *Proximity Ligation Assay* », PLA) (Fredriksson et al, 2002), ce qui nous permettrait de visualiser cette appartenance à un même complexe *in vivo*. Un second axe tout autant intéressant serait de voir si ces deux protéines régulent des gènes cibles communs, mais également d'étudier l'impact de *spen* sur la distribution des marques d'histones. Ces questions pourraient être adressées en mettant en place une analyse transcriptomique de l'expression des gènes dépendante de HDAC3 dans les différents types cellulaires intestinaux, mais également par la technique du Dam-ID¹² (van Steensel & Henikoff, 2000) afin d'analyser l'enrichissement génomique des protéines Spen, HDAC3, mais également la Polymérase II dans un contexte mutant pour le gène *hdac3*¹³. Ceci nous permettrait d'obtenir les groupes de gènes potentiellement transcrits dans l'intestin, en plus de la distribution génomique des protéines Spen et HDAC3.

Spen et la régulation des ARN dans l'intestin de drosophile

Compte tenu du rôle des protéines de la famille SPEN dans la régulation de la biogenèse des ARN (épissage, polyadénylation, transport), un aspect que nous avons souhaité étudier au cours de ce travail de thèse est la relation entre Spen, la biogenèse des ARN et la régulation des cellules souches. À défaut d'outils biochimiques nous permettant une étude de l'interaction directe entre Spen et les molécules d'ARN, j'ai analysé l'effet d'une déplétion de *spen* sur l'usage exonique dans les cellules souches intestinales et cellules Entéroblastes.

Nous avons pu montrer que la biogenèse de certaines isoformes était dépendante de la fonction de *spen* dans l'intestin de drosophile. Ces événements alternatifs sont localisés le long de la structure génique : dans la région codante, mais également dans les régions non-traduites (5' UTR et 3' UTR). Une étude plus approfondie nous permettrait de déterminer 1) si ces événements alternatifs sont nécessaires à la mise en place du lignage intestinal, 2) s'ils

¹² La technique de DamID (pour « *DNA adenine methyltransferase identification* ») permet d'identifier la dispersion d'une protéine d'intérêt fusionnée à une ADN méthyltransferase. La drosophile ne présentant pas de méthylation de l'ADN, l'enrichissement génomique de cette protéine est ainsi indirectement évalué par la localisation des régions d'ADN méthylées par l'ADN méthyltransferase fusionnée à la protéine d'intérêt.

¹³ La protéine de fusion Dam-Pol II est par exemple utilisée dans la technique du TADA (Targeted DamID), mais sous forme de transgène sous le contrôle transcriptionnel d'un élément UAS Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH (2013) Cell-Type-Specific Profiling of Gene Expression and Chromatin Binding without Cell Isolation: Assaying RNA Pol II Occupancy in Neural Stem Cells. *Developmental cell*.

affectent la production protéique des gènes associés, ou 3) si Spen régule un évènement particulier (rétention d'intron, exclusion simple ou exclusion mutuelle d'exon, promoteur alternatif, sélection de sites alternatifs de polyadénylations).

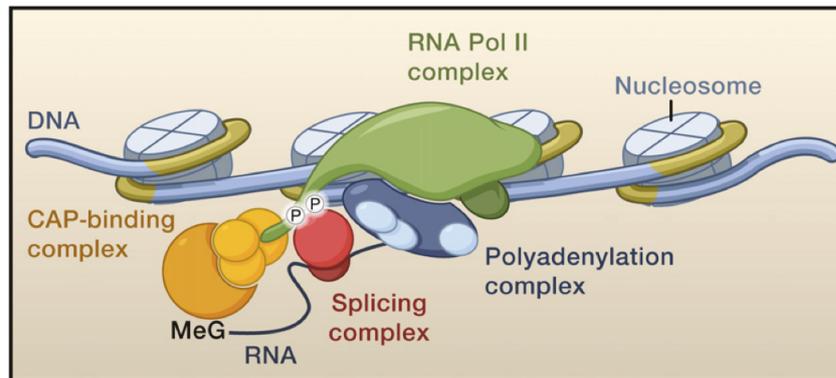


Figure 4. Couplage de la transcription et de la transcription. La polymérase II (en vert) recrute les facteurs de la biogenèse de l'ARN messenger comme le complexe de la coiffe 5' (en jaune), les facteurs d'épissage et du pré-spliceosome (en rouge), et de complexe de polyadénylation (en bleu). Ces évènements sont dépendants du contexte chromatinien, pouvant impacter par exemple sur la processivité de la polymérase II. (Figure issue de la revue de (Luco et al, 2011))

La régulation de la transcription d'un gène (choix du promoteur, processivité de la polymérase, marques d'histones) peut avoir un impact sur l'épissage et la polyadénylation de ses transcrits (de la Mata et al, 2003; Oktaba et al, 2015)(pour revue : (Luco et al, 2011)). Dans l'intestin de drosophile, nous avons pu mettre en évidence que la moitié des gènes présentant une variation dans leur 5'UTR exhibaient un biais dans l'usage alternatif de leurs promoteurs. Il serait intéressant d'étudier à quel point ce changement d'usage de promoteur peut affecter les profils d'épissage des transcrits associés et l'usage de leurs sites de polyadénylation.

De manière générale, on peut émettre l'hypothèse que cette co-régulation de l'épissage/polyadénylation et de la transcription implique des facteurs possédants cette double fonction régulatrice. Du fait de sa double casquette de régulateur transcriptionnel, notamment en interagissant avec des complexes co-répresseurs, des facteurs de modification de la chromatine ou encore les complexes Médiateur et post-transcriptionnels (Chu et al, 2015; Hornyik et al, 2010 ; Lee & Skalnik, 2012; Malovannaya et al, 2011; McHugh et al, 2015; Shi et al, 2001 ; Wang et al, 2010), Spen pourrait être un bon candidat impliqué

dans cette co-régulation. Nous avons montré qu'une inactivation du gène *hdac3* reproduit le phénotype d'accumulation de cellules souches intestinales et l'enrichissement de protéines Delta à la membrane observé lors d'une absence de *Spen*. Il serait ainsi intéressant dans un premier temps de tester si ces deux gènes, *spen* et *hdac3* sont fonctionnellement liés, puis d'analyser dans un second temps l'implication de l'HDAC3 dans l'expression des gènes et l'épissage de leurs transcrits associés dépendant de l'activité de *Spen*. En effet, il a notamment été montré qu'une modification de l'activité des HDAC pouvait influencer la processivité de la polymérase II et ainsi impacter sur la maturation du transcrit final (Hnilicova et al, 2011).

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal K, Rus F, Vriesema-Magnuson C, Erturk-Hasdemir D, Paquette N, Silverman N (2008) Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS pathogens* **4**: e1000120
- Amcheslavsky A, Ito N, Jiang J, Ip YT (2011) Tuberous sclerosis complex and Myc coordinate the growth and division of Drosophila intestinal stem cells. *The Journal of cell biology* **193**: 695-710
- Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT (2009) Tissue damage-induced intestinal stem cell division in Drosophila. *Cell Stem Cell* **4**: 49-61
- Amcheslavsky A, Nie Y, Li Q, He F, Tsuda L, Markstein M, Ip YT (2014) Gene expression profiling identifies the zinc-finger protein Charlatan as a regulator of intestinal stem cells in Drosophila. *Development* **141**: 2621-2632
- Anders S, Reyes A, Huber W (2012) Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome research* **22**: 2008-2017
- Arieti F, Gabus C, Tambalo M, Huet T, Round A, Thore S (2014) The crystal structure of the Split End protein SHARP adds a new layer of complexity to proteins containing RNA recognition motifs. *Nucleic acids research*
- Ariyoshi M, Schwabe JWR (2003) A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes & Development* **17**: 1909-1920
- Atanesyan L, Gunther V, Dichtl B, Georgiev O, Schaffner W (2012) Polyglutamine tracts as modulators of transcriptional activation from yeast to mammals. *Biol Chem* **393**: 63-70
- Baker NE, Yu SY (2001) The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing Drosophila eye. *Cell* **104**: 699-708
- Bardin AJ, Perdigoto CN, Southall TD, Brand AH, Schweisguth F (2010) Transcriptional control of stem cell maintenance in the Drosophila intestine. *Development* **137**: 705-714
- Barker N (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 19-33
- Barker N, van Es JH, Jaks V, Kasper M, Snippert H, Toftgard R, Clevers H (2008) Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **73**: 351-356
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003-1007

Barkus RV, Klyachko O, Horiuchi D, Dickson BJ, Saxton WM (2008) Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates retrograde transport of neuropeptides. *Molecular biology of the cell* **19**: 274-283

Barnard DC, Patton JG (2000) Identification and characterization of a novel serine-arginine-rich splicing regulatory protein. *Molecular and cellular biology* **20**: 3049-3057

Beckett K, Franch-Marro X, Vincent JP (2008) Glypican-mediated endocytosis of Hedgehog has opposite effects in flies and mice. *Trends in cell biology* **18**: 360-363

Beebe K, Lee W-C, Micchelli CA (2010) JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology* **338**: 28-37

Beehler-Evans R, Micchelli CA (2015) Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* **142**: 654-664

Beer RL, Draper BW (2013) nanos3 maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene nanos2 in the zebrafish ovary. *Developmental biology* **374**: 308-318

Beller M, Oliver B (2006) One hundred years of high-throughput *Drosophila* research. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **14**: 349-362

Bergmann A, Tugentman M, Shilo BZ, Steller H (2002) Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Developmental cell* **2**: 159-170

Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA (2003) The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**: 326-330

Bettencourt BR, Hogan CC, Nimali M (2007) Polyglutamine expansion in *Drosophila*: thermal stress and Hsp70 as selective agents. *J Biosci* **32**: 537-547

Beumer KJ, Carroll D (2014) Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*. *Methods* **68**: 29-37

Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H (2008) JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell* **3**: 442-455

Biteau B, Jasper H (2011) EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* **138**: 1045-1055

Biteau B, Jasper H (2014) Slit/Robo signaling regulates cell fate decisions in the intestinal stem cell lineage of *Drosophila*. *Cell reports* **7**: 1867-1875

- Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H (2010) Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genetics* **6**: e1001159
- Bloom GS (2001) The UNC-104/KIF1 family of kinesins. *Current opinion in cell biology* **13**: 36-40
- Bond D, Foley E (2012) Autocrine platelet-derived growth factor-vascular endothelial growth factor receptor-related (Pvr) pathway activity controls intestinal stem cell proliferation in the adult *Drosophila* midgut. *The Journal of biological chemistry* **287**: 27359-27370
- Boveri T (1892) Sitzungsber. d. Gesellschaft f. *Morphologie und Physiologie* **8**: 114–225
- Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 678-689
- Brinster RL, Zimmermann JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *PNAS* **91**: 11298-11302
- Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S, Lemaitre B (2009a) Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development* **23**: 2333-2344
- Buchon N, Broderick NA, Kuraishi T, Lemaitre B (2010) *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology* **8**: 152
- Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B (2009b) *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe* **5**: 200-211
- Buchon N, Osman D, David FP, Fang HY, Boquete JP, Deplancke B, Lemaitre B (2013) Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* **3**: 1725-1738
- Buchon N, Poidevin M, Kwon HM, Guillou A, Sottas V, Lee BL, Lemaitre B (2009c) A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *PNAS* **106**: 12442-12447
- Bultje RS, Castaneda-Castellanos DR, Jan LY, Jan YN, Kriegstein AR, Shi SH (2009) Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex. *Neuron* **63**: 189-202
- Buszczak M, Paterno S, Spradling AC (2009) *Drosophila* stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease scrawny. *Science* **323**: 248-251
- Caputto BL, Cardozo Gizzi AM, Gil GA (2014) c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. *Biochimica et biophysica acta* **1841**: 1241-1246

Carulli AJ, Keeley TM, Demitrack ES, Chung J, Maillard I, Samuelson LC (2015) Notch receptor regulation of intestinal stem cell homeostasis and crypt regeneration. *Developmental biology* **402**: 98-108

Chang JL, Lin HV, Blauwkamp TA, Cadigan KM (2008) Spenito and Split ends act redundantly to promote Wingless signaling. *Developmental Biology* **314**: 100-111

Chatterjee M, Ip YT (2009) Pathogenic stimulation of intestinal stem cell response in *Drosophila*. *Journal of cellular physiology* **220**: 664-671

Chen F, Rebay I (2000) split ends, a new component of the *Drosophila* EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Curr Biol* **10**: 943-946

Chitnis A (2006) Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn* **235**: 886-894

Choi NH, Kim JG, Yang DJ, Kim YS, Yoo MA (2008) Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* **7**: 318-334

Choi NH, Lucchetta E, Ohlstein B (2011) Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *PNAS* **108**: 18702-18707

Chu C, Zhang QC, da Rocha ST, Flynn RA, Bharadwaj M, Calabrese JM, Magnuson T, Heard E, Chang HY (2015) Systematic discovery of xist RNA binding proteins. *Cell* **161**: 404-416

Clevers H (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*: 313-319

Clevers H (2013) The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* **154**: 274-284

Clevers H, Loh KM, Nusse R (2014) Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* **346**: 1248012

Colley SM, Leedman PJ (2009) SRA and its binding partners: an expanding role for RNA-binding coregulators in nuclear receptor-mediated gene regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 25-33

Conboy MJ, Karasov AO, Rando TA (2007) High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS biology* **5**: e102

Cordero JB, Stefanatos RK, Myant K, Vidal M, Sansom OJ (2012a) Non-autonomous crosstalk between the Jak/Stat and Egfr pathways mediates Apc1-driven intestinal stem cell hyperplasia in the *Drosophila* adult midgut. *Development* **139**: 4524-4535

Cordero JB, Stefanatos RK, Scopelliti A, Vidal M, Sansom OJ (2012b) Inducible progenitor-derived Wntless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *The EMBO journal* **31**: 3901-3917

Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Development* **12**: 3715-3727

Crittenden SL, Leonhard KA, Byrd DT, Kimble J (2006) Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Molecular biology of the cell* **17**: 3051-3061

Crosnier C, Vargesson N, Gschmeissner S, Ariza-McNaughton L, Morrison A, Lewis J (2005) Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. *Development* **132**: 1093-1104

de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular cell* **12**: 525-532

de Navascues J, Perdigoto CN, Bian Y, Schneider MH, Bardin AJ, Martinez-Arias A, Simons BD (2012) *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. *Embo J* **31**: 2473-2485

Dickson BJ, van der Straten A, Dominguez M, Hafen E (1996) Mutations Modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development. *Genetics* **142**: 163-171

Doroquez DB, Orr-Weaver TL, Rebay I (2007) Split ends antagonizes the Notch and potentiates the EGFR signaling pathways during *Drosophila* eye development. *Mechanisms of Development* **124**: 792-806

Duc C, Sherstnev A, Cole C, Barton GJ, Simpson GG (2013) Transcription termination and chimeric RNA formation controlled by *Arabidopsis thaliana* FPA. *PLoS genetics* **9**: e1003867

Durand A, Donahue B, Peignon G, Letourneur F, Cagnard N, Slomianny C, Perret C, Shroyer NF, Romagnolo B (2012) Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *PNAS* **109**: 8965-8970

Durgan J, Kaji N, Jin D, Hall A (2011) Par6B and atypical PKC regulate mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* **286**: 12461-12474

Duszczuk MM, Wutz A, Rybin V, Sattler M (2011) The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. *RNA* **17**: 1973-1982

Dutta D, Edgar, BA. (2013) Facs isolation of major cell type from *drosophila* intestine. *Current Protocols*

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y (2011) Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**: 51-56

Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F (2001) Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng* **14**: 17-25

Emery G, Hutterer A, Berdnik D, Mayer B, Wirtz-Peitz F, Gaitan MG, Knoblich JA (2005) Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* **122**: 763-773

Eroglu E, Burkard TR, Jiang Y, Saini N, Homem CC, Reichert H, Knoblich JA (2014) SWI/SNF complex prevents lineage reversion and induces temporal patterning in neural stem cells. *Cell* **156**: 1259-1273

Escher D, Bodmer-Glavas M, Barberis A, Schaffner W (2000) Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Molecular and cellular biology* **20**: 2774-2782

Eun SH, Lea K, Overstreet E, Stevens S, Lee JH, Fischer JA (2007) Identification of genes that interact with *Drosophila* liquid facets. *Genetics* **175**: 1163-1174

Eun SH, Shi Z, Cui K, Zhao K, Chen X (2014) A non-cell autonomous role of E(z) to prevent germ cells from turning on a somatic cell marker. *Science* **343**: 1513-1516

Fei JF, Huttner WB (2009) Nonselective sister chromatid segregation in mouse embryonic neocortical precursor cells. *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**: i49-54

Firth L, Manchester J, Lorenzen JA, Baron M, Perkins LA (2000) Identification of genomic regions that interact with a viable allele of the *Drosophila* protein tyrosine phosphatase corkscrew. *Genetics* **156**: 733-748

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* **177**: 452-454

Foronda D, Weng R, Verma P, Chen YW, Cohen SM (2014) Coordination of insulin and Notch pathway activities by microRNA miR-305 mediates adaptive homeostasis in the intestinal stem cells of the *Drosophila* gut. *Genes & development* **28**: 2421-2431

Fortini ME (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Developmental cell* **16**: 633-647

Fortini ME, Bilder D (2009) Endocytic regulation of Notch signaling. *Curr Opin Genet Dev* **19**: 323-328

- Fox DT, Spradling AC (2009) The Drosophila Hindgut Lacks Constitutively Active Adult Stem Cells but Proliferates in Response to Tissue Damage. *Cell Stem Cell* **5**: 290-297
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**: 964-968
- Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gustafsdottir SM, Ostman A, Landegren U (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nature biotechnology* **20**: 473-477
- Freiman RN, Tjian R (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science* **296**: 2149-2150
- Fujita M, Kinoshita T (2012) GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochimica et biophysica acta* **1821**: 1050-1058
- Furriols M, Bray S (2001) A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Current biology : CB* **11**: 60-64
- Gamage DG, Hendrickson TL (2013) GPI transamidase and GPI anchored proteins: oncogenes and biomarkers for cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**: 446-464
- Garabedian EM, Roberts LJJ, McNevin MS, Gordon JI (1997) Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 23729-23740
- Geiser J, Venken KJ, De Lisle RC, Andrews GK (2012) A mouse model of acrodermatitis enteropathica: loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS genetics* **8**: e1002766
- Gellon G, Harding KW, McGinnis N, Martin MM, McGinnis W (1997) A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development. *Development* **124**: 3321-3331
- Goodfellow H, Krejci A, Moshkin Y, Verrijzer CP, Karch F, Bray SJ (2007) Gene-specific targeting of the histone chaperone asf1 to mediate silencing. *Developmental Cell* **13**: 593-600
- Goulas S, Conder R, Knoblich JA (2012) The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell stem cell* **11**: 529-540
- Guitart T, Picchioni D, Pineyro D, Ribas de Pouplana L (2013) Human mitochondrial disease-like symptoms caused by a reduced tRNA aminoacylation activity in flies. *Nucleic acids research* **41**: 6595-6608

Guo Z, Driver I, Ohlstein B (2013) Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. *The Journal of cell biology* **201**: 945-961

Guo Z, Linn JF, Wu G, Anzick SL, Eisenberger CF, Halachmi S, Cohen Y, Fomenkov A, Hoque MO, Okami K, Steiner G, Engles JM, Osada M, Moon C, Ratovitski E, Trent JM, Meltzer PS, Westra WH, Kiemenev LA, Schoenberg MP, Sidransky D, Trink B (2004) CDC91L1 (PIG-U) is a newly discovered oncogene in human bladder cancer. *Nature medicine* **10**: 374-381

Ha EM (2005) A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. *Science* **310**: 847-850

Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, Kim J, Lee WJ (2009) Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *drosophila* gut. *Nature immunology* **10**: 949-957

Haecker V (1892) *Archiv f mikr Anat* **39**: 556-581

Haeckel E (1868) *Natürliche Schöpfungsgeschichte*.

Haeckel E (1877) *Anthropogenie* **3rd edn**

Hirata J, Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matsuzaki F (1995) Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**: 627-630

Hiriart E (2005) Interaction of the Epstein-Barr Virus mRNA Export Factor EB2 with Human Splicing Proteins SHARP, OTT1, and a Novel Member of the Family, OTT3, Links Splicing Regulation and mRNA Export. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 36935-36945

Hirokawa N, Nitta R, Okada Y (2009) The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 877-884

Hiruma K, Riddiford LM (1985) Hormonal regulation of dopa decarboxylase during a larval molt. *Developmental biology* **110**: 509-513

Hiruma K, Riddiford LM (2009) The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **39**: 245-253

Hnilicova J, Hozeifi S, Duskova E, Icha J, Tomankova T, Stanek D (2011) Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PloS one* **6**: e16727

Hochmuth CE, Biteau B, Bohmann D, Jasper H (2011) Redox Regulation by Keap1 and Nrf2 Controls Intestinal Stem Cell Proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **8**: 188-199

Hornyik C, Terzi LC, Simpson GG (2010) The Spn Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Developmental Cell* **18**: 203-213

- Hsu YC, Li L, Fuchs E (2014) Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine* **20**: 847-856
- Jemc J (2006) Characterization of the split ends-Like Gene *spenito* Reveals Functional Antagonism Between SPOC Family Members During *Drosophila* Eye Development. *Genetics* **173**: 279-286
- Jiang H, Grenley MO, Bravo M-J, Blumhagen RZ, Edgar BA (2011) EGFR/Ras/MAPK Signaling Mediates Adult Midgut Epithelial Homeostasis and Regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **8**: 84-95
- Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA (2009) Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* **137**: 1343-1355
- Jin LH, Choi JK, Kim B, Cho HS, Kim J, Kim-Ha J, Kim YJ (2009) Requirement of Split ends for Epigenetic Regulation of Notch Signal-Dependent Genes during Infection-Induced Hemocyte Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 1515-1525
- Jin LH, Shim J, Yoon JS, Kim B, Kim J, Kim-Ha J, Kim YJ (2008) Identification and functional analysis of antifungal immune response genes in *Drosophila*. *PLoS Pathog* **4**: e1000168
- Jones DL, Rando TA (2011) Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nature Cell Biology* **13**: 506-512
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2007) The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134**: 1243-1251
- Kang KH, Reichert H (2015) Control of neural stem cell self-renewal and differentiation in *Drosophila*. *Cell and tissue research* **359**: 33-45
- Kaplan JM, Horvitz HR (1993) A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **90**: 2227-2231
- Karpowicz P, Morshead C, Kam A, Jervis E, Ramunas J, Cheng V, van der Kooy D (2005) Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *The Journal of cell biology* **170**: 721-732
- Karpowicz P, Pellikka M, Chea E, Godt D, Tepass U, van der Kooy D (2009) The germline stem cells of *Drosophila melanogaster* partition DNA non-randomly. *Eur J Cell Biol* **88**: 397-408
- Karpowicz P, Perez J, Perrimon N (2010) The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* **137**: 4135-4145
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**: 311-320

Kern JV, Zhang YV, Kramer S, Brenman JE, Rasse TM (2013) The kinesin-3, unc-104 regulates dendrite morphogenesis and synaptic development in *Drosophila*. *Genetics* **195**: 59-72

Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, Jackson TL, Morrison SJ (2007) Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* **449**: 238-242

Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT (2001) Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* **294**: 2542-2545

Kim M, McGinnis W (2011) Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *PNAS* **108**: 650-655

Kim TH, Escudero S, Shivdasani RA (2012) Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *PNAS* **109**: 3932-3937

Kim TH, Shivdasani RA (2011) Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *The Journal of biological chemistry* **286**: 11427-11433

Kimble JE, White JG (1981) On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* **81**: 208-219

Kleino A, Myllymaki H, Kallio J, Vanha-aho LM, Oksanen K, Ulvila J, Hultmark D, Valanne S, Ramet M (2008) Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *Journal of immunology* **180**: 5413-5422

Knoblich JA, Jan LY, Jan YN (1995) Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**: 624-627

Kohlmaier A, Fassnacht C, Jin Y, Reuter H, Begum J, Dutta D, Edgar BA (2015) Src kinase function controls progenitor cell pools during regeneration and tumor onset in the *Drosophila* intestine. *Oncogene* **34**: 2371-2384

Kolodziej PA, Jan LY, Jan YN (1995) Mutations that affect the length, fasciculation, or ventral orientation of specific sensory axons in the *Drosophila* embryo. *Neuron* **15**: 273-286

Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**: 216-233

Kuang B, Wu SC, Shin Y, Luo L, Kolodziej P (2000) split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* **127**: 1517-1529

Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**: 999-1010

Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, Buchon N, Lemaitre B (2011) Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **108**: 15966-15971

Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, Taniguchi Y, Kurooka H, Hamada Y, Toyokuni S, Honjo T (2003) Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* **18**: 301-312

Lancaster MA, Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**: 1247125

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**: 373-379

Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A, Lehner CF (2000) A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* **155**: 233-244

Lawrence M, Huber W, Pages H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, Morgan MT, Carey VJ (2013) Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS computational biology* **9**: e1003118

Lee JH, Skalnik DG (2012) Rbm15-Mkl1 Interacts with the Setd1b Histone H3-Lys4 Methyltransferase via a SPOC Domain That Is Required for Cytokine-Independent Proliferation. *PLoS one* **7**: e42965

Lee T, Luo L (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**: 451-461

Lee WC, Beebe K, Sudmeier L, Micchelli CA (2009) Adenomatous polyposis coli regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation. *Development* **136**: 2255-2264

Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697-743

Lemaitre B, Miguel-Aliaga I (2013) The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics* **47**: 377-404

Lhocine N, Ribeiro PS, Buchon N, Wepf A, Wilson R, Tenev T, Lemaitre B, Gstaiger M, Meier P, Leulier F (2008) PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell host & microbe* **4**: 147-158

Li H, Qi Y, Jasper H (2013a) Dpp signaling determines regional stem cell identity in the regenerating adult *Drosophila* gastrointestinal tract. *Cell Rep* **4**: 10-18

Li J, Yang X, Qin H, Zhou P, Liang Y, Han H (2005) The C terminus of MINT forms homodimers and abrogates MINT-mediated transcriptional repression. *Biochimica et biophysica acta* **1729**: 50-56

Li J., Barnard DC, JG aP (2002) A Unique Glutamic Acid-Lysine (EK) Domain Acts as a Splicing Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 39485-39492

Li Z, Zhang Y, Han L, Shi L, Lin X (2013b) Trachea-derived dpp controls adult midgut homeostasis in *Drosophila*. *Dev Cell* **24**: 133-143

Lin G, Xu N, Xi R (2008) Paracrine Wingless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature* **455**: 1119-1123

Lin G, Xu N, Xi R (2009) Paracrine Unpaired Signaling through the JAK/STAT Pathway Controls Self-renewal and Lineage Differentiation of *Drosophila* Intestinal Stem Cells. *Journal of Molecular Cell Biology* **2**: 37-49

Lin G, Zhang X, Ren J, Pang Z, Wang C, Xu N, Xi R (2013) Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Developmental biology* **377**: 177-187

Lin HV, Doroquez D.B., Cho S., Chen F., K.M. RlaC (2003) Splits ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development* **130**: 3125-3135

Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I (2014) Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood* **123**: 2451-2459

Losick VP, Morris LX, Fox DT, Spradling A (2011) *Drosophila* stem cell niches: a decade of discovery suggests a unified view of stem cell regulation. *Dev Cell* **21**: 159-171

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**: 550

Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T (2011) Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**: 16-26

Lyons R, Iwase A, Gansewig T, Sherstnev A, Duc C, Barton GJ, Hanada K, Higuchi-Takeuchi M, Matsui M, Sugimoto K, Kazan K, Simpson GG, Shirasu K (2013) The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Sci Rep* **3**: 2866

Ma X, Renda MJ, Wang L, Cheng EC, Niu C, Morris SW, Chi AS, Krause DS (2007) Rbm15 modulates Notch-induced transcriptional activation and affects myeloid differentiation. *Molecular and cellular biology* **27**: 3056-3064

- Mace K, Tugores A (2004) **The product of the split ends gene is required for the maintenance of positional information during Drosophila development.** *BMC Developmental Biology* **4**: 15
- Mace KA, Pearson JC, McGinnis W (2005) An Epidermal Barrier Wound Repair Pathway in Drosophila Is Mediated by grainy head. *Science* **308**: 381-385
- Malovannaya A, Lanz RB, Jung SY, Bulynko Y, Le NT, Chan DW, Ding C, Shi Y, Yucer N, Krenciute G, Kim BJ, Li C, Chen R, Li W, Wang Y, O'Malley BW, Qin J (2011) Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* **145**: 787-799
- Marianes A, Spradling AC (2013) Physiological and stem cell compartmentalization within the Drosophila midgut. *Elife* **2**: e00886
- Markus MA, Morris BJ (2009) RBM4: a multifunctional RNA-binding protein. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 740-743
- Matos CA, de Macedo-Ribeiro S, Carvalho AL (2011) Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol* **95**: 26-48
- McGuire SE, Mao Z, Davis RL (2004) Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in Drosophila. *Sci STKE* **2004**: pl6
- McHugh CA, Chen CK, Chow A, Surka CF, Tran C, McDonel P, Pandya-Jones A, Blanco M, Burghard C, Moradian A, Sweredoski MJ, Shishkin AA, Su J, Lander ES, Hess S, Plath K, Guttman M (2015) The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature*
- McLeod CJ, Wang L, Wong C, Jones DL (2010) Stem cell dynamics in response to nutrient availability. *Curr Biol* **20**: 2100-2105
- Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Nguyen Khac F, Gressin L, Mugneret F, Leblanc T, Dastugue N, Berger R, Bernard OA (2001) Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *PNAS* **98**: 5776-5779
- Micchelli CA, Perrimon N (2006) Evidence that stem cells reside in the adult Drosophila midgut epithelium. *Nature* **439**: 475-479
- Mikami S, Kanaba T, Ito Y, Mishima M (2013) NMR assignments of SPOC domain of the human transcriptional corepressor SHARP in complex with a C-terminal SMRT peptide. *Biomol NMR Assign* **7**: 267-270
- Mikami S, Kanaba T, Takizawa N, Kobayashi A, Maesaki R, Fujiwara T, Ito Y, Mishima M (2014) Structural insights into the recruitment of SMRT by the corepressor SHARP under phosphorylative regulation. *Structure* **22**: 35-46

Minajigi A, Froberg JE, Wei C, Sunwoo H, Kesner B, Cognori D, Lessing D, Payer B, Boukhali M, Haas W, Lee JT (2015) A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science*

Mlacki M, Darido C, Jane SM, Wilanowski T (2014) Loss of Grainy head-like 1 is associated with disruption of the epidermal barrier and squamous cell carcinoma of the skin. *PloS one* **9**: e89247

Moindrot B, Cerase A, Coker H, Masui O, Grijzenhout A, Pintacuda G, Schermelleh L, Nesterova TB, Brockdorff N (2015) A Pooled shRNA Screen Identifies Rbm15, Spen, and Wtap as Factors Required for Xist RNA-Mediated Silencing. *Cell reports* **12**: 562-572

Monfort A, Di Minin G, Postlmayr A, Freimann R, Arieti F, Thore S, Wutz A (2015) Identification of Spen as a Crucial Factor for Xist Function through Forward Genetic Screening in Haploid Embryonic Stem Cells. *Cell reports* **12**: 554-561

Montagne C, Gonzalez-Gaitan M (2014) Sara endosomes and the asymmetric division of intestinal stem cells. *Development* **141**: 2014-2023

Montgomery RK, Breault DT (2008) Small intestinal stem cell markers. *J Anat* **213**: 52-58

Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y (2012) Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell stem cell* **10**: 771-785

Napoletano F, Occhi S, Calamita P, Volpi V, Blanc E, Charroux B, Royet J, Fanto M (2011) Polyglutamine Atrophin provokes neurodegeneration in *Drosophila* by repressing fat. *The EMBO journal* **30**: 945-958

Negishi M, Oinuma I, Katoh H (2005) Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1363-1371

Newberry EP, Latifi T, Towler DA (1999) The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* **38**: 10678-10690

Niessen MT, Iden S, Niessen CM (2012) The in vivo function of mammalian cell and tissue polarity regulators--how to shape and maintain the epidermal barrier. *Journal of cell science* **125**: 3501-3510

Ninov N, Borius M, Stainier DYR (2012) Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* **139**: 1557-1567

Nobrega RH, Greebe CD, van de Kant H, Bogerd J, de Franca LR, Schulz RW (2010) Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PloS one* **5**

O'Brien Lucy E, Soliman Sarah S, Li X, Bilder D (2011) Altered Modes of Stem Cell Division Drive Adaptive Intestinal Growth. *Cell* **147**: 603-614

Ohishi K, Inoue N, Kinoshita T (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *The EMBO journal* **20**: 4088-4098

Ohlstein B, Spradling A (2006) The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439**: 470-474

Ohlstein B, Spradling A (2007) Multipotent *Drosophila* Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling. *Science* **315**: 988-992

Oktaba K, Zhang W, Lotz TS, Jun DJ, Lemke SB, Ng SP, Esposito E, Levine M, Hilgers V (2015) ELAV links paused Pol II to alternative polyadenylation in the *Drosophila* nervous system. *Molecular cell* **57**: 341-348

Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knochel W, Liptay S, Schmid RM (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *The EMBO journal* **21**: 5417-5426

Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knochel W, Borggreffe T (2005) RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Molecular and cellular biology* **25**: 10379-10390

Paladino S, Lebreton S, Zurzolo C (2015) Trafficking and Membrane Organization of GPI-Anchored Proteins in Health and Diseases. *Curr Top Membr* **75**: 269-303

Pappenheim A (1896) *Virchows Arch* **145**: 587-643

Park JS, Kim YS, Yoo MA (2009) The role of p38b MAPK in age-related modulation of intestinal stem cell proliferation and differentiation in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)* **1**: 637-651

Parry L, Young M, El Marjou F, Clarke AR (2013) Evidence for a crucial role of paneth cells in mediating the intestinal response to injury. *Stem cells* **31**: 776-785

Pearson JC, Juarez MT, Kim M, Drivenes O, McGinnis W (2009) Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*. *PNAS* **106**: 2224-2229

Perdigoto CN, Schweisguth F, Bardin AJ (2011) Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* **138**: 4585-4595

Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**: 575-608

- Potten CS, Booth C, Pritchard DM (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* **78**: 219-243
- Querenet M, Goubard V, Chatelain G, Davoust N, Mollereau B (2015) Spen is required for pigment cell survival during pupal development in *Drosophila*. *Developmental biology* **402**: 208-215
- Raffel GD, Mercher T, Shigematsu H, Williams IR, Cullen DE, Akashi K, Bernard OA, Gilliland DG (2007) Ott1(Rbm15) has pleiotropic roles in hematopoietic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 6001-6006
- Rebay I, Chen F, Hsiao F, Kolodziej PA, Kuang BH, Laverty T, Suh C, Voas M, Williams A, Rubin GM (2000) A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* **154**: 695-712
- Ren F, Wang B, Yue T, Yun EY, Ip YT, Jiang J (2010) Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 21064-21069
- Ren W, Zhang Y, Li M, Wu L, Wang G, Baeg GH, You J, Li Z, Lin X (2015) Windpipe Controls *Drosophila* Intestinal Homeostasis by Regulating JAK/STAT Pathway via Promoting Receptor Endocytosis and Lysosomal Degradation. *PLoS genetics* **11**: e1005180
- Rhyu MS, Jan LY, Jan YN (1994) Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**: 477-491
- Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY, Hogan BL (2011) Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell stem cell* **8**: 639-648
- Sanchez-Pulido L, Rojas AM, van Wely KH, Martinez AC, Valencia A (2004) SPOC: a widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription. *BMC Bioinformatics* **5**: 91
- Sanchez-Soriano N, Tear G, Whittington P, Prokop A (2007) *Drosophila* as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. *Neural Dev* **2**: 9
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**: 262-265
- Schepers AG, Vries R, van den Born M, van de Wetering M, Clevers H (2011) Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *The EMBO Journal* **30**: 1104-1109
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**: 7-25

Shaw RL, Kohlmaier A, Polesello C, Veelken C, Edgar BA, Tapon N (2010) The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* **137**: 4147-4158

Shi Y, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai CC, Hon M, Evans RM (2001) Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes & development* **15**: 1140-1151

Shibata T, Sekihara S, Fujikawa T, Miyaji R, Maki K, Ishihara T, Koshiba T, Kawabata S (2013) Transglutaminase-catalyzed protein-protein cross-linking suppresses the activity of the NF-kappaB-like transcription factor relish. *Sci Signal* **6**: ra61

Shim MS, Kim JY, Lee KH, Jung HK, Carlson BA, Xu XM, Hatfield DL, Lee BJ (2011) I(2)01810 is a novel type of glutamate transporter that is responsible for megamitochondrial formation. *The Biochemical journal* **439**: 277-286

Shimizu H, Woodcock SA, Wilkin MB, Trubenova B, Monk NA, Baron M (2014) Compensatory flux changes within an endocytic trafficking network maintain thermal robustness of Notch signaling. *Cell* **157**: 1160-1174

Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature cell biology* **8**: 677-687

Sierra OL, Cheng SL, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, Towler DA (2004) MINT, the Msx2 interacting nuclear matrix target, enhances Runx2-dependent activation of the osteocalcin fibroblast growth factor response element. *The Journal of biological chemistry* **279**: 32913-32923

Singh SR, Liu W, Hou SX (2007) The adult *Drosophila* malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells. *Cell stem cell* **1**: 191-203

Singh SR, Zeng X, Zheng Z, Hou SX (2011) The adult *Drosophila* gastric and stomach organs are maintained by a multipotent stem cell pool at the foregut/midgut junction in the cardia (proventriculus). *Cell Cycle* **10**: 1109-1120

Smith GH (2005) Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* **132**: 681-687

Sotiropoulou PA, Candi A, Blanpain C (2008) The majority of multipotent epidermal stem cells do not protect their genome by asymmetrical chromosome segregation. *Stem cells* **26**: 2964-2973

Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH (2013) Cell-Type-Specific Profiling of Gene Expression and Chromatin Binding without Cell Isolation: Assaying RNA Pol II Occupancy in Neural Stem Cells. *Developmental cell*

Spana EP, Doe CQ (1995) The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**: 3187-3195

Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF, Wells JM (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**: 105-109

Staebling-Hampton K, Ciampa PJ, Brook A, Dyson N (1999) A genetic screen for modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **153**: 275-287

Staley BK, Irvine KD (2010) Warts and Yorkie Mediate Intestinal Regeneration by Influencing Stem Cell Proliferation. *Current Biology* **20**: 1580-1587

Stanger BZ, Datar R, Murtaugh LC, Melton DA (2005) Direct regulation of intestinal fate by Notch. *PNAS* **102**: 12443-12448

Steinhauser ML, Bailey AP, Senyo SE, Guillemer C, Perlstein TS, Gould AP, Lee RT, Lechene CP (2012) Multi-isotope imaging mass spectrometry quantifies stem cell division and metabolism. *Nature* **481**: 516-519

Stemerink C, Jacobs JR (1997) Argos and Spitz group genes function to regulate midline glial cell number in *Drosophila* embryos. *Development* **124**: 3787-3796

Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H (2012) Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* **3**: 8

Suzuki Y, Yazawa I (2011) Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubralpallidoluysian atrophy. *Int J Clin Exp Pathol* **4**: 378-384

Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R (2014) Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **14**: 53-67

Takasato M, Er PX, Becroft M, Vanslambrouck JM, Stanley EG, Elefanty AG, Little MH (2014) Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nature cell biology* **16**: 118-126

Takashima S, Mkrtychyan M, Younossi-Hartenstein A, Merriam JR, Hartenstein V (2008) The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. *Nature* **454**: 651-655

Takeo S, Akiyama T, Firkus C, Aigaki T, Nakato H (2005) Expression of a secreted form of Dally, a *Drosophila* glypican, induces overgrowth phenotype by affecting action range of Hedgehog. *Developmental biology* **284**: 204-218

- Takeuchi H, Haltiwanger RS (2014) Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **453**: 235-242
- Therrien M, Morrison DK, Wong AM, Rubin GM (2000) A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* **156**: 1231-1242
- Tian A, Shi Q, Jiang A, Li S, Wang B, Jiang J (2015) Injury-stimulated Hedgehog signaling promotes regenerative proliferation of *Drosophila* intestinal stem cells. *The Journal of cell biology* **208**: 807-819
- Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**: 213-222
- Ting SB, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A, Zhao LL, Ellis S, Kaur P, Uchida Y, Holleran WM, Elias PM, Cunningham JM, Jane SM (2005) A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science* **308**: 411-413
- Tran J, Brenner TJ, DiNardo S (2000) Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* **407**: 754-757
- Tran V, Lim C, Xie J, Chen X (2012) Asymmetric division of *Drosophila* male germline stem cell shows asymmetric histone distribution. *Science* **338**: 679-682
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**: 1105-1111
- Tsuji M, Shinkura R, Kuroda K, Yabe D, Honjo T (2007) Msx2-interacting nuclear target protein (Mint) deficiency reveals negative regulation of early thymocyte differentiation by Notch/RBP-J signaling. *PNAS* **104**: 1610-1615
- Uranishi H, Zolotukhin AS, Lindtner S, Warming S, Zhang GM, Bear J, Copeland NG, Jenkins NA, Pavlakis GN, Felber BK (2009) The RNA-binding motif protein 15B (RBM15B/OTT3) acts as cofactor of the nuclear export receptor NXF1. *The Journal of biological chemistry* **284**: 26106-26116
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**: 959-963
- van Steensel B, Henikoff S (2000) Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nature biotechnology* **18**: 424-428
- VanderWielen BD, Yuan Z, Friedmann DR, Kovall RA (2011) Transcriptional Repression in the Notch Pathway: THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF CSL-MINT (Msx2-INTERACTING NUCLEAR TARGET PROTEIN) COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 14892-14902

- Veenstra JA, Agricola H-J, Sellami A (2008) Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell and Tissue Research* **334**: 499-516
- Venken KJT, He Y, Hoskins RA, Bellen HJ (2006) P[acman]: A BAC Transgenic Platform for Targeted Insertion of Large DNA Fragments in *D. melanogaster*. *Science* **314**: 1747-1751
- Vinayagam A, Stelzl U, Foulle R, Plassmann S, Zenkner M, Timm J, Assmus HE, Andrade-Navarro MA, Wanker EE (2011) A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction. *Sci Signal* **4**: rs8
- Vorhagen S, Niessen CM (2014) Mammalian aPKC/Par polarity complex mediated regulation of epithelial division orientation and cell fate. *Experimental cell research* **328**: 296-302
- Waghmare SK, Bansal R, Lee J, Zhang YV, McDermitt DJ, Tumbar T (2008) Quantitative proliferation dynamics and random chromosome segregation of hair follicle stem cells. *The EMBO journal* **27**: 1309-1320
- Walsh FS, Doherty P (1991) Glycosylphosphatidylinositol anchored recognition molecules that function in axonal fasciculation, growth and guidance in the nervous system. *Cell Biol Int Rep* **15**: 1151-1166
- Wang GJ, Kang L, Kim JE, Maro GS, Xu XZ, Shen K (2010) GRLD-1 regulates cell-wide abundance of glutamate receptor through post-transcriptional regulation. *Nat Neurosci* **13**: 1489-1495
- Wang L, Charroux B, Kerridge S, Tsai CC (2008) Atrophin recruits HDAC1/2 and G9a to modify histone H3K9 and to determine cell fates. *EMBO reports* **9**: 555-562
- Wang L, McLeod C, Jones DL (2011) Regulation of adult stem cell behavior by nutrient signaling. *Cell Cycle* **10**: 2628-2634
- Wang L, Rajan H, Pitman JL, McKeown M, Tsai CC (2006) Histone deacetylase-associating Atrophin proteins are nuclear receptor corepressors. *Genes & development* **20**: 525-530
- Wang L, Tsai CC (2008) Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* **6**: e009
- Weismann A (1885) *Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*
- Werth M, Walentin K, Aue A, Schonheit J, Wuebken A, Pode-Shakked N, Vilianovitch L, Erdmann B, Dekel B, Bader M, Barasch J, Rosenbauer F, Luft FC, Schmidt-Ott KM (2010) The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* **137**: 3835-3845

Wiellette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY, McGinnis W (1999) *spen* encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* **126**: 5373-5385

Winnebeck EC, Millar CD, Warman GR (2010) Why does insect RNA look degraded? *J Insect Sci* **10**: 159

Wu Y, Belenkaya TY, Lin X (2010) Dual roles of *Drosophila* glypican Dally-like in Wingless/Wnt signaling and distribution. *Methods Enzymol* **480**: 33-50

Xi R, Xie T (2005) Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science* **310**: 1487-1489

Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, Gallegos T, Suzuki K, Okamura D, Wu MZ, Dubova I, Esteban CR, Montserrat N, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC (2013) Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nature cell biology* **15**: 1507-1515

Xiao N, Jani K, Morgan K, Okabe R, Cullen DE, Jesneck JL, Raffel GD (2012) Hematopoietic stem cells lacking *Ott1* display aspects associated with aging and are unable to maintain quiescence during proliferative stress. *Blood* **119**: 4898-4907

Xie T, Spradling AC (1998) *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* **94**: 251-260

Xie T, Spradling AC (2000) A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* **290**: 328-330

Xu N, Wang SQ, Tan D, Gao Y, Lin G, Xi R (2011) EGFR, Wingless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain *Drosophila* intestinal stem cells. *Developmental Biology* **354**: 31-43

Yabe D, Fukuda H, Aoki M, Yamada S, Takebayashi S, Shinkura R, Yamamoto N, Honjo T (2007) Generation of a conditional knockout allele for mammalian *Spen* protein *Mint*/SHARP. *Genesis* **45**: 300-306

Yadlapalli S, Cheng J, Yamashita YM (2011) *Drosophila* male germline stem cells do not asymmetrically segregate chromosome strands. *Journal of cell science* **124**: 933-939

Yadlapalli S, Yamashita YM (2012) Spindle positioning in the stem cell niche. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**: 215-230

Yadlapalli S, Yamashita YM (2013) DNA asymmetry in stem cells - immortal or mortal? *Journal of cell science* **126**: 4069-4076

Yamashita YM (2010) Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division. *Current opinion in cell biology* **22**: 605-610

Yang J, Chan CY, Jiang B, Yu X, Zhu GZ, Chen Y, Barnard J, Mei W (2009) hnRNP I inhibits Notch signaling and regulates intestinal epithelial homeostasis in the zebrafish. *PLoS genetics* **5**: e1000363

Yang X, Li J, Qin H, Yang H, Zhou P, Liang Y, Han H (2005) Mint represses transactivation of the type II collagen gene enhancer through interaction with alpha A-crystallin-binding protein 1. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18710-18716

Yennek S, Tajbakhsh S (2013) DNA asymmetry and cell fate regulation in stem cells. *Seminars in cell & developmental biology* **24**: 627-642

Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, Birsoy K, Dursun A, Yilmaz VO, Selig M, Nielsen GP, Mino-Kenudson M, Zukerberg LR, Bhan AK, Deshpande V, Sabatini DM (2012) mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* **486**: 490-495

Zeng X, Han L, Singh SR, Liu H, Neumuller RA, Yan D, Hu Y, Liu Y, Liu W, Lin X, Hou SX (2015) Genome-wide RNAi screen identifies networks involved in intestinal stem cell regulation in *Drosophila*. *Cell reports* **10**: 1226-1238

Zeng X, Hou SX (2015) Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut. *Development* **142**: 644-653

Zhang S, Xu L, Lee J, Xu T (2002) *Drosophila* atrophin homolog functions as a transcriptional corepressor in multiple developmental processes. *Cell* **108**: 45-56

Zhang Y, You J, Ren W, Lin X (2013) *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like are essential regulators for JAK/STAT signaling and Unpaired distribution in eye development. *Developmental biology* **375**: 23-32

Zhong W, Feder JN, Jiang MM, Jan LY, Jan YN (1996) Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* **17**: 43-53

Zhou J, Florescu S, Boettcher AL, Luo L, Dutta D, Kerr G, Cai Y, Edgar BA, Boutros M (2015) Dpp/Gbb signaling is required for normal intestinal regeneration during infection. *Developmental biology* **399**: 189-203

Zielke N, Korzelius J, van Straaten M, Bender K, Schuhknecht GF, Dutta D, Xiang J, Edgar BA (2014) Fly-FUCCI: A Versatile Tool for Studying Cell Proliferation in Complex Tissues. *Cell reports*

Zolotukhin AS, Uranishi H, Lindtner S, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK (2009) Nuclear export factor RBM15 facilitates the access of DBP5 to mRNA. *Nucleic Acids Res* **37**: 7151-7162

Zoltewicz JS, Stewart NJ, Leung R, Peterson AS (2004) Atrophin 2 recruits histone deacetylase and is required for the function of multiple signaling centers during mouse embryogenesis. *Development* **131**: 3-14

ANNEXES

Revue :

**L'intestin moyen de drosophile :
Un nouveau modèle d'étude des cellules souches adultes in vivo**

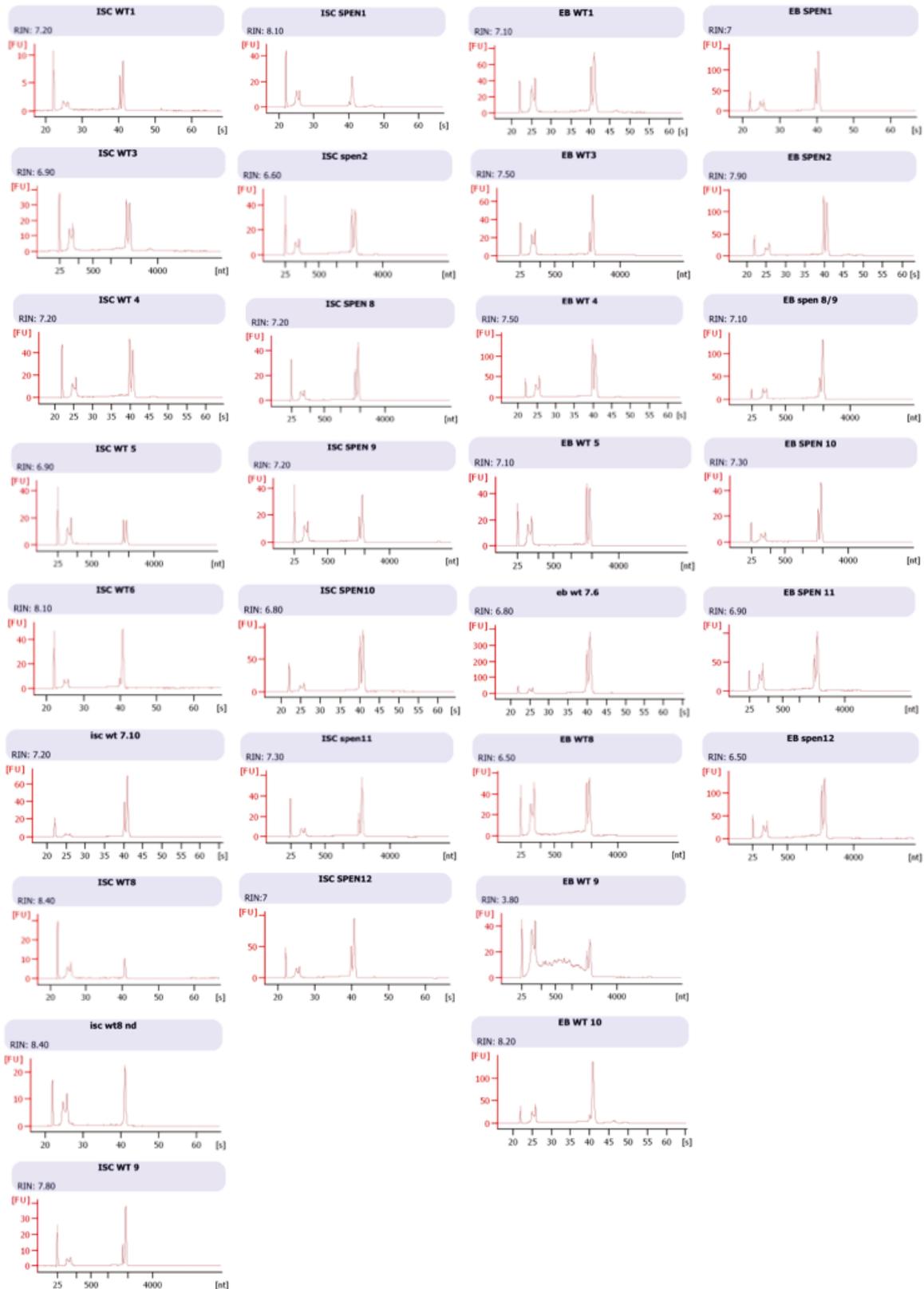
Mahéva Andriatsilavo, Louis Gervais, Clara Fons, Allison J. Bardin

Listes des échantillons récoltés

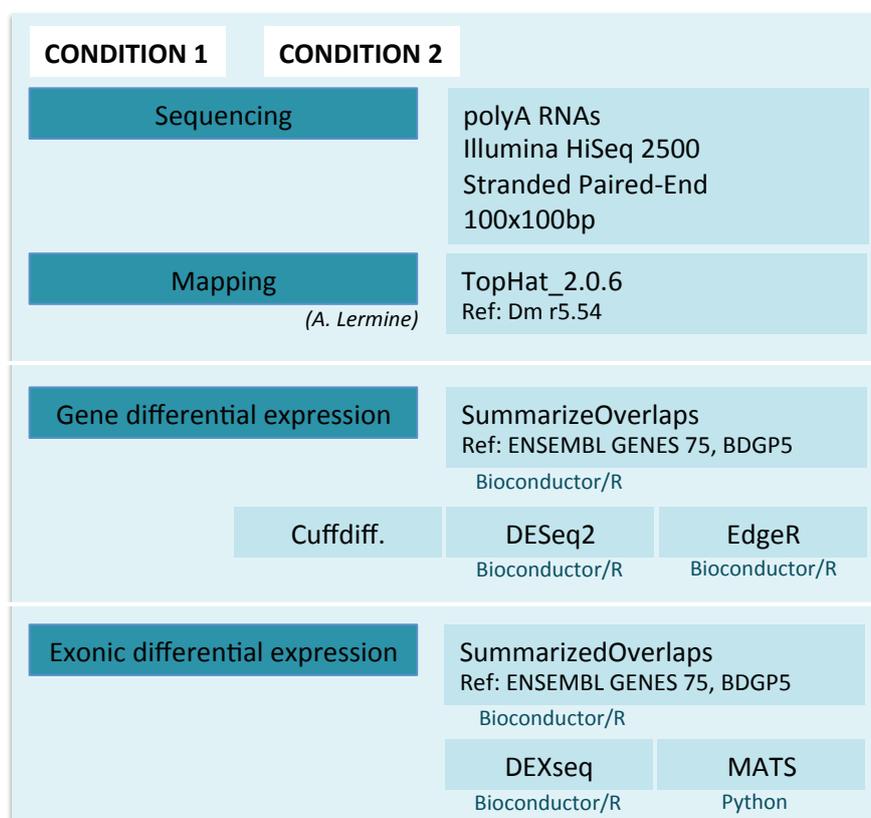
ISC													EB												
Dissection	Cell number	RNA prep	[³ H] ng/μl	Vol μl	tot RNA	RIN	pool		Dissection	Cell number	RNA prep	[³ H] ng/μl	Vol μl	tot RNA	RIN	pool									
X	07/01/14	WT5	ISC	131000	21/04/14	2,94	20	58,8	6,9	122,8	ISC_WTrep1	X	11/12/13	WT1	EB	82000	25/04/14	4,64	20	92,8	7,1				
X	16/12/13	WT3	ISC	110000	22/04/14	3,2	20	64	6,9			X	26/02/14	WT3	EB	97252	23/04/14	4,19	20	83,8	7,5	301,6	EB_WTrep1		
X	21/02/14	WT9	ISC	101000	17/04/14	3,4	20	68	7,8			L	21/02/14	WT8	EB	124000	22/04/14	6,25	20	125	6,5				
X	11/12/13	WT1	ISC	42000+21000	25/04/14	2,9	20	58	7,2	180,7	ISC_WTrep2	X	07/01/14	WT5	EB	117000	17/04/14	6,6	20	132	7,1				
X	10/01/14	WT7	ISC	27000	02/05/14	5,47	10	54,7	7,2			X	07/01/14	WT6	EB	41000	02/05/14	14,3	10	143	6,8	275	EB_WTrep2		
X	21/02/14	WT10	ISC	35000	02/05/14							X	10/01/14	WT7	EB	24000	02/05/14								
X	18/12/13	WT4	ISC	96000	24/04/14	4,29	20	85,8	7,2	141,8	ISC_WTrep13	X	21/02/14	WT10	EB	85000	28/04/14	6,3	20	126	8,2	256	EB_WTrep3		
X	07/01/14	WT6	ISC	51000	28/04/14	2,8	20	56	8,1			X	18/12/13	WT4	EB	97000	24/04/14	6,5	20	130	7,5				
NO	23/02/14	WT8	ISC	99000	23/04/14	1,42	20	28,4	7,8/8,4	28,4		NO	23/02/14	WT9	EB	104000	21/04/14	11,8	20	236	3,8				
SPEN																									
X	26/02/14	SPEN12	ISC	99000	25/04/14	4,59	20	91,8	5,8/6,1	155	ISC_SPENrep1	X	16/12/13	SPEN2	EB	75000	24/04/14	6,8	20	136	7,9	266	EB_SPENrep1		
X	26/02/14	SPEN11	ISC	55571	23/04/14	3,16	20	63,2	7,3			X	11/12/13	SPEN1	EB	64000	23/04/14	6,5	20	130	7				
X	10/01/14	SPEN8	ISC	100000	17/04/14	4,38	20	87,6	7,2	153,6	ISC_SPENrep2	X	26/02/14	SPEN10	EB	103299	17/04/14	6,45	20	129	7,3	249	EB_SPENrep2		
X	10/01/14	SPEN9	ISC	115000	21/04/14	3,3	20	66	7,2			X	26/02/14	SPEN8/9	EB	97252	23/04/14	6	20	120	7,1				
X	26/02/14	SPEN10	ISC	73489	24/04/14	4,5	20	90	6,8	158	ISC_SPENrep3	X	26/02/14	SPEN11	EB	64705	21/04/14	6,7	20	134	6,9	312	EB_SPENrep3		
X	16/12/13	SPEN2	ISC	91000	22/04/14	3,4	20	68	6,6			L	26/02/14	SPEN12	EB	129800	41751	8,9	20	178	6,5				
	11/12/13	SPEN1	ISC	71000+37000	28/04/14	3,3	20	66	8,1																

3,6

Analyse au Bioanalyseur des échantillons récoltés



Aperçu global des analyses bioinformatiques effectuées



Estimation de la couverture et du nombre de « lane » pour le séquençage

	theoric		Experimental		
per lane	1,00E+08	100 10E6	1,50E+08	150 10E6	fragments
per lane	2,00E+10	20Gb	3,00E+10	30Gb	base
per sample (if 6)	1,67E+07	16 10E6	2,50E+07		fragments
per sample (if 6)	3,33E+09	3,3Gb	5,00E+09	5Gb	base
per sample (if 6)			5,00E+07	50 10E6	read

Transcriptome: 31 Mb (31 10E6 base)

Coverage = Sample (Gb) / Transcriptome 1,61E+02

Couverture obtenue après séquençage :

Sample	Condition	Total Nb. Reads	Total Nb. Mapped reads	Total Nb. paired reads	Duplicates	Coverage
A229T1	WT.ISC	50 289 511	47 596 595 95%	42 285 790 84%	31 525 395 63%	136
A229T2	WT.ISC	50 441 465	47 689 161 95%	41 718 456 83%	27 158 090 54%	135
A229T3	WT.ISC	50 520 865	47 452 103 94%	42 191 904 84%	29 622 326 59%	136
A229T4	SPEN.ISC	53 027 883	49 598 079 94%	44 240 400 83%	28 652 168 54%	143
A229T5	SPEN.ISC	49 969 378	46 750 848 94%	41 470 404 83%	29 845 133 60%	134
A229T6	SPEN.ISC	52 163 546	48 396 929 93%	41 756 640 80%	27 356 506 52%	135
A229T7	WT.EB	52 993 308	49 827 661 94%	44 239 128 83%	33 594 301 63%	143
A229T8	WT.EB	55 864 168	52 515 897 94%	46 104 820 83%	30 844 098 55%	149
A229T9	WT.EB	52 095 242	48 664 889 93%	43 774 828 84%	32 418 802 62%	141
A229T10	SPEN.EB	52 616 819	49 433 143 94%	42 483 514 81%	28 907 384 55%	137
A229T11	SPEN.EB	50 473 176	47 257 711 94%	42 363 130 84%	30 258 706 60%	137
A229T12	SPEN.EB	54 502 442	51 228 609 94%	45 543 322 84%	30 465 539 56%	147

Commandes utilisées pour les analyses bioinformatiques

DESeq2

EdgeR

DEXseq

Test ANOVA sous R (pour les quantifications clonales)