Caractérisation des événements moléculaires et cellulaires de l'apoptose induite par rbf1, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur rb

Amandine Clavier

▶ **To cite this version:**

Amandine Clavier. Caractérisation des événements moléculaires et cellulaires de l'apoptose induite par rbf1, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur rb. Biologie cellulaire. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2015. Français. NNT : 2015VERS025V . tel-01293317

HAL Id: tel-01293317

https://theses.hal.science/tel-01293317

Submitted on 24 Mar 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.

UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

Ecole doctorale des Génomes Aux Organismes (GAO) – ED n°423

THÈSE DE DOCTORAT

pour l'obtention du diplôme de Docteur
de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines
Spécialité génétique et biologie cellulaire

Présentée par :
Amandine CLAVIER-ALEXANDRE

Caractérisation des événements moléculaires et cellulaires de l'apoptose induite par *rbf1*, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur *rb*

Soutenance prévue le 26 Juin 2015

JURY

Professeur Bertrand Mollereau	(Rapporteur)
Docteur Jérome Estaquier	(Rapporteur)
Docteur Allison Bardin	(Examinateur)
Professeur Sébastien Bloyer	(Examinateur)
Professeur Anne–Marie Pret	(Examinateur)
Docteur Isabelle Guénal	(Directeur de thèse)

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire - EA4589 UVSQ/EPHE
UFR des Sciences de la Santé – Simone Veil
2 avenue de la Source de la Bièvre
78180 Montigny-le-Bretonneux

Remerciements

Ceux qui me connaissent bien savent que j'ai gardé mon âme d'enfant et que j'adore les contes de fées … Il était une fois une étudiante de licence 2 qui pris contact avec Isabelle Guénal pour faire un stage en biologie du développement … Raté … elle se retrouve, il faut bien l'avouer un peu par hasard, en stage sur l'apoptose chez la drosophile ! Mais finalement, cette drôle de petite bête a su l'apprivoiser et l'étudiante est revenue une fois puis deux en stage au LGBC, ce laboratoire qu'elle a fini par adopter et réciproquement. Vous l'aurez tous compris, cette petite étudiante de licence devenue doctorante dans la grande famille LGBCienne c'est moi, et il est arrivé aujourd'hui le moment de clôturer ce chapitre de ma vie de doctorante en remerciant les personnes qui ont contribué à rendre cette expérience magique et inoubliable !!

Certains doctorants n'ont qu'un encadrant, moi j'ai eu la chance d'en avoir 3 ! Merci à **Bernard** qui a commencé par diriger ma thèse et qui a su garder un regard bienveillant sur mes manips et mes papiers. Puis Isa a pris officiellement le relais. Tu sais bizarrement **Isa** ce que j'ai préféré pendant toutes ces années ce sont les moments pendant lesquels on n'était absolument pas d'accord mais où, quelle que soit la gagnante de cette bataille, on trouvait ensemble une super idée de manips à réaliser. Merci de m'avoir laissé la liberté de jouer à l'électron libre en me permettant de tester ce qui me faisait plaisir (dans la limite du raisonnable bien sûr). Et puis, il y a **Aurore**, ma marraine la fée au LGBC, qui a toujours un mot gentil à dire, une attention délicate pour nous chouchouter et une étape de manip à éliminer … Nos fous rires à en pleurer resterons longtemps gravés dans mon esprit.

En dehors de cette équipe de choc, je tenais à remercier **Séb Sup** qui a toujours été de bons conseils et qui a su ouvrir mes yeux parfois naïfs sur la réalité du monde scientifique. Merci pour tes nombreuses relectures et toutes les informations plus ou moins en lien avec la recherche que tu sais si bien transmettre !

Merci également aux trois drôles de dames : **Sophie**, **Marcelle** et **Christine**. Sans vous, nos mouches seraient perdues, et nous aussi !

Je ne suis pas la seule à vivre des péripéties doctorantesques au LGBC. Merci aux autres doctorants du laboratoire, c'était juste génial de vivre ça avec vous : Merci à **Angé** (tu es partante pour un quizz musique Disney ?), à **Jess** (la fille la plus « chupé » que je connaisse, aux expressions improbables !), à **Caro** (notre génie de l'informatique qui a toujours une chanson pourrie à nous mettre dans la tête), à **Gérald** (tes ronchonnements en pièce à mouche m'ont beaucoup manqués après ton départ !), à **Yo** (on fait la course ? qui finira ses dissections en premier ?), à **Eli** (toujours partante pour une pause chocolat et papotage !), à **Marie** (avec qui on peut discuter de tout), à **Vincent** (Allez courage, encore quelques disques d'œil et ça sera bon …), et bienvenu aux petits nouveaux: **Sevasti** et **Benjamin**. Et puis il y a les ATER (plus vraiment des doctorants mais ils font partis du groupe) : Merci à **Adrie** (pour sa folie au quotidien), à **Laurine** (pour ses conseils bio) et à **Fréd** (qui arrive à me faire positiver sur l'avenir des doctorants).

Merci également à tous les autres membres du LGBC sans qui il ne serait pas aussi agréable de venir travailler : **Arnaud**, **Sylvina**, **Nathalie**, **Jean-Marc**, **Séb G.**, **Flore** et j'ai une pensée émue pour **Didier** et **Evelyne** qui sont partis trop vite.

Et puis en dehors du labo : Merci à **Camille**, mon binôme de toujours devenue ma meilleure amie. Merci à mes amis de la Beer-Team qui m'ont écoutée parler de mes petites mouches capricieuses avec attention même si tous ne comprenaient pas toujours ce que je pouvais leur trouver d'intéressant, merci à **Rom**, **Laura**, **Chris**, **Mag**, **Ju**, **Loïc**, **Alex** et **Virginie**.

Merci à toute ma **famille corse** (Forza Bastia !) et **normande** et plus particulièrement à **mes parents** et à **mon frère** qui ont toujours pris soin de moi. Et, enfin, merci à **Max** d'avoir été à mes côtés tout au long de cette longue route universitaire et merci à **Ruben** (notre plus belle manip !) qui illumine de son sourire mes journées et une partie de mes nuits …

Table des matières

Liste des abréviations 6

Liste des figures 13

Introduction 15

Préambule 16

I. L'apoptose : mécanisme et conséquences tissulaires 17

A. L'apoptose, un processus conservé au cours de l'évolution 17

B. L'apoptose chez la drosophile 18

1. Les caspases : les effecteurs de l'apoptose 18

a) Structure et classification des caspases 18

b) Les caspases initiatrices chez la drosophile 19

c) Les caspases effectrices chez la drosophile 21

2. Les inhibiteurs de caspases : les IAPs 22

a) Diap1 : un facteur essentiel à la survie cellulaire chez la drosophile 22

b) Régulation négative des caspases par Diap1 23

c) Régulation du facteur anti-apoptotique Diap1 25

3. *Les facteurs pro-apoptotiques de la famille RHG* 25

4. *Place controversée de la mitochondrie* 29

a) Rôle du cytochrome c dans l'activation des caspases chez la drosophile : mythe ou réalité ? 29

b) La famille Bcl-2 chez la drosophile (Debcl et Buffy) 31

c) Rôle des RHG dans une voie de mort mitochondriale chez la drosophile 33

d) Il existe d'autres protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose 35

e) Dynamique mitochondriale 36

f) Bilan de la place de la mitochondrie chez la drosophile 42

5. *La voie JNK : une voie de signalisation importante pour les processus apoptotiques* 43

a) La voie JNK chez la drosophile : signaux déclencheurs et fonctions biologiques 44

b) Les acteurs de la voie JNK chez la drosophile 44

c) Mode d'activation de la voie JNK dans le cas de processus apoptotiques 45

C. Effets des cellules apoptotiques sur le tissu environnant : focus sur la prolifération induite par l'apoptose 47

1. *Définition du processus de prolifération compensatoire* 48

2. *Cellules « undead » : un outil pour caractériser la prolifération induite par l'apoptose* 48

3. *Modèles de prolifération induite par l'apoptose n'utilisant pas p35* 49

4. *Lien entre prolifération induite par l'apoptose et tumorigenèse* 52

II. Présentation des protéines du rétinoblastome chez les mammifères et la drosophile : pRb et Rbf1 53

A. La famille des protéines à poche chez les mammifères et la drosophile 54

1. *Les protéines à poche chez les mammifères* 54

a) Structure des différents membres de la famille Rb chez les mammifères 54

b) Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de pRb 54

2. *Les protéines à poche chez la drosophile* 55

a) Structure des différents membres de la famille chez la drosophile 55

b) Profil d'expression de rbf1 et régulation post-transcriptionnelle 56

B. pRb et Rbf1 régulent la structure chromatinienne 57

1. *pRb : un régulateur de l'expression génique* 57

a) Les facteurs de transcription de la famille E2F chez les mammifères 57

b) Différents mécanismes moléculaires permettent à pRb d'assurer sa fonction de répresseur transcriptionnel 58

c) pRb : un activateur transcriptionnel ? 59

2. *Rbf1 : un régulateur de l'expression génique* 60

a) Les facteurs de transcription de la famille E2F chez la drosophile 60

b) Balance entre l'activateur dE2F1 et le répresseur dE2F2 60

c) Complexité du programme transcriptionnel de dE2F2 61

d) Implication du complexe dREAM dans la régulation transcriptionnelle assurée par dE2F2 et Rbf1 62

e) Effet de l'ubiquitination sur l'activité transcriptionnelle de Rbf1 68

C. pRb et Rbf1 assurent un grand nombre de fonctions biologiques 69

1. *pRb et Rbf1 régulent la prolifération cellulaire* 69

a) Rôle de pRb dans la transition G1/S : mécanisme moléculaire 69

b) Rôle de Rbf1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire 69

c) Rôle de pRb dans la prolifération cellulaire : explication de son rôle de suppresseur de tumeurs ? 71

2. *Rôle complexe de pRb et Rbf1 vis-à-vis de l'apoptose* 71

a) pRb : un facteur anti-apoptotique ? 71

b) pRb assure des fonctions pro-apoptotiques 75

c) Rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'apoptose 77

III. Situation du sujet 80

Résultats 82

I. Manuscrit n°1 : L'activité pro-apoptotique de Rbf1 implique une régulation négative des ARNm de diap1 et buffy dépendante de dE2F2. 83

II. Manuscrit n°2 : Rbf1 induit une apoptose mitochondriale dépendante de debcl et drp1. 97

III. Manuscrit n°3 : Des activateurs spécifiques de la voie JNK sont requis pour activer l'apoptose ou la prolifération compensatoire en réponse à la surexpression de rbf1 123

Discussion 137

I. Importance de l'activité transcriptionnelle de Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique 138

A. Quels sont les partenaires chromatiniens de Rbf1 impliqués dans sa fonction pro-apoptotique ? 139

1. *Le rôle des facteurs dE2Fs et du complexe dREAM dans le contrôle de l'apoptose dépend du contexte cellulaire* 139

2. *Implication du complexe dREAM dans la fonction de régulateur transcriptionnel de Rbf1 : une histoire compliquée* 140

a) Diversité de la régulation transcriptionnelle assurée par le complexe dREAM 140

b) Rôle antagoniste de dE2F2 et dMyb 141

c) Un rôle méconnu d'activation de la transcription pour Rbf1 et le complexe dREAM 142

B. Quels sont les gènes cibles de Rbf1 importants pour l'induction d'apoptose ? 143

1. *Implication de how dans les processus de mort cellulaire* 143

2. *Importance de la régulation transcriptionnelle de how par Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique* 144

3. *Implication de buffy dans les processus de mort cellulaire* 144

4. *Importance de la régulation transcriptionnelle de buffy par Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique* 145

II. Place de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 146

A. Lien entre voie Rb/E2F, mitochondrie et apoptose 146

1. *Les facteurs dE2Fs régulent la fonction mitochondriale chez la drosophile* 146

2. *pRb participe à l'induction d'apoptose directement au niveau de la mitochondrie* 147

3. *Mitochondrie, apoptose et cancer* 147

B. Un lien étroit entre dynamique mitochondriale et mort cellulaire 148

1. *La fission mitochondriale est-elle impliquée dans les processus de mort cellulaire ?* 148

2. *Debcl altère la dynamique mitochondriale au cours de l'apoptose induite par Rbf1* 149

3. *Comment Debcl favorise t-il la fragmentation mitochondriale au cours d'un processus apoptotique ?* 150

4. *La fragmentation mitochondriale induite par Rbf1 ou Debcl est-elle associée à de la mitophagie ?* 151

C. Rôle du stress oxydant mitochondrial dans la mort cellulaire induite par Rbf1 153

1. *Implication des EAO mitochondriaux dans les processus apoptotiques* 153

2. *L'altération de la dynamique mitochondriale pourrait être responsable de la production d'EAO* 153

3. *Les EAO mitochondriaux déclencheraient l'activation de la voie JNK* 154

III. La voie JNK : une voie de signalisation aux effets pléiotropes 155

A. Qu'est ce qui détermine la spécificité de réponse de la voie JNK ? 155

B. La voie JNK joue un rôle important dans le processus de prolifération compensatoire 156

1. *La voie JNK joue un rôle crucial dans la prolifération en réponse à l'apoptose* 156

2. *Quels sont les facteurs en aval de la voie JNK responsables de la prolifération en réponse à l'apoptose ?* 157

3. *Comment la voie JNK est-elle activée pour induire l'AiP ?* 158

IV. Conclusion 159

Références Bibliographiques 161

Annexes 196

I. Annexe 1 : Présentation du système UAS/Gal4 197

II. Annexe 2 : Une mutation de Rbf1 augmente son activité pro-apoptotique et permet de dévoiler un nouveau rôle vis-à-vis de l'homéostasie tissulaire 198

III. Annexe 3 : Debcl est adressé au protéasome par Slimb, l'homologue de la β-TrCP 216

IV. Annexe 4 : Un crible visant à identifier des suppresseurs de la mort cellulaire induite par bax a permis d'identifier la glycerophosphate oxidase-1 comme un médiateur de l'apoptose induite par debcl chez la drosophile 230

Liste des abréviations

A

A	Alanine
Ac	Acétylation
Act	Activateur
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AiP	Apoptosis-induced Proliferation
AP-1	Adaptor Protein complex-1
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
ARNi	Acide RiboNucléique interférent
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine TriPhosphate

B

Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Beaf-32	Boundary element-associated factor of 32kD
Ben	Bendless
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting death domain agonist
BIR	Baculovirus IAP Repeat
bloc-Trp	bloc-tryptophane
BNIP3	Bcl-2 interacting protein 3
Bsk	Basket

C

C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
C3	Caspase 3
Caf1	Chromatin assembly factor 1 subunit
CARD	CAspase Recruitment Domain

Caspase	Cysteinyl aspartate-specific protease
CBP	CREB Binding Protein
Cdc42	Cell division cycle 42
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
Cdk7	Cyclin-dependent kinase 7
CED-3	Cell death abnormal 3
CED-4	Cell death abnormal 4
CED-9	Cell death abnormal 9
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHK2	Checkpoint kinase 2
CHO	Chinese Hamster Ovary
CNV	Corde Nerveuse Ventrale
CP-190	Centrosomal Protein 190kD

D

D	Asparagine
Da	Dalton
Damm	Death associated molecule related to mch2 caspase
Dark	Death-associated APAF1-related killer
dASK1	drosophila Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
dBruce	drosophila BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
Dcp-1	Death caspase-1
dCYLD	drosophila Cylindromatosis ortholog
Decay	Death executioner caspase related to apopain/yama
DED	Death Effector Domain
Diablo	Direct *I*AP-Binding protein with Low PI
Diap1	Drosophila *i*nhibitor of apoptosis protein 1
Diap2	Drosophila *i*nhibitor of apoptosis protein 2
dMekk1	drosophila Mek kinase 1
DmIKKε	Drosophila melanogaster IKK-related kinase
dMyb	drosophila Myeloblastosis
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
dOmi/HtrA2	drosophila Omi/High temperature requirement A2
DP	Differentiation-regulated transcription factor polypeptide
DPG	Divergently Paired Genes
DP^{MB}	DP Marked Box
dpp	*decapentaplegic*
DRE	DNA Replication-related Element

dREAM	drosophila Rbf, E2F And Myb-interacting protein
Dredd	Death related ced-3/Nedd2-like caspase
DREF	DNA Replication-related Element-binding Factor
Drice	Death related ICE-like caspase
Dronc	Death regulator Nedd2-like caspase
Drp1	Dynamin-related protein 1
dTak1	drosophila TGF-β activated kinase 1
dTRAF	drosophila TNF Receptor-Associated Factors
dTSPO	drosophila translocator protein
dUev1a	drosophila Ubiquitin-conjugating enzyme variant 1a
DYRK1A	Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A

E

E	glutamate
E(Z)	Enhancer of zeste
E1D1	E1A-like inhibitor of differentiation 1
$E2F^{TD}$	E2F Transactivation Domain
EAO	Espèces activées de l'oxygène
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGL-1	egg laying defective 1
EID-1	EP300 Interacting Inhibitor of Differentiation 1
Eiger	eda-like cell death trigger
elav	*embryonic lethal abnormal vision*
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase

F

FADD	Fas-Associated Death Domain
Foxo	Forkhead Box O
Fz	Frizzled
fzo	*fuzzy onions*

G

GED	GTPase Effector Domain
GFP	Green Fluorescent Protein
GH3	Grim Helix 3
GTP	Guanosine Triphosphate

H

HDAC	Histone déacétylase
Hep	Hemipterous
Hh	Hedgehog
hid	*head involution defective*
HIF1α	Hypoxia Induced Factor 1α
How	Held out wing
HR	Heptad Repeat

I

IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IBM	IAP Binding Motif
IE	Instability Element
iPLA2	calcium-independent phospholipase A2
IR	Irradiation
IRER	Irradiation Responsive Enhancer Region
IRES	Internal Ribosome Entry Site

J

JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
JNKK	JNK kinase
JNKKK	JNKK kinase
Jra	Jun-related antigen
jub	*ajuba LIM protein*

K

K	Lysine
Kay	Kayak
kb	kilobase
KH	K-Homology
KO	Knock Out

L

LZ	Leucine Zipper

M

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

marf	*mitochondrial assembly regulatory factor*
MB	Marked Box
mdivi-1	mitochondrial *divi*sion inhibitor-1
Me	Méthylation
Mff	Mitochondrial fission factor
Mfn	Mitofusine
MiD49	Mitochondrial Dynamics proteins of 49 kDa
MiD51	Mitochondrial Dynamics proteins of 51 kDa
Mip120	Myb-interacting protein 120
Mip130	Myb-interacting protein 130
Mip40	Myb-interacting protein 40
Mkk4	MAP kinase 4
MMB	Myb-MuvB
Morgue	Modifier of reaper and grim, ubiquitously expressed
Msn	Misshapen
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence

N

N	Notch
NES	Nuclear Export Signal
neu	neuropile
NF-YB	Nuclear Factor Y-box B
NF-KB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localization Sequence
NOPO	No poles

O

OPA1	OPtic Atrophy 1

P

P	Phosphorylation
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
Pink1	PTEN-induced putative kinase 1
PP1	Protein Phosphatase 1
Puc	Puckered
PVF	PDGF- and VEGF-related Factor
PVR	PDGF- and VEGF-Receptor related

R

R	Arginine
R3	RHG domain 3
Ras	Rat sarcoma
rb	*Gène de susceptibilité au rétinoblastome*
RBC	Domaine C-terminal de pRb
rbf	*Retinoblastoma family*
RBN	Domaine N-terminal de pRb
RE	Réticulum Endoplasmique
Rep	Répresseur
RHG	Reaper, Hid, Grim
Rho1	Ras homologous 1
RING	Really Interesting New Gene
rpr	*reaper*

S

S	Svedberg
SAPK	Stress Activated Protein Kinase pathway
Ser	Sérine
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
skl	*sickle*
Slpr	Slipper
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
sp	spiracle postérieur
STAR	Signal Transduction and Activation of RNA
Strica	Ser/Thr-rich caspase
synMuv	synthetic Multivulva

T

Takl2	Tak1-like 2
Thr	Thréonine
TM	Transmembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
Trp	Tryptophane
ts	thermosensible

U

UBC	UBiquitin Conjugating
Upd	Unpaired
UTR	UnTranslated Region

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vg	*vestigial*

W

Wg	Wingless
Wgn	Wengen
Wnd	Wallenda

X

Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis

Y

YFP	Yellow Fluorescent Protein

Liste des figures

Introduction

Figure n°1 : Conservation du cœur de la machinerie apoptotique entre différents organismes. 17

Figure n°2 : Structure des caspases de drosophile 18

Figure n°3 : *dronc* est un gène essentiel requis pour la mort cellulaire développementale et en réponse au stress. 19

Figure n°4 : Rôles non apoptotiques des caspases chez la drosophile. 20

Figure n°5 : Structure des membres de la famille des IAPs chez la drosophile 22

Figure n°6 : La réduction du niveau de *diap1* induit une mort cellulaire dépendante des caspases 23

Figure n°7 : Régulation des caspases par Diap1 24

Figure n°8 : Régulation de Diap1 25

Figure n°9 : Représentation schématique de la structure des membres de la famille RHG chez la drosophile 26

Figure n°10 : Les motifs IBM des protéines RHG présentent de fortes similarités mais ne sont pas interchangeables. 26

Figure n°11 : Résumé des différents mécanismes de régulation du facteur pro-apoptotique Hid 27

Figure n°12 : Ubiquitination de Diap1 et des RHG 27

Figure n°13 : Régulation de Grim par Diap1 et par les caspases 28

Figure n°14 : Régulation mitochondriale de la mort cellulaire chez les mammifères 28

Figure n°15 : Altérations mitochondriales au cours de l'apoptose chez les mammifères 29

Figure n°16 : Structure des protéines de la famille Bcl-2 chez les mammifères 30

Figure n°17 : Structure des protéines de la famille Bcl-2 chez la drosophile 31

Figure n°18 : Debcl assure à la fois des fonctions pro- et anti-apoptotiques 31

Figure n°19 : Buffy assure à la fois des fonctions pro- et anti-apoptotiques 32

Figure n°20 : Lien entre structure des RHG et localisation mitochondriale 33

Figure n°21 : Modèles de la localisation mitochondriale de Rpr 33

Figure n°22 : Le motif GH3, conservé entre Rpr, Grim et Sickle, est nécessaire et suffisant pour assurer une localisation mitochondriale. 34

Figure n°23 : La fonction pro-apoptotique de dOmi/HtrA2 implique son activité sérine protéase 36

Figure n°24 : Acteurs de la dynamique mitochondriale chez les mammifères et la drosophile 36

Figure n°25 : Représentation schématique des molécules impliquées dans la fusion chez les mammifères 37

Figure n°26 : Les Mitofusines sont requises pour la fusion mitochondriale 37

Figure n°27 : Drp1 et Marf ont une action antagoniste sur la morphologie mitochondriale 38

Figure n°28 : Recrutement de la GTPase Drp1 à la mitochondrie 39

Figure n°29 : Drp1 induit un remodelage membranaire au niveau de la mitochondrie et stimule l'oligomérisation de Bax 41

Figure n°30 : Modèle proposé pour la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la fragmentation mitochondriale survenant au cours de l'apoptose dans des cellules de mammifères 42

Figure n°31 : Voie de mort mitochondriale chez la drosophile 43

Figure n°32 : Stimuli d'activation de la voie JNK et réponses cellulaires 44

Figure n°33 : La voie JNK chez la drosophile 45

Figure n°34 : Mode d'activation de la voie JNK dans le cas de processus apoptotiques chez la drosophile 46

Figure n°35 : Prolifération compensatoire et prolifération induite par l'apoptose. 48

Figure n°36 : Mécanisme d'AiP en présence de cellules « undead » dans un tissu prolifératif 49

Figure n°37 : Une induction spatio-temporellement restreinte d'apoptose pour étudier le mécanisme de prolifération compensatoire. 50
Figure n°38 : La radiothérapie peut avoir des conséquences délétères du fait de l'existence d'un mécanisme d'AiP des cellules tumorales 52
Figure n°39 : Conservation des membres des familles Rb et E2F et de leurs régulateurs entre les mammifères et la drosophile 53
Figure n°40 : Famille des protéines à poche chez les mammifères 54
Figure n°41 : pRb est une plateforme d'interaction protéique 54
Figure n°42 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de pRb 55
Figure n°43 : Comparaison entre mammifères et drosophile des membres de la famille Rb 55
Figure n°44 : Interaction génétique entre Rbf1 et Rbf2 56
Figure n°45 : Rbf1 et Rbf2 ont un profil d'expression dynamique au cours du développement embryonnaire 56
Figure n°46 : Représentation schématique de Rbf1 57
Figure n°47 : Aperçu de certains partenaires et gènes cibles de pRb impliqués dans sa fonction de suppresseur de tumeur. 57
Figure n°48 : Famille des facteurs de transcription E2F chez les mammifères 58
Figure n°49 : Interaction entre les protéines à poche et les facteurs E2Fs chez les mammifères 58
Figure n°50 : Deux mécanismes d'inhibition par pRb de la transcription dépendante des facteurs E2Fs 59
Figure n°51 : Interaction entre les protéines à poche et les facteurs E2Fs chez la drosophile 60
Figure n°52 : Classification des gènes cibles des facteurs dE2Fs 61
Figure n°53 : Composition du complexe dREAM 62
Figure n°54 : Association du complexe dREAM aux régions transcriptionnellement silencieuses du génome. 63
Figure n°55 : Mécanisme de répression transcriptionnelle par le complexe dREAM 65
Figure n°56 : Modèle du rôle du complexe dREAM et des protéines de liaison aux isolateurs au niveau d'un couple de DPG. 66
Figure n°57 : Complexes dREAM/DRM/DREAM chez la drosophile, le nématode et l'Homme 67
Figure n°58 : Rôle du complexe DREAM dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères 67
Figure n°59 : Régulation de la transition G1/S par pRb et les facteurs E2Fs 69
Figure n°60 : E2F1 induit l'apoptose par de multiples voies 73
Figure n°61 : Rôle controversé de pRb dans l'apoptose dépendante d'E2F1 induite par dommages à l'ADN 75
Figure n°62 : La perte de fonction de rbf1 induit de l'apoptose et sensibilise à la mort cellulaire 77
Figure n°63 : Rôle anti-apoptotique de Rbf1 dans les cellules du sillon morphogénétique du disque imaginal d'œil 78
Figure n°64 : La surexpression de rbf1 a un effet pro-apoptotique dans un tissu en prolifération 79

Discussion

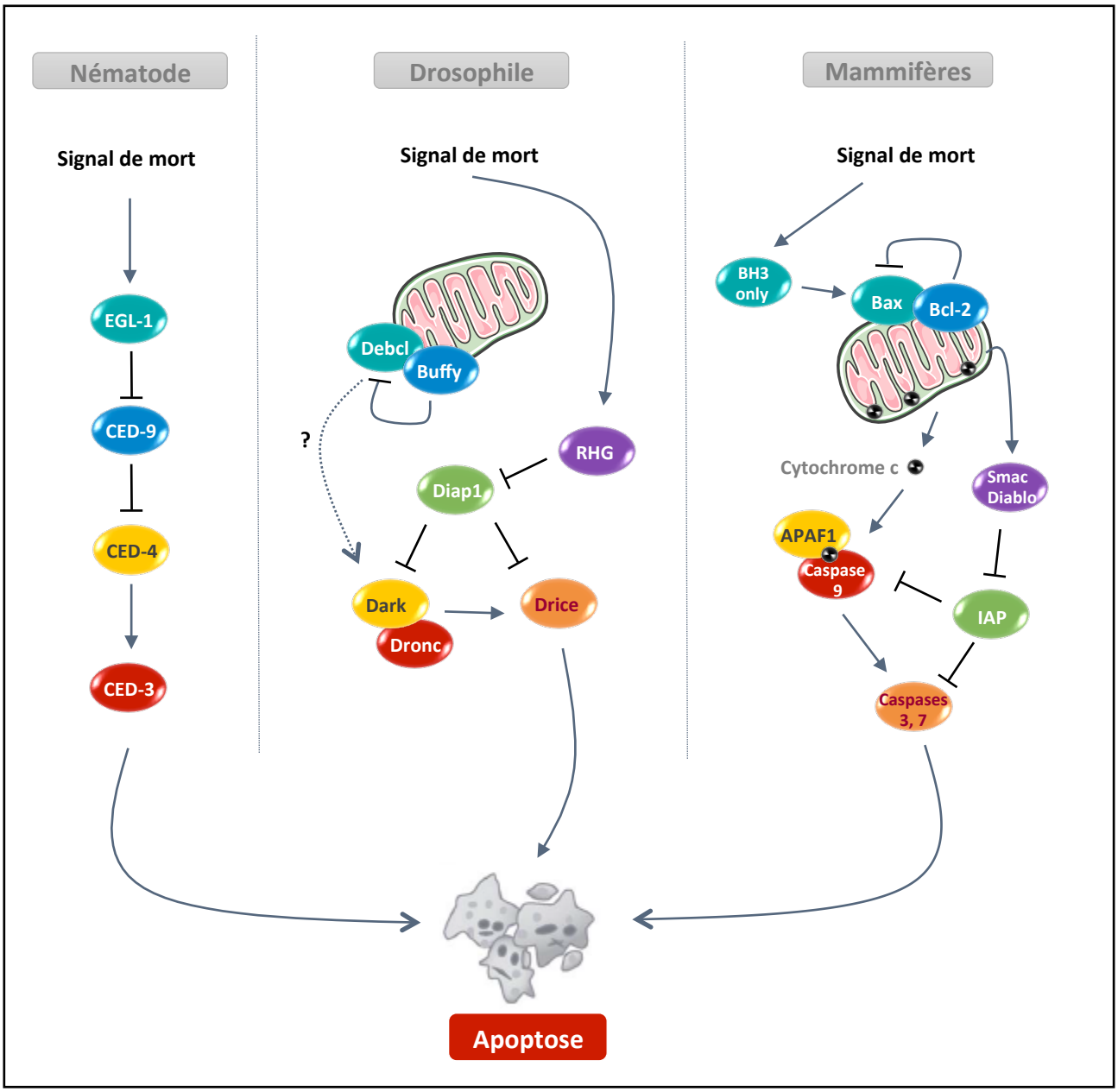
Figure n°65 : Similarité structurale entre les protéines QKI, How et GLD-1 143
Figure n°66 : Drp1 présente un site consensus de phosphorylation par la PKA chez les métazoaires 150
Figure n°67 : Mécanisme moléculaire de la mitophagie dépendante de Parkin 152
Figure n°68 : Modèle de l'apoptose induite par Rbf1 dans un tissu prolifératif 159

Introduction

Préambule

rb est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié dans des cellules humaines. Son inactivation est une étape préalable au développement de nombreux cancers. De façon cohérente avec son rôle de suppresseur de tumeur, pRb inhibe la prolifération cellulaire en contrôlant la transition G1/S. pRb fonctionne principalement comme un régulateur transcriptionnel et ses partenaires les mieux caractérisés sont les facteurs de transcription de la famille E2F. Le rôle de *rb* dans le contrôle de l'apoptose est complexe et bien moins documenté que son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, en fonction du contexte cellulaire, *rb* peut avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques. Des études menées au laboratoire sur *rbf1*, l'homologue de drosophile du gène *rb*, ont permis de mettre en évidence que le rôle de *rbf1* vis-à-vis de l'apoptose dépend du statut prolifératif de la cellule. La surexpression de *rbf1* dans un tissu en prolifération, grâce au système UAS/Gal4 (*cf.* Annexe 1), induit une mort caspase dépendante alors que ces effets ne sont pas observés dans un tissu post-mitotique. Au cours de ma thèse, je me suis attachée à décrire les mécanismes sous-jacents à l'apoptose induite par *rbf1* dans un tissu prolifératif à savoir les disques imaginaux d'ailes (structure présente chez la larve à l'origine de l'aile adulte) et j'ai pu montrer l'existence d'un mécanisme de prolifération compensatoire en réponse à la mort induite par Rbf1.

La première partie de mon introduction vise donc d'une part à décrire les acteurs impliqués dans l'apoptose et d'autre part à présenter une des conséquences tissulaires possibles de l'apoptose à savoir la prolifération en réponse à l'apoptose. Par soucis de concision, j'ai choisi de présenter dans cette première partie des données concernant principalement la drosophile, en les comparant quand cela le nécessite aux données existant chez les mammifères. Dans une deuxième partie, je me suis attachée à présenter les protéines à poche Rbf1 chez la drosophile et pRb chez les mammifères en insistant sur leur fonction de régulateur de la transcription et sur leur rôle vis-à-vis de l'apoptose.



<u>Figure n°1</u> : Conservation du cœur de la machinerie apoptotique entre différents organismes.
Les principaux acteurs de l'apoptose sont conservés entre le nématode (à gauche), la drosophile (au centre) et les mammifères (à droite). Les trois modèles possèdent des caspases (en rouge/orange), des activateurs de caspases (en jaune) et des membres de la famille Bcl-2 (en bleu) qui peuvent être pro- ou anti-apoptotiques. Chez la drosophile, les liens entre les protéines de la famille Bcl-2 et l'activateur de caspases Dark ne sont pas clairement définis. La drosophile et les mammifères possèdent également des inhibiteurs de caspases (en vert) et des antagonistes de ces inhibiteurs (en violet).

I. L'apoptose : mécanisme et conséquences tissulaires

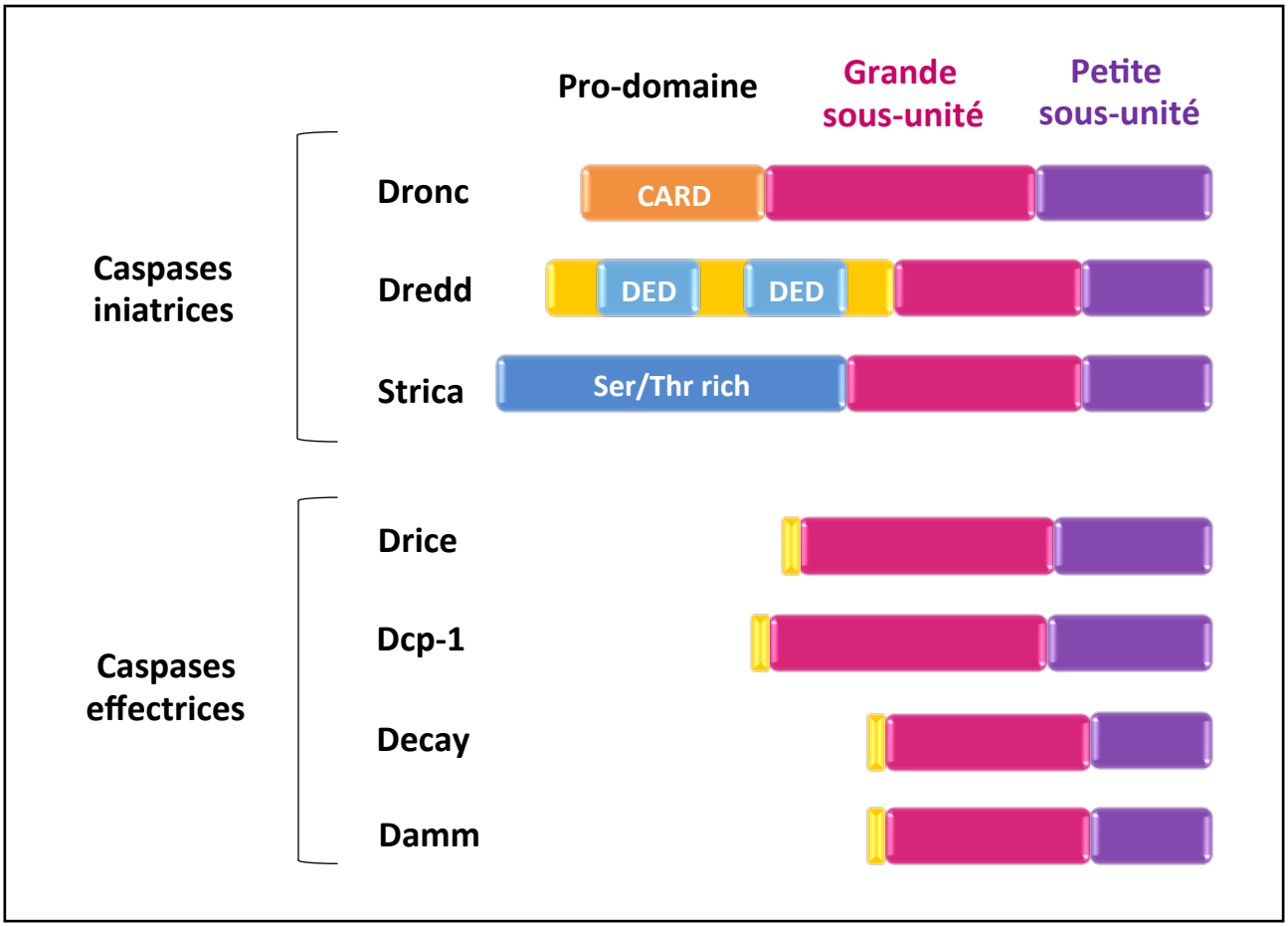
A. L'apoptose, un processus conservé au cours de l'évolution

De façon surprenante, de nombreuses cellules produites au cours du développement des métazoaires ont pour destin de mourir. Cette mort cellulaire permet notamment de sculpter les organes pendant la morphogenèse et d'éliminer des structures devenues inutiles comme la queue du têtard (Baehrecke, 2002). Outre ce rôle développemental, la mort cellulaire est requise pour éliminer les cellules dangereuses ou endommagées.

Il existe différentes façons pour une cellule de mourir. En 1972, Kerr définit la mort par apoptose en l'opposant à la mort par nécrose. La nécrose est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient suite à un dommage tissulaire physique ou chimique. Par opposition, l'apoptose est une forme « physiologique » de mort cellulaire. Elle est qualifiée de mort propre car contrairement à la nécrose, le contenu cellulaire n'est pas déversé dans le tissu environnant, il n'y a donc pas d'inflammation. L'apoptose est définie comme un processus survenant en deux étapes : une condensation nucléaire et cytoplasmique, associée à une fragmentation cellulaire formant des corps apoptotiques, suivie de la phagocytose et de la dégradation de ces corps apoptotiques par les cellules environnantes (Kerr *et al.*, 1972).

Chez l'Homme, des dysfonctionnements du phénomène d'apoptose conduisent à des pathologies sévères, soit du fait d'un défaut de mort cellulaire comme pour les cancers ou, au contraire, à cause d'un excès de mort comme dans le cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui s'accompagne d'une mort prématurée des cellules immunitaires. L'identification des composants et des régulateurs de la machinerie d'apoptose est donc cruciale pour la compréhension des maladies associées à un dérèglement du programme de mort cellulaire et pour le développement de thérapies. Ceci explique que les travaux concernant l'apoptose aient représenté et représentent encore aujourd'hui un sujet d'intenses investigations.

La base génétique de la mort cellulaire chez les métazoaires a d'abord été découverte chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Le cœur de la machinerie est constitué de 4 protéines : EGL-1 (egg laying defective 1), CED-9 (cell death abnormal 9), CED-4 (cell death abnormal 4) et CED-3 (cell death abnormal 3). La caspase CED-3 et son activateur CED-4 sont présents de façon ubiquitaire. Toutefois la plupart des cellules sont protégées de l'apoptose par CED-9, une protéine anti-apoptotique à multi-domaine de la famille Bcl-2. CED-9 séquestre CED-4 à la mitochondrie et empêche son oligomérisation. Ainsi CED-9 inhibe l'activation de CED-3 dépendante de CED-4. Dans les cellules destinées à mourir, il y a expression du gène *egl-1* codant pour une protéine BH3-only de la famille Bcl-2. Cette protéine perturbe l'interaction entre CED-9 et CED-4, permettant ainsi à CED-4 d'activer CED-3 (Metzstein *et al.*, 1998). Le cœur de cette machinerie est conservé chez les mammifères et la drosophile (**Figure 1**). La drosophile présente une complexité intermédiaire entre le nématode et les mammifères (Mignotte *et al.*, 2005).



<u>Figure n°2</u> : Structure des caspases de drosophile

Représentation schématique des sept caspases de drosophile. Toutes les caspases possèdent une grande sous-unité (en rose) et une petite sous-unité (en violet) en C-terminal. Les caspases initiatrices Dronc, Dredd et Strica contiennent un long pro-domaine N-terminal qui comprend respectivement des motifs CARD (caspase activation and recruitment domain), DED (death effector domain) ou qui est riche en sérine et thréonine. Les caspases effectrices Drice, Dcp-1, Decay et Damm possèdent un court pro-domaine.

Adapté de Denton *et al.*, 2013a, Kumar and Doumanis, 2000, Xu *et al.,* 2009 et Bergmann, 2010.

J'ai choisi de présenter ici les principaux acteurs impliqués dans la régulation de l'apoptose chez la drosophile, qui constitue l'organisme modèle utilisé au cours de mon travail de thèse. Quand cela le nécessite, je comparerais ces acteurs à ceux existant chez les mammifères qui possèdent des voies de régulation similaires mais qui présentent une complexité plus importante du fait que les régulateurs appartiennent à des familles multi-génétiques.

B. L'apoptose chez la drosophile

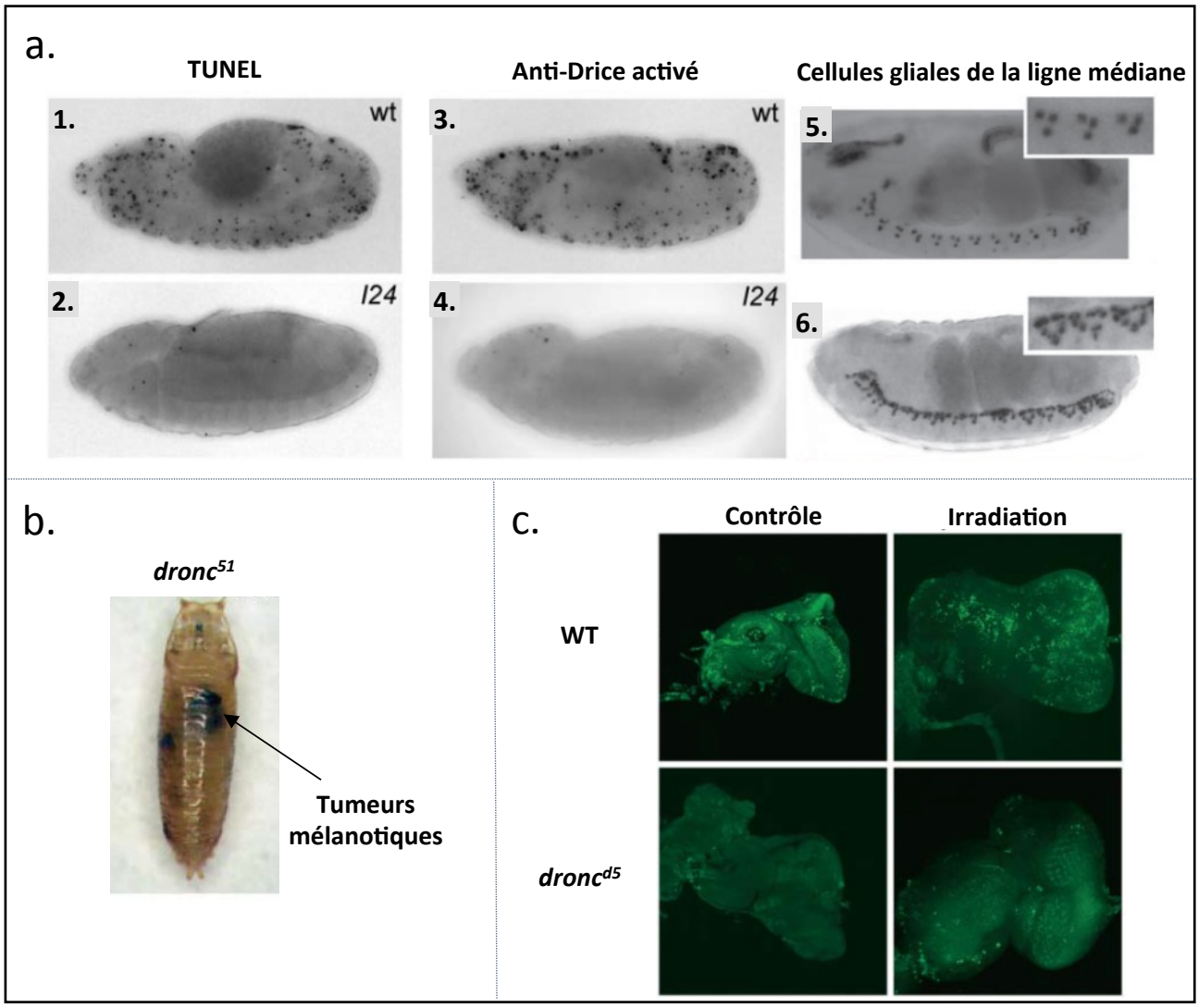
1. Les caspases : les effecteurs de l'apoptose

a) Structure et classification des caspases

Quel que soit l'organisme considéré, les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteases) sont les principaux effecteurs de l'apoptose. Ce sont des protéases qui possèdent une cystéine au sein de leur site actif et qui, en général, clivent leur substrat après une séquence spécifique se terminant par un résidu aspartate (Kumar, 2007). Elles sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif appelé zymogène qui comprend trois domaines distincts : un pro-domaine N-terminal de longueur variable, une grande sous-unité et une petite sous-unité (Thornberry and Lazebnik, 1998). Leur activation implique un clivage protéolytique : la caspase active est un hétérotétramère composé de deux petites et deux grandes sous-unités (Cryns and Yuan, 1998; Nicholson, 1999).

Les caspases sont classées en deux catégories selon la longueur de leur pro-domaine. Les caspases ayant un pro-domaine long sont appelées caspases initiatrices alors que celles qui ont un pro-domaine court sont dites caspases effectrices. Le long pro-domaine des caspases initiatrices contient des motifs d'interactions protéine/protéine comme le domaine CARD (caspase recruitment domain) ou le domaine DED (death effector domain) (Aravind *et al.*, 1999). Ces motifs permettent l'interaction du précurseur de la caspase avec une molécule adaptatrice, donc son recrutement, au sein d'un complexe macro-moléculaire ce qui va promouvoir l'homodimérisation des caspases initiatrices et leur activation auto-catalytique (Kumar, 1999; Kumar and Colussi, 1999). Les caspases initiatrices ainsi activées vont alors cliver, donc activer, les caspases effectrices. Une fois actives, ces dernières vont cliver des centaines de protéines cellulaires (Fischer *et al.*, 2003). Ainsi les caspases jouent un rôle protéolytique majeur dans le désassemblage du noyau et du cytosquelette au cours du processus de mort cellulaire.

Chez les mammifères, 18 caspases ont été caractérisées (Connolly *et al.*, 2014) alors qu'on en dénombre 7 chez la drosophile (Cooper *et al.*, 2009; Kumar and Doumanis, 2000) (**Figure 2**). Trois d'entre elles, Dronc (Death regulator Nedd2-like caspase), Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like caspase) et Strica (Ser/Thr-rich caspase), contiennent un long pro-domaine et sont considérées comme des caspases initiatrices alors que Drice (Death related ICE-like caspase), Dcp-1 (Death caspase-1), Decay (Death executioner caspase related to Apopain/Yama)



<u>Figure n°3</u> : *dronc* est un gène essentiel requis pour la mort cellulaire développementale et en réponse au stress.

(a) Analyse de la mort cellulaire développementale dans des embryons sauvages (*wt* en 1, 3, 5) et dans des embryons mutants pour *dronc* (*l24* en 2, 4, 6). On visualise la mort cellulaire par un marquage TUNEL (1, 2), l'activation de la caspase effectrice Drice par un anticorps anti-Drice activé (3, 4) et les cellules gliales de la ligne médiane par un marquage anti-β galactosidase (5, 6). La perte de fonction de *dronc* conduit à une perte quasi-totale de la mort cellulaire embryonnaire (2) et de l'activation de Drice (4). De façon cohérente avec la diminution de la mort cellulaire, on observe la présence de cellules gliales additionnelles au niveau de la ligne médiane dans le système nerveux central embryonnaire (6).
Issu de Xu *et al*., 2005.

b) La perte de fonction de *dronc* (*dronc*^{51}) est létale au stade pupal et conduit à la présence de tumeurs mélanotiques.
Issu de Chew *et al.*, 2004

c) Analyse de la mort cellulaire en réponse à l'irradiation dans des disques imaginaux d'œil issus de larves sauvages (WT) ou mutantes pour *dronc* (*dronc*^{d5}). On visualise la mort cellulaire par un marquage à l'acridine orange (en vert). On observe une nette augmentation de la mort cellulaire en réponse à l'irradiation pour les disques sauvages. Cette augmentation n'est pas observée dans le cas de la perte de fonction de *dronc*.
Issu de Daish *et al.*, 2004

et Damm (Death associated molecule related to Mch2 caspase) n'ont pas de long pro-domaine. Ce sont des caspases effectrices.

b) Les caspases initiatrices chez la drosophile

Dronc est la principale caspase initiatrice chez la drosophile, elle est considérée comme l'homologue fonctionnel de la caspase 9 de mammifère. *dronc* est exprimée de façon ubiquitaire pendant tout le développement (Dorstyn *et al.*, 1999a) et son expression est régulée par l'ecdysone (hormone stéroïdienne) dans les glandes salivaires et l'intestin (Cakouros *et al.*, 2004).

Les mutants *dronc* sont létaux au stade pupal et présentent des tumeurs mélanotiques (**Figure 3**) (Chew *et al.*, 2004; Daish *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005). Il existe un dépôt maternel de *dronc* au sein des ovocytes. La mutation à la fois maternelle et zygotique de *dronc* conduit à un blocage quasi complet de l'apoptose embryonnaire (**Figure 3**), à des défauts d'involution de la tête et à une létalité embryonnaire (Xu *et al.*, 2005). Des études détaillées des mutants nuls *dronc* démontrent que *dronc* est requis pour la mort cellulaire, entre autre, dans l'intestin et le cerveau larvaire, dans les disques imaginaux d'œil et d'aile, dans les neuroblastes et dans les cellules des glandes salivaires au cours de la métamorphose (Daish *et al.*, 2004; Waldhuber *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Dronc est donc essentiel pour l'apoptose survenant au cours du développement de la drosophile que ce soit pendant l'embryogenèse, au cours des stades larvaires ou de la métamorphose. Une analyse clonale montre que les tissus adultes sont également affectés par la perte de fonction de *dronc* (Chew *et al.*, 2004). En outre, Dronc est requis pour l'apoptose induite par différents stress cellulaires (**Figure 3**) tel que des dommages à l'ADN ou une perturbation de la synthèse protéique (Chew *et al.*, 2004; Daish *et al.*, 2004; Waldhuber *et al.*, 2005). De façon cohérente avec cette fonction pro-apoptotique, la surexpression de *dronc* dans l'œil en développement induit de la mort cellulaire et une perte de tissus (Hawkins *et al.*, 2000; Meier *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2000). Toutefois, bien que Dronc soit la principale caspase initiatrice, l'apoptose et l'activation des caspases peuvent survenir de façon indépendante de *dronc* dans certains tissus (Daish *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005).

En plus de ses fonctions pro-apoptotiques, Dronc assure des rôles non-apoptotiques (**Figure 4**) dans la migration cellulaire, l'individualisation des spermatides, la prolifération compensatoire, la différenciation des précurseurs des organes sensoriels ou encore le remodelage des tissues dans l'élagage des dendrites (D'Brot *et al.*, 2013; Hay and Guo, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Dronc possède un domaine CARD dans son pro-domaine (**Figure 2**) (Dorstyn *et al.*, 1999a). Chez les mammifères, une interaction homotypique entre le domaine CARD de la caspase 9 et un motif similaire de l'adaptateur APAF1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), en présence de cytochrome c et d'ATP permet le recrutement de la caspase 9 dans un complexe multimérique appelé apoptosome. L'activation de la caspase 9 survient au sein de ce complexe. Bien que le rôle du cytochrome c dans la mort cellulaire chez la drosophile reste controversée (*cf*. paragraphe I.B.4.a), Dark (Death-associated APAF1-related killer), homologue d'APAF1 joue un

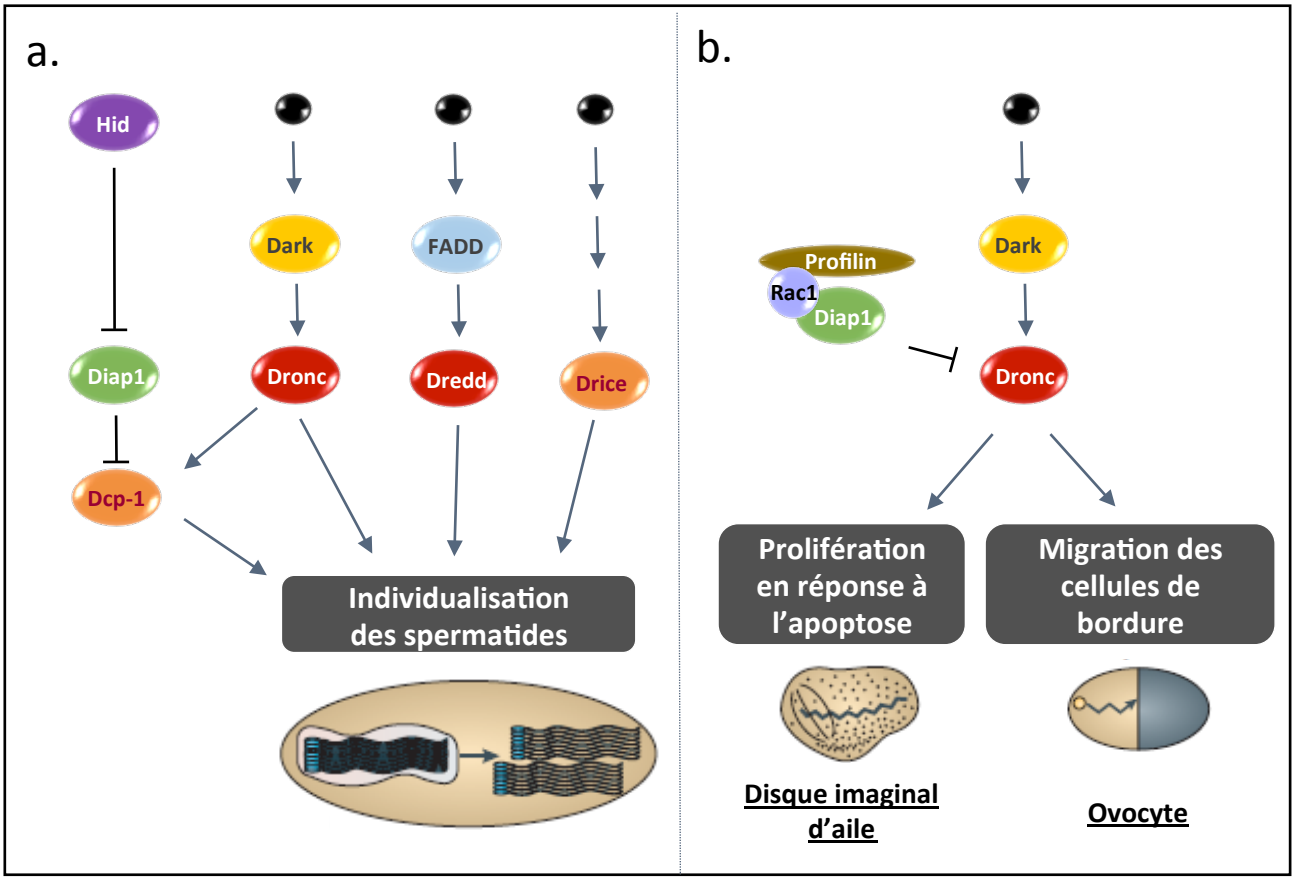


Figure n°4 : Rôles non apoptotiques des caspases chez la drosophile.

(a) Au cours des stades tardifs de la spermatogenèse, les spermatides qui se développent au sein d'un syncytium doivent être séparés les uns des autres. Cette individualisation implique Hid, Dark, FADD et les caspases Dronc, Dcp-1, Drice et Dredd. Le mécanisme par lequel les caspases sont activées et les cibles clivées restent à identifier.

(b) Au cours de l'ovogenèse, pendant la migration des cellules de bordure (cellules folliculaires somatiques), la Profilin et Rac1 activent Diap1 qui régule l'activité de Dronc. Dronc participe à la migration des cellules de bordure. Chez la drosophile, lorsque les cellules du disque imaginal d'aile meurent suite à un stress, elles sont remplacées par des cellules voisines par un mécanisme de prolifération en réponse à l'apoptose. Ceci permet de maintenir une taille correcte du tissu. Dronc est requis pour ce phénomène de prolifération en réponse à l'apoptose.

Adapté de Hay *et al.*, 2004 et Hay *et al.*, 2006

rôle dans l'activation de Dronc. Dark possède un domaine CARD (Kanuka *et al.*, 1999a; Rodriguez *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999) et est capable d'interagir avec Dronc (Quinn *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006) formant ainsi un apoptosome chez la drosophile.

Dronc est capable de s'auto-cliver après un résidu glutamate en position 352 (E352) entre la petite sous-unité et la grande sous-unité (Dorstyn and Kumar, 2008; Yan *et al.*, 2006). Ce clivage favorise la formation d'un homodimère stable de Dronc et la formation d'un site catalytique actif. En effet, après clivage au résidu E352, Dronc forme un dimère stable en solution alors que le mutant Dronc E352A (au sein duquel le glutamate en position 352 est remplacé par une alanine) qui ne peut pas être clivé reste sous forme monomérique comme c'est le cas pour la forme zymogène. Au sein du dimère, les monomères adjacents stabilisent mutuellement leur site actif ce qui conduit à une augmentation drastique de l'activité catalytique *in vitro* (Yan *et al.*, 2006). Le recrutement de Dronc par Dark au sein de l'apoptosome facilite le clivage initial de Dronc au résidu E352 (Hawkins *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2006). Toutefois, au cours du processus de mort cellulaire, le domaine CARD de Dronc est clivé (Muro *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). L'apoptosome participe donc à l'activation initiale de Dronc en recrutant le zymogène mais une fois Dronc activé, son interaction avec Dark n'est plus requise pour exercer son activité pro-apoptotique. Ces données concernant le rôle de l'auto-clivage de Dronc sont aujourd'hui controversées. Dorstyn *et al.* indiquent que l'auto-clivage de Dronc n'est pas essentiel pour son activation et sa fonction pro-apoptototique (Dorstyn and Kumar, 2008). En effet, une mutation de *dronc* au site E352 n'altère ni l'activité catalytique de Dronc sur ses substrats, ni sa capacité à induire de l'apoptose. Une autre étude menée *in vitro* conforte ces données en indiquant que le clivage de Dronc en position E352 n'est ni nécessaire ni suffisant pour l'activation de Dronc (Snipas *et al.*, 2008). En outre, *in vitro*, Dark n'est pas suffisant pour induire seul une activation de Dronc (Dorstyn and Kumar, 2008). Un facteur additionnel, qui reste à identifier, permet une augmentation importante de l'activation de Dronc induite par Dark.

La caspase initiatrice Dredd contient deux domaines DED dans son pro-domaine (**Figure 2**) et est similaire à la caspase 8 de mammifères (Chen *et al.*, 1998). La perte de fonction de *dredd* n'entraine pas de défauts importants du programme de mort cellulaire développementale. Toutefois les mutants *dredd* sont résistants à la mort induite par la surexpression des gènes pro-apoptotiques *reaper*, *hid* et *grim* (Chen *et al.*, 1998). Initialement, on accordait donc à Dredd un rôle pro-apoptotique. En réalité, des analyses génétiques ont établi que Dredd joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire innée (Elrod-Erickson *et al.*, 2000; Leulier *et al.*, 2000). En effet, la perte de fonction de *dredd* augmente considérablement la sensibilité des mouches à une infection par des bactéries Gram négative et altère la synthèse des peptides antimicrobiens induite en réponse à cette infection. Le rôle de Dredd a ensuite été précisé : suite à une infection bactérienne, Dredd permet le clivage protéolytique et l'activation de Relish, un facteur de transcription de la famille NF-κB (nuclear factor-kappa B) (Kim *et al.*, 2014; Stoven *et al.*, 2000; Stoven *et al.*, 2003). En outre, Dredd a également un rôle dans l'individualisation des spermatides (**Figure 4**) (Huh *et al.*, 2004b).

Strica possède un long pro-domaine N-terminal caractéristique des caspases initiatrices. Toutefois Strica est une caspase atypique car son pro-domaine est dépourvu de domaines CARD et DED mais contient un domaine riche en serine et thréonine de fonction inconnue (**Figure 2**) (Doumanis *et al.*, 2001). La surexpression de *strica* dans des cellules de drosophile en culture induit de la mort cellulaire ce qui laisse penser que Strica pourrait assurer un rôle dans l'apoptose développementale. L'expression d'un ARN interférent (ARNi) dirigé contre *strica* retarde la mort des cellules inter-ommatidiales et l'élimination des glandes salivaires (Leulier *et al.*, 2006). Par ailleurs, Strica et Dronc ont un rôle redondant d'une part dans la mort cellulaire des cellules nourricières au cours de l'ovogenèse (Baum *et al.*, 2007) et d'autre part dans l'apoptose des neurones peptidergiques pendant la métamorphose (Lee *et al.*, 2011a). Les cibles cellulaires de Strica sont, à ce jour, inconnues, le mécanisme d'action précis de cette caspase atypique reste donc à déterminer.

c) Les caspases effectrices chez la drosophile

Drice, Dcp-1, Decay et Damm possèdent un pro-domaine court (**Figure 2**) et sont donc considérées comme des caspases effectrices chez la drosophile. Bien que l'expression ectopique de *decay* et *damm* déclenche de l'apoptose dans des cellules en culture (Dorstyn *et al.*, 1999b; Harvey *et al.*, 2001), ces deux caspases ne sont pas requises pour la mort développementale. *decay* est très exprimée dans l'intestin larvaire moyen au cours de sa destruction (Dorstyn *et al.*, 1999b) mais la perte de fonction de *decay* n'altère pas l'élimination de cette structure larvaire (Denton *et al.*, 2009). Des données suggèrent que Decay pourrait agir de façon redondante avec la machinerie canonique d'apoptose dans des contextes spécifiques (Leulier *et al.*, 2006) . Le rôle physiologique de ces deux caspases reste à déterminer.

Les deux autres caspases effectrices, Drice et Dcp-1 partagent un fort niveau d'homologie entre elles. De plus, elles sont toutes les deux exprimées pendant tout le développement (Arbeitman *et al.*, 2002; Fraser and Evan, 1997) et sont clivées et activées par Dronc (Hawkins *et al.*, 2000; Meier *et al.*, 2000; Muro *et al.*, 2002). Toutefois les mutants nul pour *dcp-1*, bien qu'ils présentent des défauts dans la mort des cellules germinales induite par une privation de nutriment au cours de l'ovogenèse, sont viables, fertiles et ne présentent pas de défauts majeurs (Laundrie *et al.*, 2003) alors que les mutants *drice* présentent de nombreux défauts développementaux et meurent au stade pupal (Kondo *et al.*, 2006; Muro *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Une grande partie de la mort embryonnaire est abolie en absence de *drice*. En outre les cellules mutantes pour *drice* sont résistantes à l'apoptose induite par différents stress comme l'irradiation ou une inhibition de la synthèse protéique (Muro *et al.*, 2006). De plus, une immunodéplétion de Drice est suffisante pour éliminer la quasi-totalité de l'activité apoptotique dans des cellules de drosophile en culture (Fraser *et al.*, 1997). Drice est donc considérée comme la principale caspase effectrice chez la drosophile. Toutefois Drice et Dcp-1 fonctionnent de manière redondante pendant l'apoptose de certaines cellules au cours de l'ovogenèse, de l'embryogenèse et de la métamorphose ((Baum *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2006)

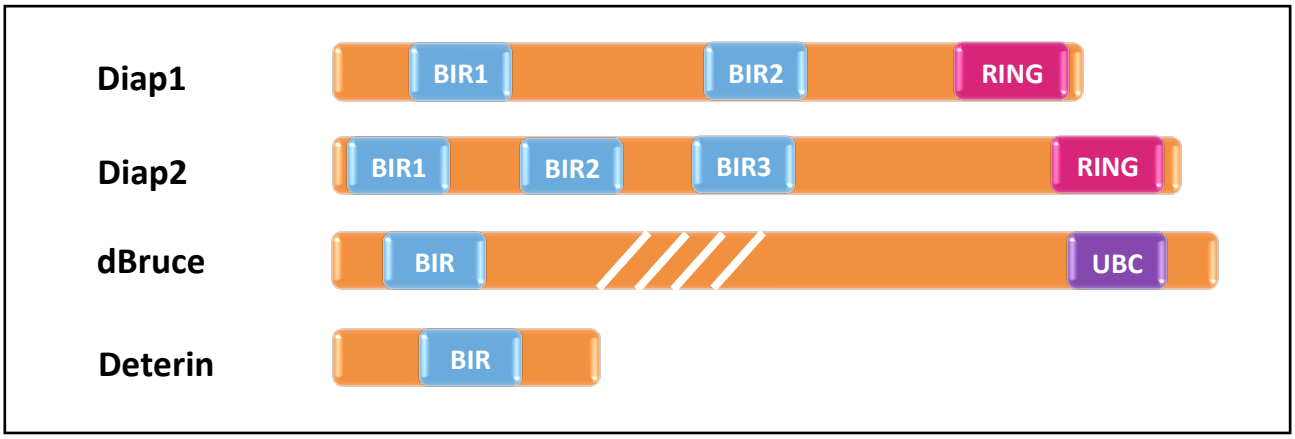


Figure n°5 : Structure des membres de la famille des IAPs chez la drosophile
Représentation schématique des quatre IAPs de drosophile. Toutes les IAPs possèdent au moins un domaine BIR (baculovirus IAP repeat). Ce domaine permet des interactions protéine/protéine. Diap1 et Diap2 possède un domaine RING (Really Interesting New Gene) en C-terminal qui joue le rôle d'E3 ubiquitine ligase. dBruce possède un domaine UBC (ubiquitin conjugating) en C-terminal.
Adapté de Bergmann *et al.*, 2003, Xu *et al.,* 2009 et Bergmann, 2010.

Chez la drosophile, Dronc, Drice et Dcp-1 sont donc les principales caspases impliquées dans les événements apoptotiques. Une fois activée, Dronc clive et active Drice et/ou Dcp-1 qui vont ensuite cliver plusieurs substrats cellulaires déclenchant ainsi l'apoptose.

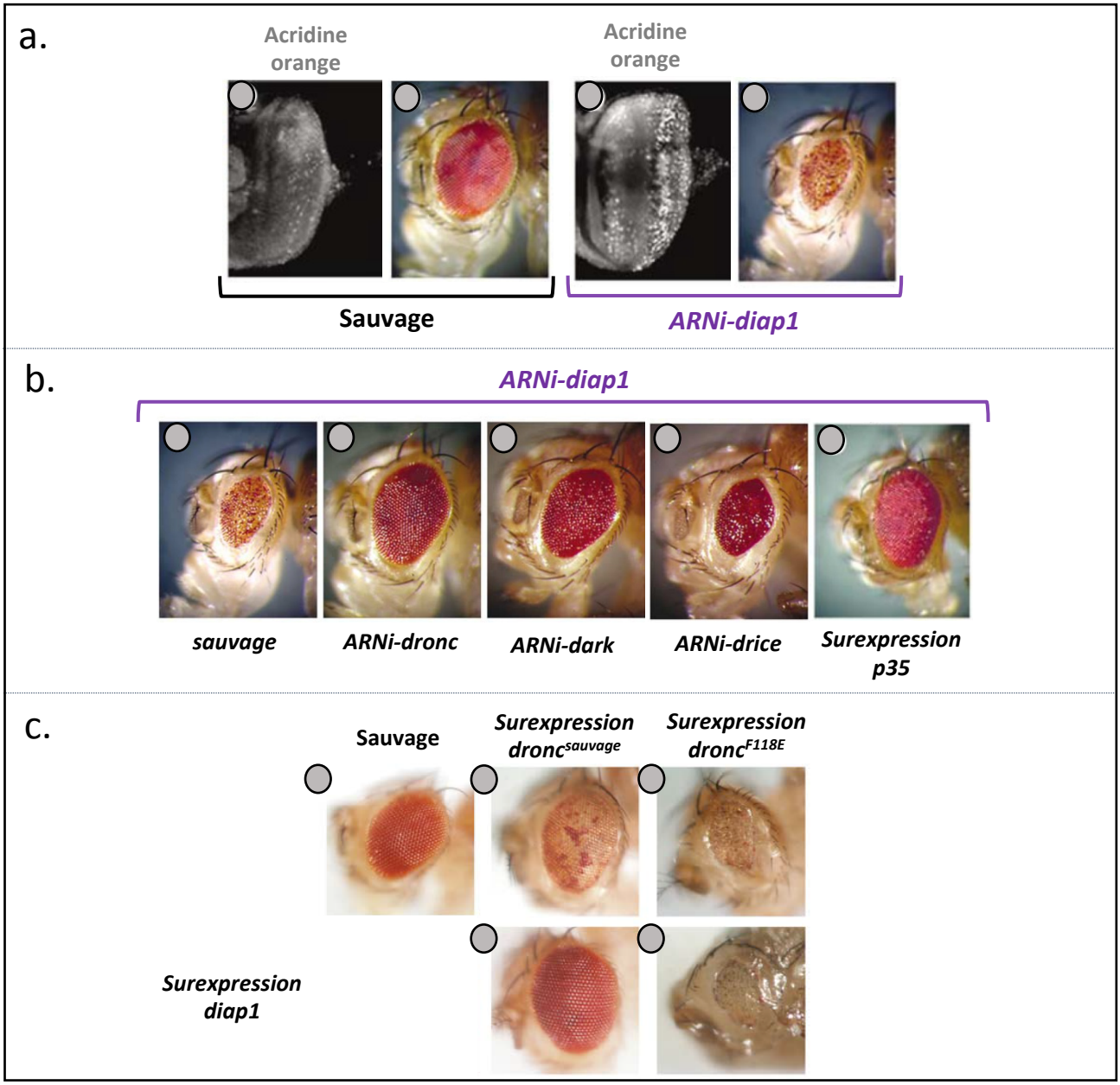
Des forces opposées modulent l'activité des caspases, qui sont présentes de façon constitutive dans la plupart des cellules sous la forme zymogène. En effet, des protéines adaptatrices telle que Dark chez la drosophile agissent positivement sur les caspases initiatrices alors qu'un contrôle négatif est assuré par les membres de la famille des IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Plusieurs stratégies sont donc utilisées pour contrôler le niveau de caspases actives. Toutefois l'importance de ces différents points de contrôle sur le statut des caspases varient en fonction de l'organisme considéré.

2. Les inhibiteurs de caspases : les IAPs

Les Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs) sont des protéines conservées au cours de l'évolution qui contrôlent l'apoptose chez les vertébrés et les invertébrés. Elles possèdent de une à trois copies d'un domaine conservé d'environ 70 acides aminés appelé BIR (Baculovirus IAP Repeat). Il existe quatre IAPs chez la drosophile (Bergmann *et al.*, 2003) : Diap1 (Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1), Diap2 (Drosophila inhibitor of apoptosis protein 2), dBruce (Drosophila BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) et Deterin (**Figure 5**). Diap2 et dBruce sont capables de lier et de contrôler l'activité des caspases mais leur rôle dans le contrôle de l'apoptose est assez limité. Diap2 joue un rôle dans l'immunité innée en régulant la caspase Dredd (Huh *et al.*, 2007; Leulier *et al.*, 2006; Meinander *et al.*, 2012) et dBruce régule les caspases au cours d'un processus non-apoptotique pendant la spermatogenèse (Kaplan *et al.*, 2010). La fonction de Deterin dans la mort développementale reste à ce jour inconnue (Jones *et al.*, 2000). Ces trois IAPs assurent donc un rôle mineur dans le contrôle de l'apoptose chez la drosophile.

a) Diap1 : un facteur essentiel à la survie cellulaire chez la drosophile

Diap1 est essentiel pour assurer la survie cellulaire. En effet la perte de fonction de *diap1* conduit à une apoptose massive, que ce soit au cours du développement (Goyal *et al.*, 2000; Leulier *et al.*, 2006; Lisi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999; Yin and Thummel, 2004) (**Figure 6**) ou en culture cellulaire (Igaki *et al.*, 2002b; Muro *et al.*, 2002). De façon cohérente avec ce rôle critique dans la survie cellulaire, les embryons homozygotes mutants pour *diap1* sont létaux embryonnaires (Wang *et al.*, 1999). Par ailleurs, la surexpression de *diap1* bloque la mort cellulaire dans différents contextes (Hay *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2000).



<u>Figure n°6</u> : La réduction du niveau de *diap1* induit une mort cellulaire dépendante des caspases

(a) Analyse de la mort cellulaire par un marquage à l'acridine orange au sein de disques imaginaux d'œil provenant de larves sauvages (1) et de larves exprimant un ARNi dirigé contre *diap1* sous contrôle de l'inducteur *GMR* (3). La réduction du niveau de *diap1* induit un niveau élevé de mort cellulaire dans l'œil en développement ce qui conduit à un phénotype d'œil réduit au stade adulte (4) par rapport aux yeux des individus sauvages (2).
Issu de Leulier *et al.*, 2006

(b) La perte de fonction de la caspase initiatrice *dronc,* de l'adaptateur *dark*, ou de la caspase effectrice *drice* supprime le phénotype d'œil réduit induit par la perte de fonction de *diap1*. De même, un sauvetage est observé suite à la surexpression de l'inhibiteur de caspases *p35.* Ces données indiquent que la mort cellulaire observée suite à la réduction du niveau de *diap1* dépend des caspases.
Issu de Leulier *et al.*, 2006

(c) La surexpression de $dronc^{sauvage}$ (2), ou de $dronc^{F118E}$ (3) (codant pour une forme mutante de Dronc incapable de lier Diap1) induit un phénotype d'œil réduit comparé aux yeux des individus sauvages (1). La surexpression de *diap1* restaure une taille d'œil correcte dans le cas de la co-expression de $dronc^{sauvage}$ (4) mais pas pour la co-expression de la forme mutante $dronc^{F118E}$ (5). Par conséquent l'interaction entre Diap1 et Dronc est requise pour que Diap1 inhibe la mort induite par Dronc.
Issu de Chai *et al.*, 2003

b) Régulation négative des caspases par Diap1

Un certain nombre de données indiquent que Diap1 assure sa fonction anti-apoptotique en inhibant les caspases (**Figure 6**). En effet la mort cellulaire induite par la perte de fonction de *diap1* peut être supprimée par une réduction du niveau de *dark* (Igaki *et al.*, 2002b; Rodriguez *et al.*, 2002), de *dronc* (Igaki *et al.*, 2002b) ou de *drice* (Xu *et al.*, 2006) ou par l'expression d'un inhibiteur de caspases (*p35*) (Leulier *et al.*, 2006). En outre la surexpression de *diap1* bloque la mort induite par l'expression de *drice* (Kaiser *et al.*, 1998), de *dcp-1* (Hawkins *et al.*, 1999), de *dronc* (Hawkins *et al.*, 2000; Meier *et al.*, 2000) ou de *strica* (Doumanis *et al.*, 2001).

Diap1 possède deux domaines BIR et un domaine RING (Really Interesting New Gene) C-terminal (**Figure 5**). Les domaines BIR sont des modules d'interaction protéique qui permettent à Diap1 de lier les caspases. Les différentes caspases lient des domaines BIR différents de Diap1 : alors que la région BIR1 de Diap1 est essentielle pour la liaison des caspases effectrices Drice et Dcp-1 (Yan *et al.*, 2004; Zachariou *et al.*, 2003), la région BIR2 permet l'association avec la caspase initiatrice Dronc (Chai *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2000). Par conséquent Diap1 peut lier simultanément Dronc et Drice ou Dronc et Dcp-1 (Zachariou *et al.*, 2003). De façon intéressante, les mutations qui augmentent la capacité de Diap1 de s'associer aux caspases effectrices sont des mutations gains de fonction alors que celles qui altèrent la liaison de Diap1 aux caspases sont des mutations pertes de fonction et conduisent à de la mort cellulaire ectopique (Goyal *et al.*, 2000; Zachariou *et al.*, 2003). Ces données soulignent le fait que l'association physique de Diap1 avec les caspases joue un rôle crucial dans la régulation de la cascade apoptotique et est essentielle pour la survie cellulaire (**Figure 6**). Néanmoins, les caspases effectrices liées à Diap1 restent catalytiquement actives *in vitro* (Tenev *et al.*, 2005). De plus une forme mutante de Diap1 dépourvue du domaine RING est incapable d'inhiber l'apoptose induite par l'expression ectopique d'un gène pro-apoptotique en cellules S2 même si elle conserve sa capacité d'interaction avec les caspases (Wilson *et al.*, 2002). Bien qu'elle soit nécessaire, l'interaction physique entre Diap1 et les caspases n'est donc pas suffisante pour inhiber la mort cellulaire.

Le domaine RING de Diap1 assure une fonction d'E3 ubiquitine ligase, c'est-à-dire qu'elle permet la conjugaison de l'ubiquitine sur des substrats particuliers. L'ubiquitine est une protéine de 8kDa qui peut être attachée de façon covalente sur des protéines cibles dans un processus à étapes qui implique trois types différents d'enzymes. L'ubiquitine libre est liée de façon covalente et activée par une enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine. A partir de l'E1, l'ubiquitine est transférée sur une enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine. L'E3 ubiquitine ligase confère la spécificité de substrat et permet le transfert de l'ubiquitine depuis l'E2 sur un résidu lysine particulier du substrat cible. L'ubiquitine peut être attachée au substrat sous la forme d'une protéine unique (mono-ubiquitine) ou sous la forme d'une chaine de poly-ubiquitines (les monomères sont liés les uns aux autres par le résidu lysine en position 48 (K48) ou en position 63 (K63) de l'ubiquitine) (Hochstrasser, 2009). Les substrats liés à une chaine de poly-ubiquitines K48 sont dégradés par le protéasome 26S alors que la mono-ubiquitination ou la liaison d'une chaine de poly-ubiquitines K63 sont impliquées dans une variété de processus n'impliquant pas la dégradation (Haglund and Dikic, 2005).

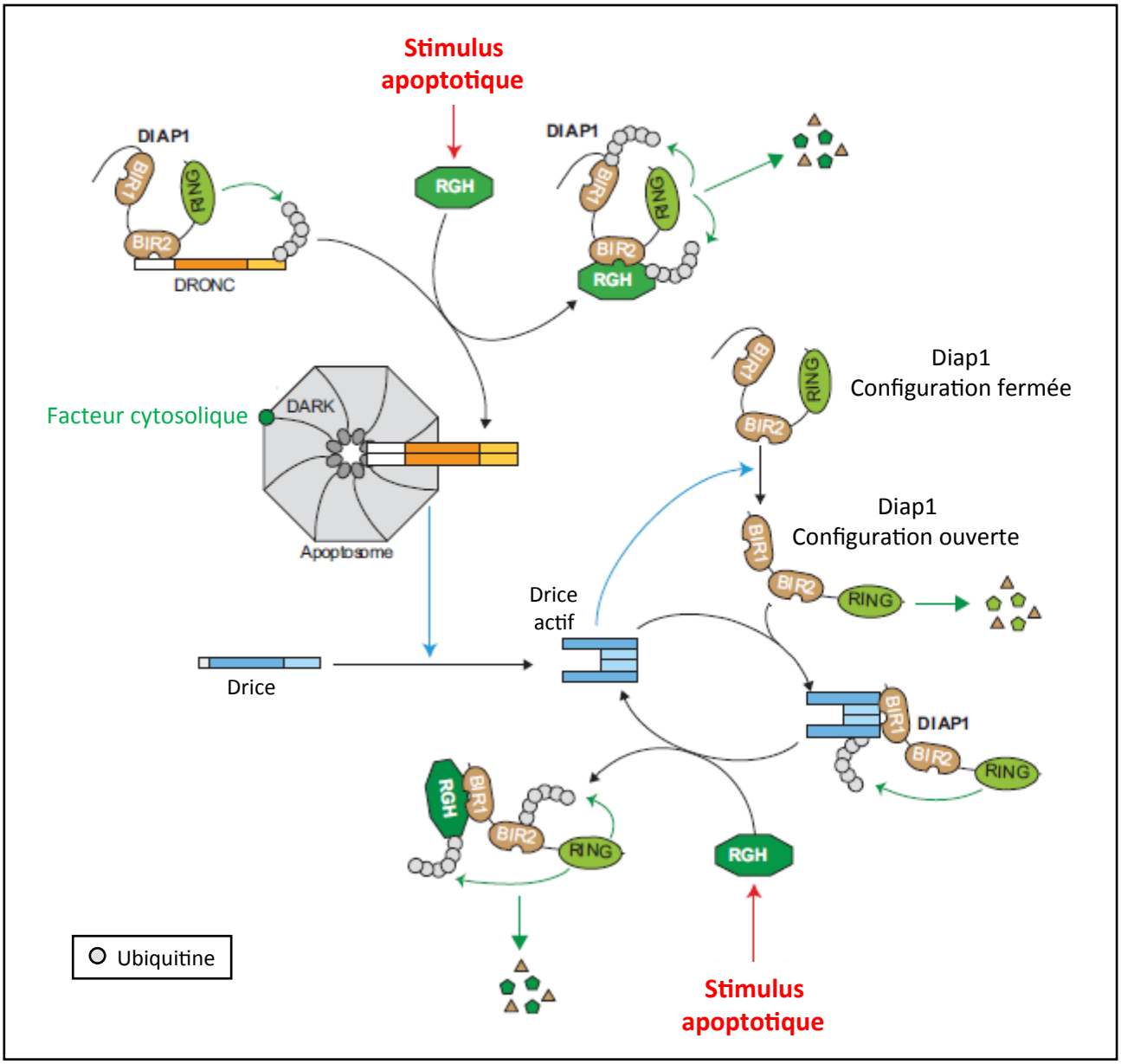


Figure n°7 : Régulation des caspases par Diap1

Dans les cellules vivantes, l'activation de la cascade de caspases est maintenue en échec par une interaction directe des caspases avec Diap1.

Inhibition de la caspase initiatrice Dronc : Le domaine BIR2 de Diap1 lie le pro-domaine de la caspase initiatrice Dronc et le domaine RING de Diap1 induit une ubiquitination de Dronc ce qui empêche l'assemblage de l'apoptosome.

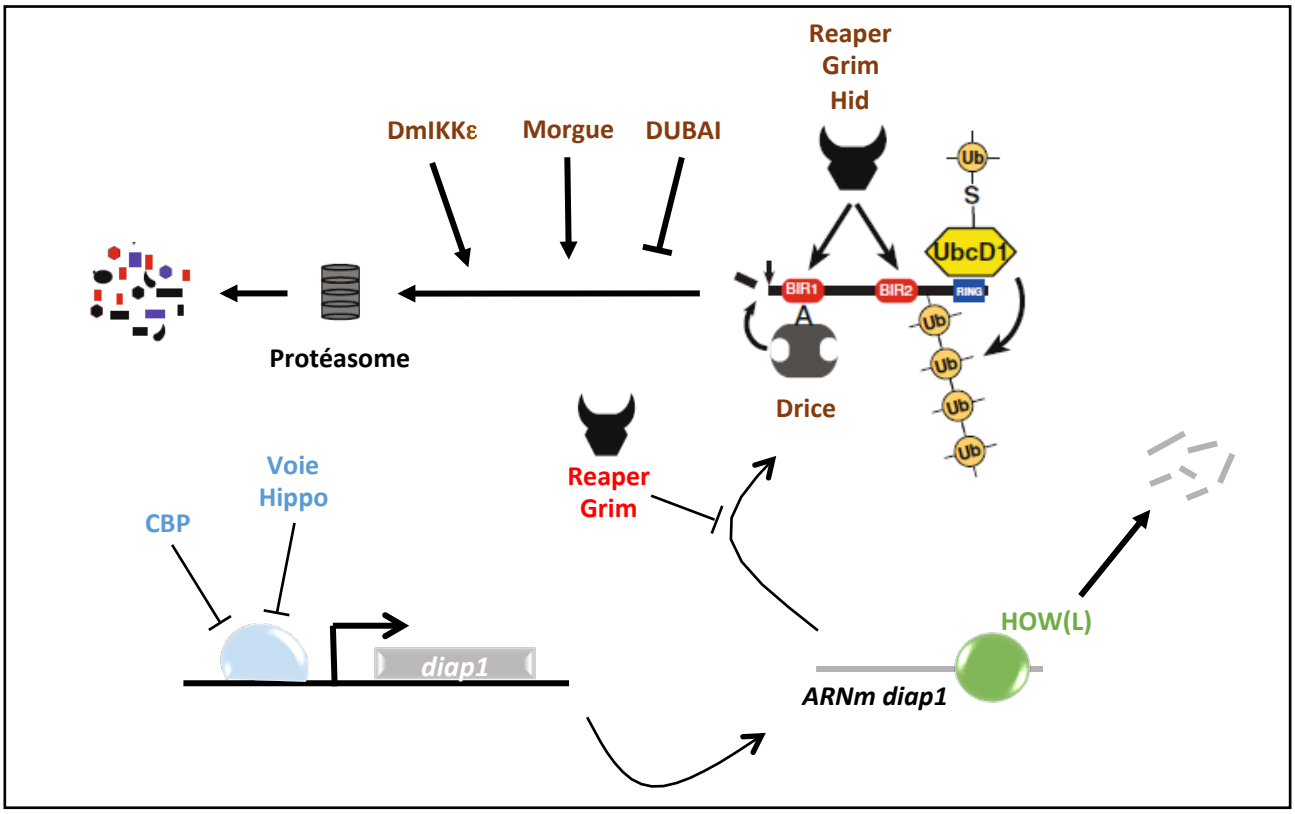
Inhibition de la caspase effectrice Drice : Diap1 est présent dans une « conformation fermée » dans laquelle son extrémité N-terminale masque un sillon à la surface du domaine BIR1. Les caspases effectrices actives clivent l'extrémité N-terminale de Diap1 ce qui libère le domaine BIR1 qui peut alors interagir avec la forme active de Drice. Diap1 inhibe l'activité de Drice par ubiquitination et neddylation. La forme « ouverte » de Diap1 est hautement instable, elle est rapidement dégradée du fait de la présence d'un résidu déstabilisateur à son extrémité N-terminale.

Un stimulus apoptotique induit l'expression des gènes de la famille RHG. Les protéines RHG possèdent un domaine IBM (IAP binding motif) qui leur permet de lier fortement Diap1. L'interaction entre Diap1 et les antagonistes des IAPs favorise l'auto-ubiquitination de Diap1 et sa dégradation.

Adapté de Berthelet and Dubrez, 2013

Une étude *in vitro* indique que le domaine RING de Diap1 est capable d'ubiquitiner la forme entière de Dronc (Wilson *et al.*, 2002). Comme la protéine Dronc s'accumule dans des cellules mutantes pour *diap1* gardées en vie par l'expression de *p35* (« cellules undead ») (Ryoo *et al.*, 2004), on a longtemps pensé que l'ubiquitination de Dronc par Diap1 conduisait à la dégradation de la pro-forme de la caspase initiatrice par le protéasome. Toutefois, le niveau protéique de Dronc n'est pas augmenté en présence d'inhibiteurs du protéasome. De plus, Dronc s'accumule dans les « cellules undead » du fait d'une augmentation de la transcription de *dronc* (Lee *et al.*, 2011b). L'ubiquitination de la forme zymogène de Dronc par Diap1 ne conduit donc pas à sa dégradation par le protéasome. L'hypothèse selon laquelle l'ubiquitination de la pro-forme de Dronc serait de type K63 n'a pas encore été vérifiée. L'équipe d'Andreas Bergmann a pu montrer que cette ubiquitination inhibe en réalité le clivage et l'activation de Dronc (Lee *et al.*, 2011b) (**Figure 7**). Ces données sont appuyées par le fait que Diap1 peut ajouter des chaines d'ubiquitines à son substrat dans une configuration qui n'est pas reconnue par le protéasome (Herman-Bachinsky *et al.*, 2007). Toutefois, la conséquence de l'ubiquitination de Dronc par Diap1 est différente lorsque Dronc est au sein de l'apoptosome. En effet, Diap1 ajoute des chaines de poly-ubiquitines (sans doute de type K48) à Dronc quand ce dernier est présent sous une forme active et clivée, liée à Dark au sein de l'apoptosome (Muro *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2008). Ceci conduit à l'adressage de Dronc au protéasome. Par conséquent, Diap1 inhibe Dronc à deux niveaux : d'une part Diap1 ajoute des chaines d'ubiquitines à la forme entière et monomérique de Dronc ce qui inhibe son activation et d'autre part Diap1 poly-ubiquitine Dronc actif au sein de l'apoptosome ce qui conduit à sa dégradation.

Le mécanisme d'inhibition des caspases effectrices par Diap1 diffère de celui exercé par Diap1 sur Dronc. Diap1 interagit avec les caspases effectrices uniquement après qu'elles aient été clivées et activées (Kaiser *et al.*, 1998; Zachariou *et al.*, 2003) (**Figure 7**). Diap1 doit lui-même être clivé pour interagir avec les caspases effectrices. En effet, sous sa forme native, Diap1 reste dans une conformation fermée (Li *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2007) dans laquelle sa séquence N-terminale lie et occupe le sillon à la surface du domaine BIR1 empêchant l'interaction Diap1/Drice (Li *et al.*, 2011). L'auto-inhibition de Diap1 est levée par un clivage de Diap1 par Drice après le résidu asparagine en position 20 qui libère le sillon à la surface de BIR1 et rend Diap1 totalement compétent pour lier et inhiber Drice actif (Ditzel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2007; Yokokura *et al.*, 2004). Mais ce clivage rend Diap1 hautement instable. Il a été montré que la demi-vie d'une protéine est contrôlée, au moins en partie, par l'identité du résidu N-terminal. La présence d'un résidu déstabilisateur en N-terminal tel que l'asparagine induit une dégradation rapide de la protéine par la voie ubiquitine-protéasome (Varshavsky, 2011). La forme entière de Diap1 ne contient pas de résidu déstabilisateur en N-terminal mais le clivage par les caspases effectrices en position 20 permet d'en exposer un et donc de favoriser la dégradation de Diap1 (Ditzel *et al.*, 2003; Herman-Bachinsky *et al.*, 2007; Tenev *et al.*, 2007; Varshavsky, 2003). En clivant Diap1, les caspases effectrices le déstabilisent et initient leur propre inhibition. En effet, Diap1 est capable d'ubiquitiner Drice (**Figure 7**). Une étude récente indique qu'Ubr3 (*CG42593*), une E3 ubiquitine ligase, interagit avec Diap1 et favorise le recrutement et l'ubiquitination des caspases par Diap1 (Huang *et al.*, 2014). La perte de l'ubiquitination de Drice, soit par le biais d'une altération de l'activité E3 ubiquitine ligase de Diap1 soit *via* l'utilisation d'une forme non-ubiquitinilable de Drice, rend Drice résistant à l'inhibition par Diap1 (Ditzel *et al.*,



<u>Figure n°8</u> : Régulation de Diap1

Diap1 subit des régulations transcriptionnelles (bleu), post-transcriptionnelles (vert), traductionnelles (rouge) et post-traductionnelles (marron). La voie de signalisation Hippo et le co-facteur de transcription CBP régulent négativement la transcription de *diap1*. La protéine de liaison aux ARNm How(L) lie le 3'UTR du transcrit *diap1* ce qui conduit à sa dégradation. Reaper et Grim inhibent la traduction générale donc celle de Diap1. Au niveau protéique, le clivage en N-terminal de la protéine Diap1 par Drice expose un résidu déstabilisateur ce qui conduit à la dégradation de Diap1. Les membres de la famille RHG (Reaper, Hid et Grim) se lient à Diap1 et stimulent son ubiquitination permettant ainsi son adressage au protéasome. Le niveau protéique de Diap1 est également réduit suite à sa phosphorylation par la kinase DmIKKε. DUBAI, enzyme de déubiquitination, s'oppose à la dégradation de Diap1.

Adapté de Orme *et al.*, 2009

2008). L'ajout d'ubiquitine est donc essentiel pour la régulation négative de Drice par Diap1. Cette ubiquitination de Drice n'induit pas sa dégradation par le protéasome mais abolit l'activité catalytique de la caspase (Ditzel *et al.*, 2008) sans doute en interférent avec l'entrée du substrat ou en altérant la conformation de la poche catalytique de la caspase. Pour finir, il a été montré qu'en plus de sa capacité à ubiquitiner, Diap1 assure une neddylation des caspases effectrices qui participent à leur inactivation (Broemer *et al.*, 2010).

c) Régulation du facteur anti-apoptotique Diap1

Diap1 est donc un régulateur important de l'activité des caspases chez la drosophile. Les facteurs déclenchant une activation des caspases peuvent réduire le niveau de Diap1 en agissant à plusieurs niveaux (**Figure 8**). *diap1* est soumis à une régulation transcriptionnelle par la voie de signalisation Hippo. Cette voie régule négativement la taille des tissus en contrôlant la croissance cellulaire et l'apoptose. La voie Hippo, en inhibant le facteur de transcription Yorkie, réprime l'expression de *diap1* ce qui déclenche la mort cellulaire (Huang *et al.*, 2005). Par ailleurs, au cours de la métamorphose, le co-facteur transcriptionnel CBP (CREB binding protein) est requis pour la réduction du niveau d'ARNm *diap1*, elle-même à l'origine de l'élimination des glandes salivaires (Yin *et al.*, 2007). Diap1 est également soumis à une régulation post-transcriptionnelle. How (Held out wing) est une protéine de liaison aux ARNm de la famille STAR (Signal Transduction and Activation of RNA). Cette protéine est capable de lier un motif conservé présent dans la séquence 3'UTR de certains ARNm. La liaison de How à un ARNm donné va modifier son niveau. Il existe deux variants d'épissage de *how* : un variant court noté *how(S)* et une variant long appelé *how(L).* Ce variant long est un répresseur du niveau d'ARNm. Une élégante étude menée par l'équipe de Talila Volk a montré que la liaison de How(L) sur le 3'UTR de *diap1* conduit à la dégradation du transcrit ce qui est requis pour la mort des cellules gliales de la ligne médiane au cours du développement (Reuveny *et al.*, 2009). En outre, DmIKKε (Drosophila IKK-related kinase) phosphoryle Diap1 ce qui favorise sa dégradation. Ceci conduit à l'activation des caspases au cours d'un processus non-apoptotique pendant le développement des organes sensoriels (Kuranaga *et al.*, 2006). Diap1 peut donc également être régulé au niveau post-traductionnel. Ce sont les membres de la famille RHG (Reaper, Hid, Grim) qui assurent la part la mieux connue de ce niveau de régulation. Leur mode d'action sera détaillé dans la partie suivante.

3. Les facteurs pro-apoptotiques de la famille RHG

Un crible génétique, réalisé en 1994 par l'équipe d'Hermann Steller, a révélé que les embryons homozygotes mutants pour la délétion *H99* ne présentent pas de mort cellulaire développementale et sont résistants à l'apoptose induite par irradiation (White *et al.*, 1994). Cette délétion élimine 300kb d'ADN génomique dans la région 75C1 du chromosome 3. Des études ont permis de mettre en évidence que cette région contient trois gènes, *reaper* (rpr), *hid* (*head involution defective*) et *grim* et qu'ils sont tous les trois requis pour l'apoptose (Chen *et al.*, 1996b; Grether *et al.*, 1995; White *et al.*, 1996). Ces gènes sont communément appelés

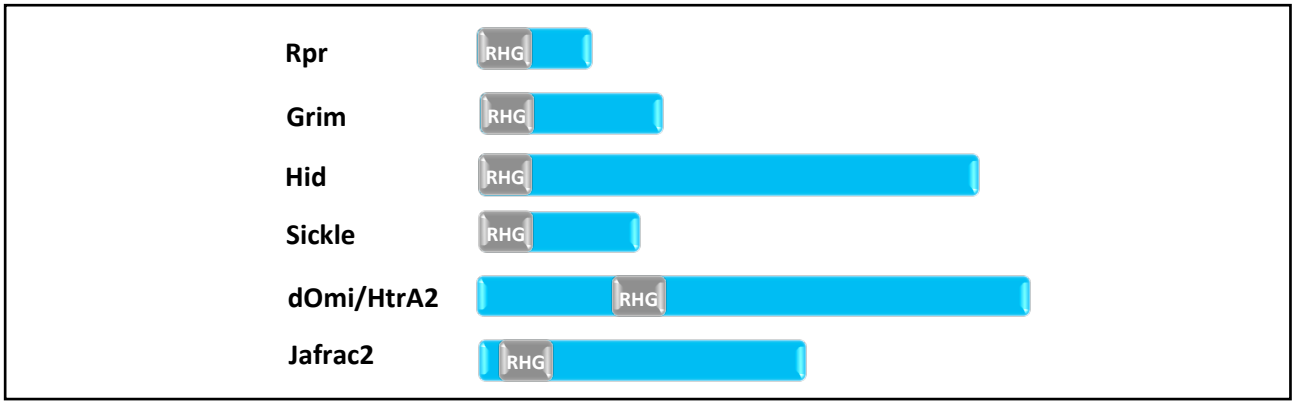


Figure n°9 : Représentation schématique de la structure des membres de la famille RHG chez la drosophile

Toutes les protéines RHG possèdent un motif RHG également appelé IBM. Pour être fonctionnel, ce motif doit être localisé en N-terminal de la protéine. Cela survient après élimination de la méthionine initiatrice pour Rpr, Grim, Hid et Sickle. dOmi/HtrA2 et Jafrac2 exposent le motif RHG/IBM à leur extrémité N-terminale après un clivage post-traductionnel qui élimine une séquence d'adressage, respectivement à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique.

Adapté de Xu *et al.,* 2009 et Bergmann, 2010.

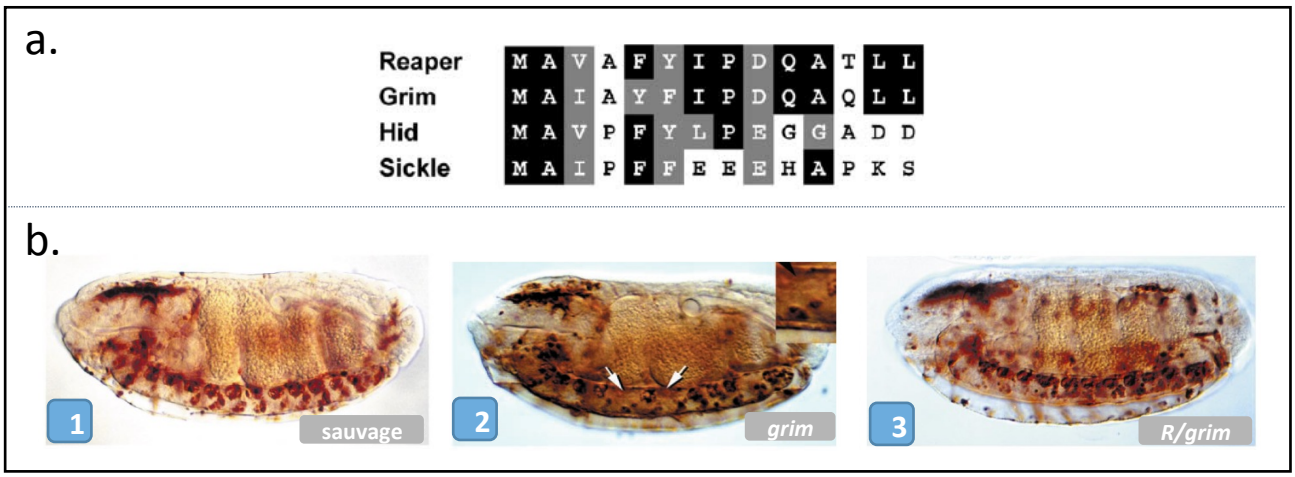


Figure n°10 : Les motifs IBM des protéines RHG présentent de fortes similarités mais ne sont pas interchangeables.

(a) Alignement du domaine conservé N-terminal de Rpr, Grim, Hid et Sickle. Ce domaine de 14 acides aminés, présent dans les 4 protéines, est responsable de l'interaction avec le domaine BIR des IAPs. On parle de motif IBM ou RHG.
Issu de Claveria and Torres, 2003

(b) Un marquage anti-β Galactosidase permet de visualiser les cellules gliales de la ligne médiane du système nerveux central embryonnaire en ventral ainsi qu'un sous-type de neurones. Suite à l'expression de *grim* (2) on observe une nette diminution du nombre de cellules gliales par rapport à un embryon sauvage (1). Cette observation est cohérente avec la fonction pro-apoptotique de Grim. Par contre, suite à l'expression de *R/grim* (3) (forme chimérique dans laquelle le motif RHG de Grim a été remplacé par celui de Rpr), on n'observe pas de variation du nombre de cellules gliales par rapport à un embryon contrôle (1). Le remplacement du motif RHG de Grim par celui de Rpr élimine la capacité de Grim d'induire la mort cellulaire dans la ligne médiane du système nerveux central embryonnaire.
Issu de Wing *et al.*, 1998 et Wing *et al.*, 2001

RHG pour Rpr, Hid et Grim. La surexpression de n'importe lequel de ces trois gènes est suffisante pour induire une mort cellulaire dépendante des caspases. Chez la drosophile, trois gènes supplémentaires appartenant à cette famille ont été identifiés : *jafrac2* (Tenev *et al.*, 2002), *sickle* (*skl*) (Christich *et al.*, 2002; Srinivasula *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002a) et *dOmi/HtrA2* (*drosophila Omi/high temperature requirement A2*) (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). Ces trois gènes étant moins bien caractérisés génétiquement et biochimiquement que *rpr, hid,* et *grim*, leur mode d'action ne sera pas détaillé ici (pour *dOmi/HtrA2* voir paragraphe I.B.4.d).

Les protéines RHG présentent peu de similarité mais elles possèdent un motif conservé en N-terminal appelé motif RHG ou IBM (IAP binding motif) (**Figures 9 et 10**). Ce motif est nécessaire pour que les protéines RHG assurent pleinement leurs fonctions pro-apoptotiques (Vucic *et al.*, 1998; Vucic *et al.*, 1997b; Wing *et al.*, 1998) (Haining *et al.*, 1999; McCarthy and Dixit, 1998; Wing *et al.*, 2001). De façon intéressante, ces motifs ne sont pas interchangeables (**Figure 10**). En effet, contrairement à l'expression de *grim*, l'expression d'une forme chimérique *R/grim* (dans laquelle le motif RHG de Grim a été remplacé par celui de Rpr) ne permet pas d'induire la mort des cellules de la ligne médiane du système nerveux central embryonnaire (Wing *et al.*, 2001). Les motifs RHG de Grim et de Rpr sont donc fonctionnellement différents. Cette donnée est en accord avec la faible redondance fonctionnelle entre les membres de la famille RHG. Il existe de nombreux cas d'apoptose développementale nécessitant spécifiquement un des gènes de la famille RHG. Par exemple, Hid est essentiel pour la mort des cellules inter-ommatidiales dans l'œil en développement (Yu *et al.*, 2002), alors que Grim est requis, d'une part, pour l'apoptose des cellules gliales dans le lignage des microchaetes (soies mécano-sensorielles présentes sur le thorax de la drosophile) (Wu *et al.*, 2010), et d'autre, pour la mort des précurseurs des neurones sensoriels au niveau de la marge postérieure de l'aile (Rovani *et al.*, 2012). En outre, Rpr et Hid sont spécifiquement requis pour la mort de différents sous-types neuronaux au sein de la médulla pendant la neurogenèse du cerveau larvaire (Bertet *et al.*, 2014). Toutefois, une coopération entre les différents membres de la famille RHG est nécessaire pour induire efficacement la mort de certains types cellulaires (Draizen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2013; Robinow *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2011; Wing *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1997).

Le profil d'expression des gènes *RHG* reflète assez bien le profil de mort cellulaire, notamment au stade embryonnaire. En effet, *grim* et *rpr* sont transcrits uniquement dans les cellules destinées à mourir (Chen *et al.*, 1996b; Robinow *et al.*, 1997; White *et al.*, 1994). *hid* fait exception en étant exprimé à la fois dans les cellules destinées à mourir et dans les cellules qui survivent (Bangs *et al.*, 2000). Ce profil dynamique d'expression des *RHG* reflète une régulation complexe de ces gènes (principalement transcriptionnelle). En effet, les promoteurs de *rpr*, *hid*, et *grim* sont capables de répondre à divers signaux développementaux et environnementaux contrôlant l'apoptose (Jiang *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2014; Kurada and White, 1998; Nordstrom *et al.*, 1996; Robinow *et al.*, 1997). Ces gènes partagent des régions régulatrices contenant de nombreux éléments « enhancer » ou « silencer » qui sont la cible de divers facteurs de transcription (Link *et al.*, 2013; Lohmann, 2003; Tan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008). Par exemple, en réponse à l'irradiation, le facteur de transcription Dmp53

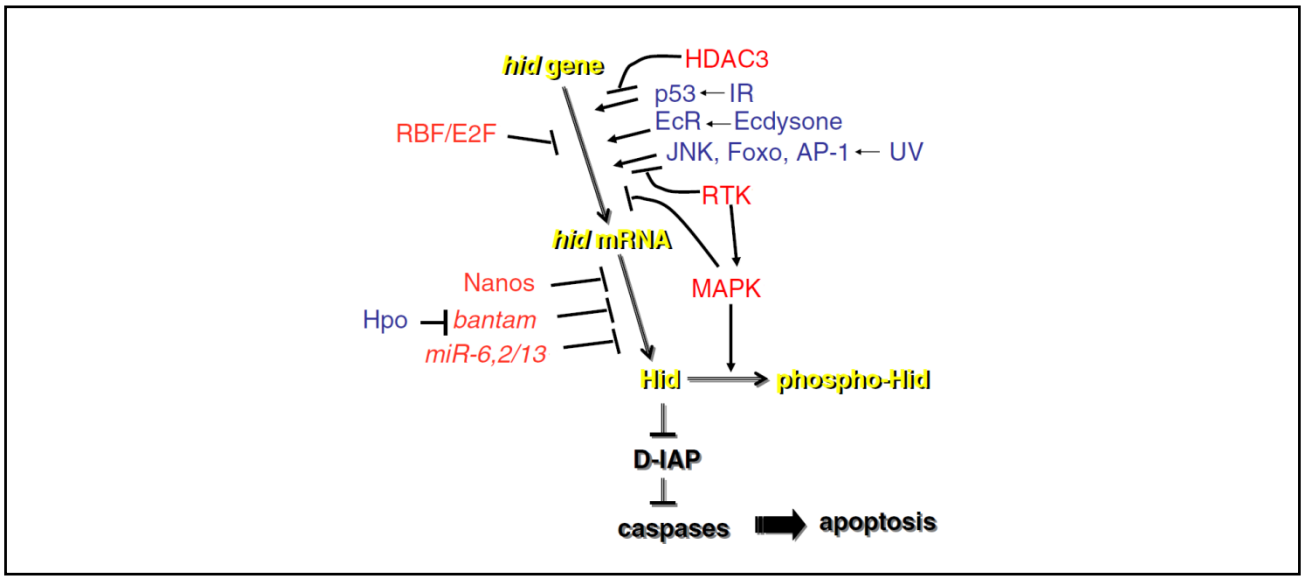


Figure n°11 : Résumé des différents mécanismes de régulation du facteur pro-apoptotique Hid
Hid est capable d'inhiber les IAPs et ainsi induit une apoptose dépendante des caspases. La transcription du gène *hid* est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription (comme p53 ou E2F) et diverses voies de signalisation telle que la voie JNK. Le niveau de Hid est de plus contrôlé par des microARNs. Enfin, la voie MAPK inhibe l'activité de Hid par phosphorylation. Les régulations positives sont indiquées en bleu alors que celles ayant un effet négatif sur Hid sont en rouge.
Issu de Bilak and Su 2009.

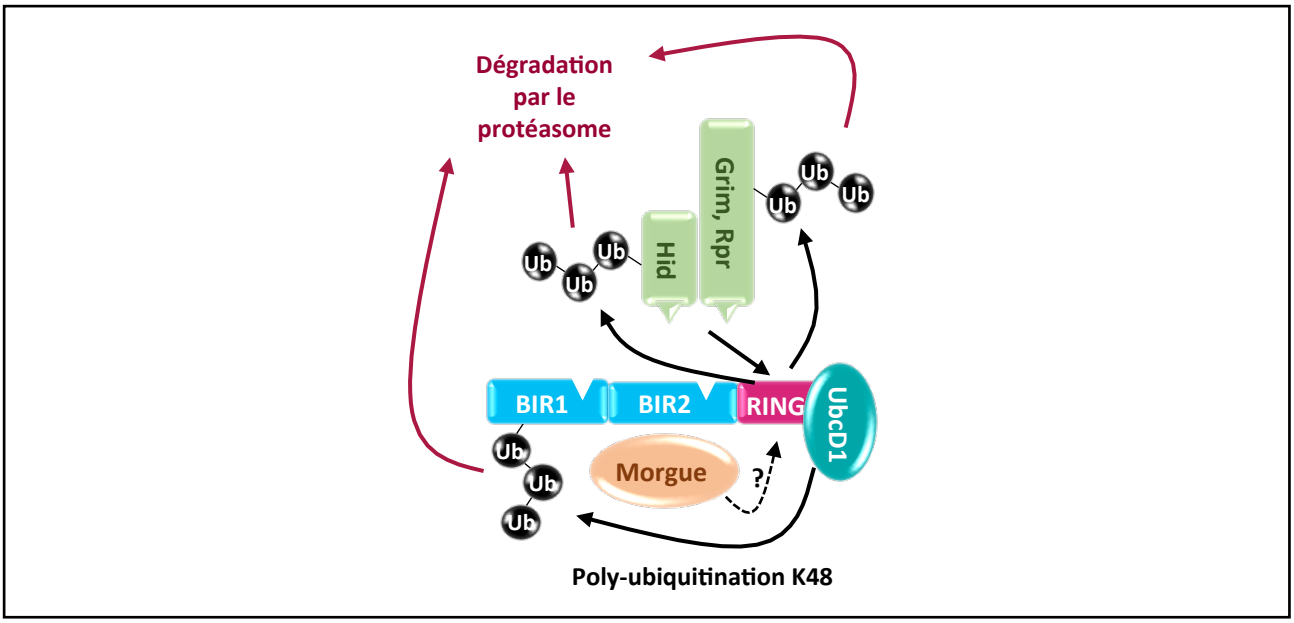


Figure n°12 : Ubiquitination de Diap1 et des RHG
Rpr, Hid et Grim favorisent la poly-ubiquitination de Diap1 et sa dégradation de façon dépendante de UbcD1. Morgue interagit avec Diap1 et pourrait coopérer avec UbcD1 pour induire la dégradation de Diap1. A l'inverse, les protéines Rpr, Hid et Grim sont poly-ubiquitinées par Diap1, elles sont par conséquent adressées au protéasome pour être dégradées.
Adapté de Vaux and Silke, 2005

active l'expression de *rpr*, *skl* et *hid via* l'enhancer IRER (Irradiation-Responsive Enhancer Region) situé en amont de *rpr* (Brodsky *et al.*, 2000). Pour illustrer cette régulation transcriptionnelle des RHG, on peut également citer le fait qu'en réponse à l'hormone stéroïdienne ecdysone, le complexe récepteur à l'ecdysone/ultraspiracle s'associe à la déméthylase dUTX et lie le promoteur de *rpr* pour augmenter sa transcription (Denton *et al.*, 2013b). En outre, les protéines Hox, Deformed et Abdominal B, régulent la transcription de *rpr* au cours du développement (Alonso, 2002; Lohmann *et al.*, 2002). L'expression de *hid* est elle directement régulée par le facteur de transfection dE2F1 ce qui module la sensibilité à l'apoptose induite par dommages à l'ADN (Moon *et al.*, 2005). Au-delà de ces régulations transcriptionnelles, la voie EGFR/Ras/MAPK induit la phosphorylation de la protéine Hid à l'origine de son inactivation (Bergmann *et al.*, 1998). Cette régulation survient notamment dans l'embryon au sein d'un sous-groupe de cellules gliales de la ligne médiane pour assurer leur survie (Bergmann *et al.*, 2002). Le niveau de Hid est donc contrôlé à de multiples niveaux (Bilak and Su, 2009) (**Figure 11**). L'ensemble de ces régulations des différents membres de la famille RHG permet une régulation fine de la mort cellulaire en réponse à une grande variété de signaux et évite qu'une cellule ne soit tuée de façon accidentelle par l'activation inappropriée d'un facteur pro-apoptotique de la famille RHG. Ces protéines RHG sont capables de réguler l'activité des caspases à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, par l'intermédiaire de leur motif IBM N-terminal, les protéines RHG sont capables de lier les domaines BIR de Diap1 (Chai *et al.*, 2003; Christich *et al.*, 2002; Srinivasula *et al.*, 2002; Tenev *et al.*, 2002; Vucic *et al.*, 1997a; Vucic *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2004) et donc par compétition de perturber l'interaction entre Diap1 et les caspases. Rpr et Grim lient avec la même affinité les domaines BIR1 et BIR2 de Diap1 alors que Hid, Skl et Jafrac2 lient préférentiellement le domaine BIR2 (Zachariou *et al.*, 2003). Par conséquent, Rpr et Grim sont capables de lever l'inhibition sur les caspases effectrices et l'ensemble des RHG s'opposent à l'inhibition de Dronc par Diap1.

Toutefois, l'activité pro-apoptotique des protéines RHG ne réside pas uniquement dans cette compétition de liaison. En effet, la liaison des RHG à Diap1 d'une part, stimule l'auto-ubiquitination de Diap1 en changeant la spécificité de substrat du domaine RING de Diap1 et, d'autre part, favorise son ubiquitination par d'autres enzymes E3 ubiquitine ligases (**Figure 12**) (Hays *et al.*, 2002; Holley *et al.*, 2002; Ryoo *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002b; Yoo, 2005; Yoo *et al.*, 2002). Ainsi, Rpr, Hid et Grim réduisent le niveau protéique de Diap1 en favorisant sa dégradation par le protéasome. Les enzymes E2 de conjugaison de l'ubiquitine impliquées dans l'ubiquitination de Diap1 ont été identifiées : Morgue (Modifier of reaper and grim ubiquitously expressed) et UbcD1 (Hays *et al.*, 2002; Ryoo *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002b; Yoo, 2005). La perte de fonction de l'un ou l'autre de ces gènes réduit la mort cellulaire induite par l'expression ectopique des *RHG. ubcD1* code pour une E2 classique alors que *morgue* code pour un variant d'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine dépourvu du résidu cystéine catalytique (Vaux and Silke, 2005). Toutefois Morgue possède un domaine à boite F caractéristique des E3 ligases. UbcD1 et Morgue pourraient donc agir de concert pour ubiquitiner Diap1, mais le mécanisme précis d'ubiquitination reste à déterminer (Zhou et al 2013).

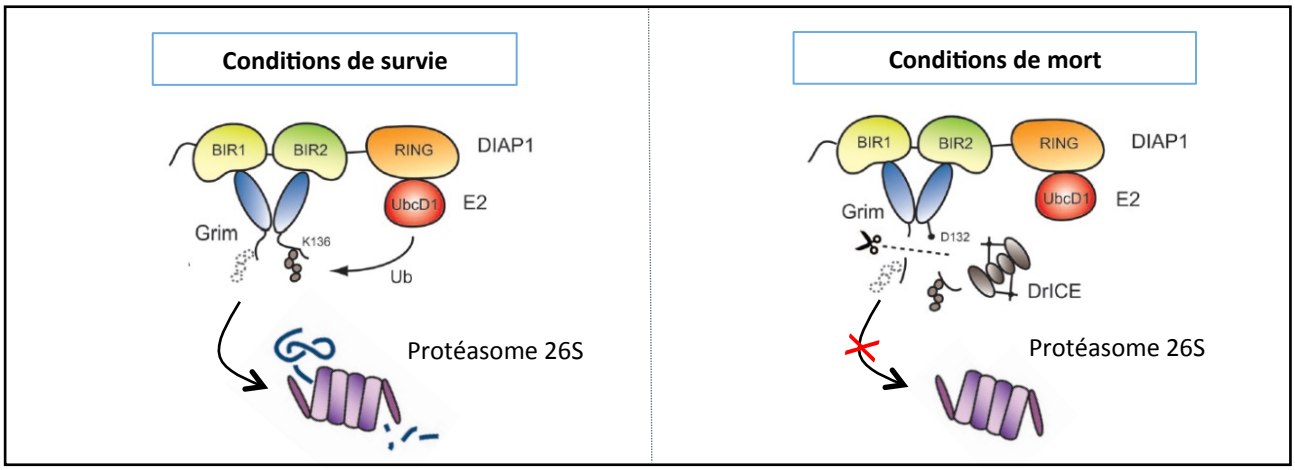


Figure n°13 : Régulation de Grim par Diap1 et par les caspases

Grim interagit avec Diap1 par l'intermédiaire de ses domaines BIR1 et BIR2. Grim liée au domaine BIR2 est ubiquitinée sur la lysine 136 (K136). Dans des conditions de survie, le niveau de Grim dans la cellule est bas. Par conséquent la plupart des protéines Grim sont ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Toutefois, dans des conditions de mort, le niveau de protéine Grim est élevé, la caspase effectrice Drice est activée et peut cliver Grim au niveau de l'Asparagine 132 (D132). La portion C-terminale de Grim comportant les chaines d'ubiquitines liées à la lysine 136 est éliminée. Grim peut s'accumuler et amplifier l'activation des caspases.

Adapté de Yeh and Bratton, 2014

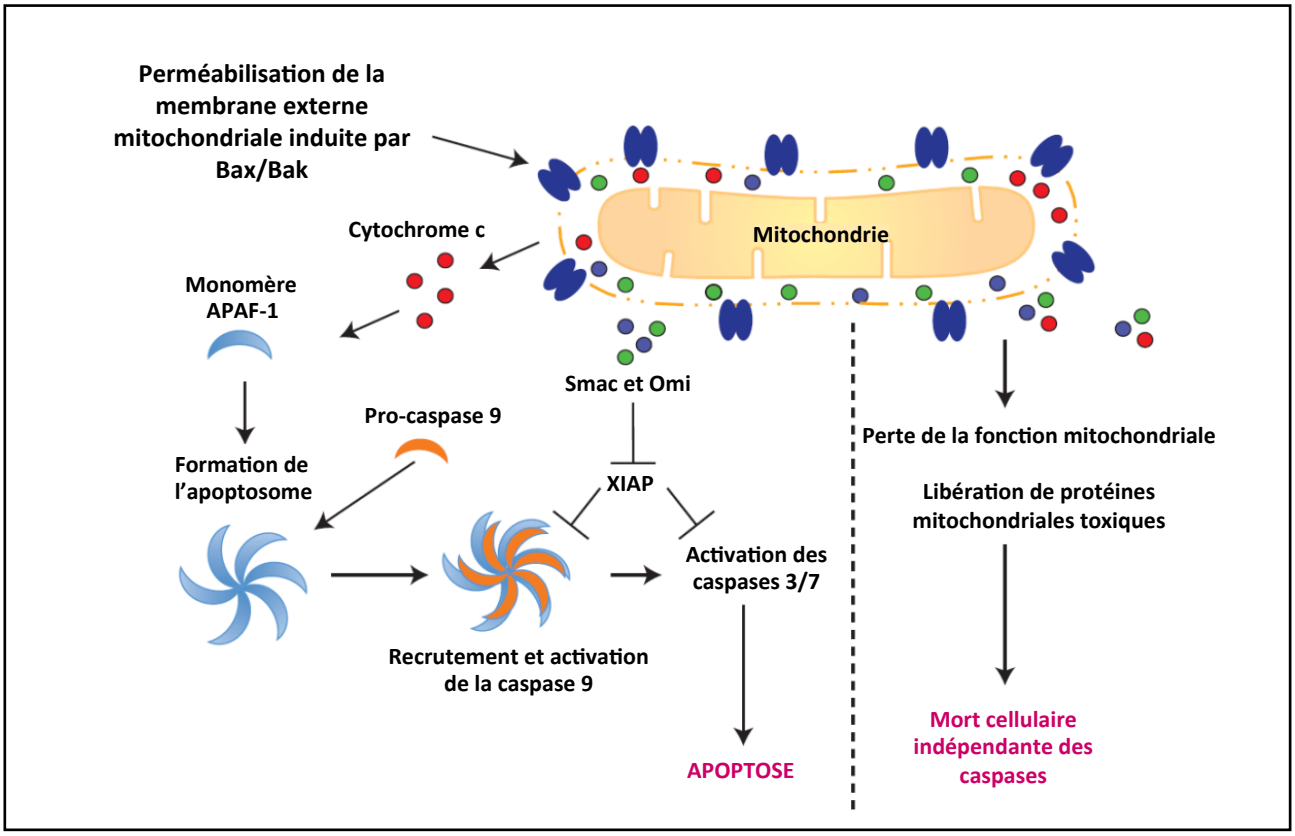


Figure n°14 : Régulation mitochondriale de la mort cellulaire chez les mammifères

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induite par Bax/Bak peut conduire à une apoptose dépendante des caspases (à gauche) ou à une mort cellulaire indépendante des caspases (à droite). Après cette perméabilisation, des protéines solubles sont libérées depuis l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytoplasme. Le cytochrome c lie APAF-1 ce qui induit son oligomérisation et le recrutement de la pro-caspase 9 au sein de l'apoptosome. Cela conduit à l'activation de la caspase 9 qui va ensuite activer, par clivage, les caspases 3 et 7. Smac et Omi facilitent l'activation des caspases en neutralisant XIAP. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permet également une mort cellulaire indépendante des caspases par le biais d'une perte graduelle de la fonction mitochondriale et par la libération de protéines toxiques.

Adapté de Tait and Green, 2013

De façon intéressante, les protéines RHG, qui induisent l'ubiquitination de Diap1, sont elles-mêmes ubiquitinées par Diap1 et adressées au protéasome (**Figure 12**) (Olson *et al.*, 2003b; Yeh and Bratton, 2013). ReaperKR, une forme mutante de Reaper dans laquelle toutes les lysines (résidus accepteurs d'ubiquitine) ont été substituées par des arginines, est un meilleur inducteur de mort que la forme sauvage de Reaper. L'ubiquitination de Rpr par Diap1 restreint donc son activité pro-apoptotique. Par conséquent, Diap1 et les protéines RHG contrôlent mutuellement leur abondance. Le « gagnant » de cette bataille Diap1 *versus* RHG va déterminer le devenir de la cellule. Toutefois, on ne connait pas encore aujourd'hui précisément les éléments qui vont faire pencher la balance en faveur de la mort cellulaire. La présence de l'enzyme E2 atypique Morgue pourrait favoriser la dégradation de Diap1 et donc l'apoptose. Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence que la caspase effectrice Drice, sous sa forme active, clive Grim en C-terminal au niveau de l'Asparagine 132. Ce clivage empêche et/ou élimine l'ubiquitination de Grim en éliminant le seul résidu lysine présent dans la séquence de Grim. Sous sa forme clivée, Grim reste lier à Diap1 et favorise ainsi un niveau élevé d'activation des caspases (**Figure 13**) (Yeh and Bratton, 2013; Yeh and Bratton, 2014). Par conséquent, un faible niveau de caspases actives suffit à déséquilibrer la balance en faveur des RHG et déclenche ainsi la mort cellulaire.

Par ailleurs, Rpr et Grim ont la capacité d'inhiber la traduction générale dans la cellule (Holley *et al.*, 2002; Tait *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2002). Diap1 ayant une courte durée de vie, cette inhibition de la traduction conduit à une rapide déplétion de Diap1 et donc à une activation des caspases. Le mécanisme d'action de Rpr a été précisé : Rpr lie la petite sous-unité ribosomale (40S) et inhibe l'étape d'initiation de la traduction en altérant la reconnaissance du codon d'initiation (Colon-Ramos *et al.*, 2006; Pestova and Hellen, 2006). Les transcrits de *rpr*, *hid*, et *grim* possèdent dans leur région 5'UTR une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Hernandez *et al.*, 2004; Vazquez-Pianzola *et al.*, 2007). Par conséquent, ils peuvent être traduits par un mécanisme alternatif en dépit de l'inhibition exercée par la protéine Rpr sur la petite sous-unité ribosomique.

Ainsi les membres de la famille RHG induisent l'apoptose d'une part en libérant les caspases de Diap1 par compétition de liaison, et d'autre part, en favorisant la déplétion de Diap1 *via* une stimulation de sa dégradation ou une inhibition de sa synthèse *de novo*. L'activité pro-apoptotique de ces protéines réside également dans leur capacité à induire une voie de mort mitochondriale. Cette fonction des RHG sera détaillée dans le paragraphe I.B.4.c.

Chez les mammifères, la protéine Smac/Diablo contient un motif IBM et fonctionne de façon similaire aux protéines RHG. En effet, Smac/Diablo interagit avec de nombreuses protéines de la famille des IAPs et lève ainsi l'effet inhibiteur que les IAPs exercent sur les caspases (**Figure 14**) (Chai *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2000). Smac/Diablo représente donc l'homologue fonctionnel des protéines RHG de drosophile. Ceci illustre bien la conservation de la machinerie de mort cellulaire au cours de l'évolution. Toutefois, le mode d'activation de Smac/Diablo diffère de celui des RHG : Smac/Diablo est une protéine mitochondriale qui suite à un stimulus apoptotique est libérée dans le cytosol où elle va assurer sa fonction pro-apoptotique. Cette donnée laisse

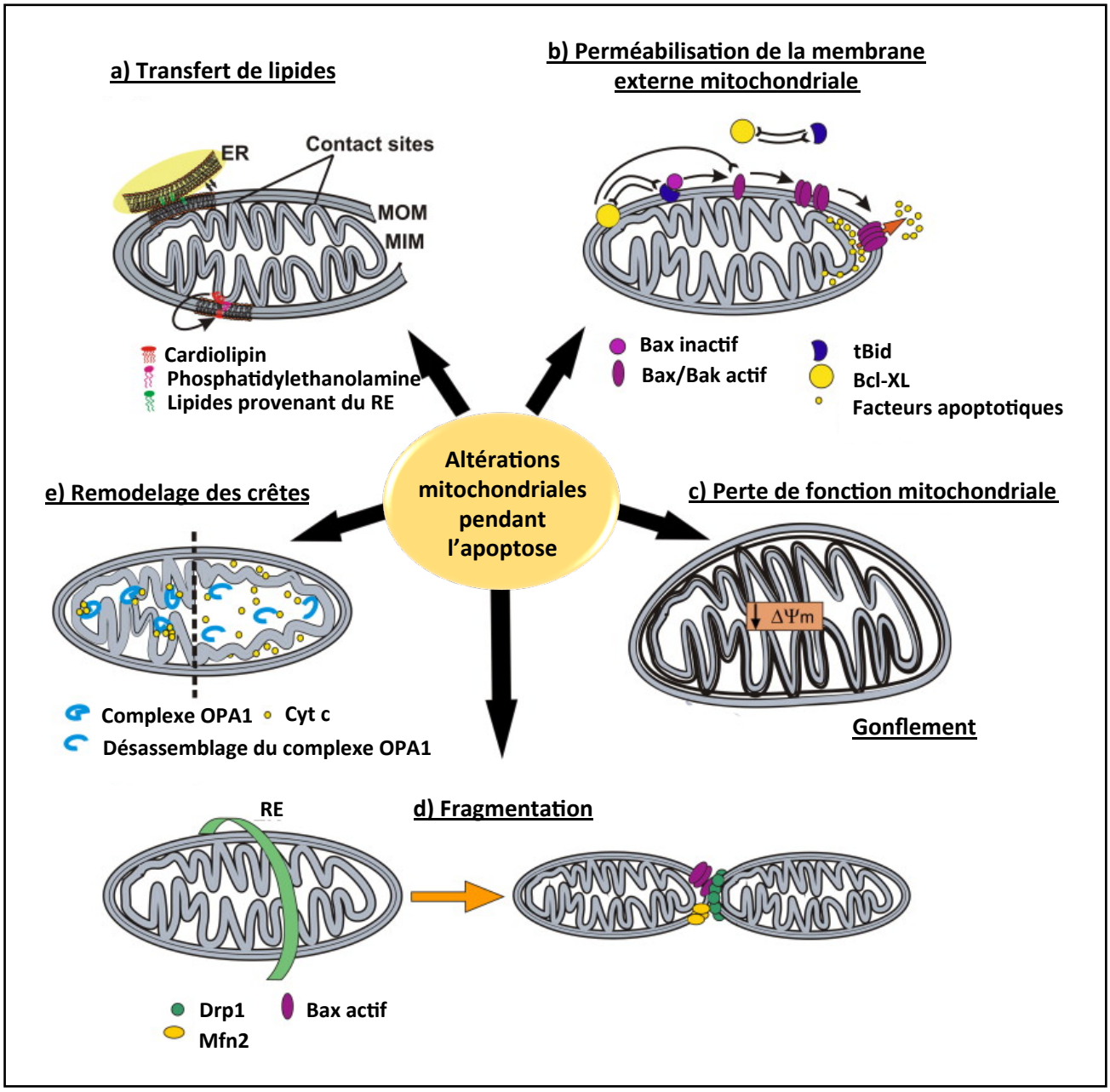


Figure n°15 : Altérations mitochondriales au cours de l'apoptose chez les mammifères

Au cours de l'apoptose, plusieurs altérations mitochondriales peuvent être observées :

(a) Un transfert de lipides entre les membranes mitochondriales ou entre la membrane du réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales

(b) Une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

(c) Une perte de la fonction mitochondriale : du fait de la perméabilisation, la membrane gonfle et le potentiel de la membrane interne chute ($\Delta\Psi m$)

(d) Une fragmentation du réseau mitochondrial

(e) Un remodelage des crêtes mitochondriales

Adapté de Cosentino and García-Sáez, 2014

entrevoir un rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire chez les mammifères. Nous verrons dans la suite de cette introduction que ce rôle n'est pas aussi évident chez la drosophile.

4. Place controversée de la mitochondrie

Dans les cellules de mammifères, la mitochondrie apparait comme un régulateur majeur du processus de mort (Desagher and Martinou, 2000). En effet, beaucoup de protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose chez les mammifères agissent au niveau de la mitochondrie ou sont libérées de la mitochondrie. De plus, les mitochondries subissent de nombreuses altérations pendant l'apoptose (**Figure 15**), il y a notamment des changements ultra-structuraux importants (Cosentino and Garcia-Saez, 2014). Contrairement à ce rôle central de la mitochondrie dans l'apoptose, reconnu depuis longtemps chez les mammifères, une place n'a été accordée que récemment à la mitochondrie dans les processus apoptotiques chez la drosophile. Toutefois des controverses continuent d'exister concernant certains acteurs de cette voie de mort mitochondriale comme nous le verrons dans la suite de cette introduction.

a) Rôle du cytochrome c dans l'activation des caspases chez la drosophile : mythe ou réalité ?

Dans les cellules de mammifères, en réponse à un stimulus apoptotique, le cytochrome c initialement localisé dans l'espace inter-membranaire mitochondrial est libéré dans le cytosol où il va lier les motifs WD40 de la protéine APAF1. En présence d'ATP, cette interaction conduit à l'oligomérisation d'APAF1 et donc au recrutement et à l'activation de la pro-caspase 9 au sein de l'apoptosome (**Figure 14**). La libération du cytochrome c est un phénomène considéré comme essentiel dans la majorité des processus de mort cellulaire chez les vertébrés.

L'éventuelle libération du cytochrome c au cours de l'apoptose chez la drosophile est un sujet de controverse. Chez la drosophile, deux gènes codent pour le cytochrome c : *cyt-c-d* et *cyt-c-p.* Les études originelles, menées par Varkey *et al.*, indiquent que le cytochrome c reste localisé au niveau de la mitochondrie pendant l'apoptose. Toutefois, un épitope du cytochrome c, précédemment inaccessible pour l'anticorps utilisé dans cette expérience, est exposé au cours du processus de mort cellulaire (Varkey *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que le cytochrome c pourrait être libéré de l'espace inter-membranaire mais qu'il resterait associé à la membrane externe mitochondriale. A l'inverse, une étude plus récente met en évidence une diffusion rapide du cytochrome c dans le cytosol des cellules en train de mourir (Abdelwahid *et al.*, 2007). Des expériences de fractionnements subcellulaires fournissent également des résultats contradictoires quant à la libération ou non du cytochrome c dans le cytosol des cellules apoptotiques (Abdelwahid *et al.*, 2007; Challa *et al.*, 2007; Dorstyn *et al.*, 2002; Kanuka *et al.*, 1999b; Varkey *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2002). Des différences techniques au

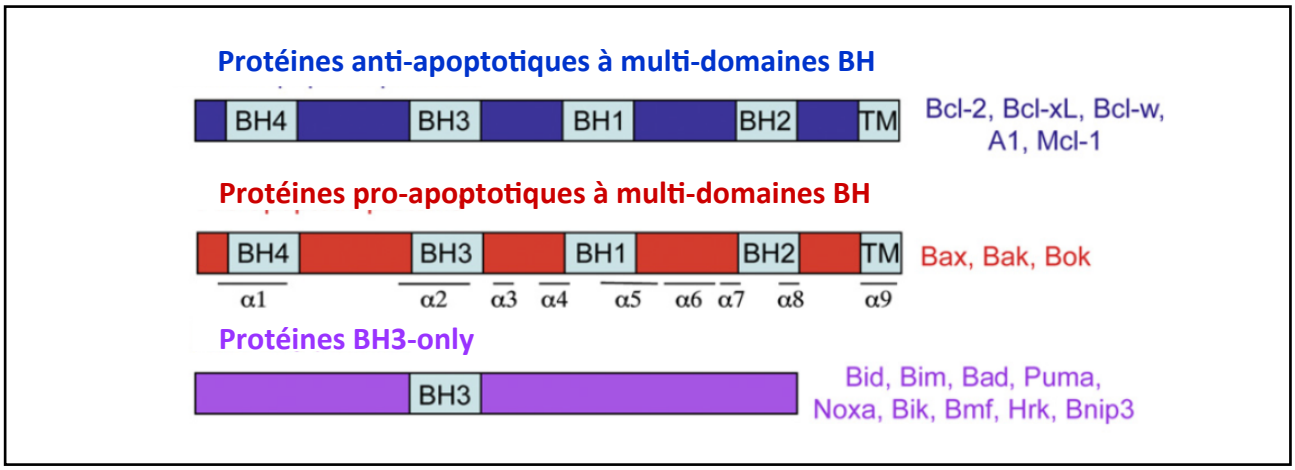


Figure n°16 : Structure des protéines de la famille Bcl-2 chez les mammifères
La famille Bcl-2 est divisée en deux sous groupes : les protéines à multi-domaines qui peuvent être pro- ou anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques de type BH3-only.
Issu de Martinou and Youle, 2011

niveau des protocoles d'immunomarquages ou de fractionnements subcellulaires pourraient expliquer la divergence d'observations. Quoiqu'il en soit, ces données soulignent le fait que la libération du cytochrome c ne peut pas être utilisée comme indicateur de l'initiation de l'apoptose chez la drosophile comme cela peut l'être dans les cellules de mammifères.

Comme APAF1, Dark possède des motifs WD40 par l'intermédiaire desquels il peut lier le cytochrome c (Kanuka *et al.*, 1999b; Rodriguez *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999). Par ailleurs, la formation d'un complexe de haut poids moléculaire, contenant les caspases Dronc et Drice, est observée dans des extraits cellulaires en présence de cytochrome c (Dorstyn *et al.*, 2002). Un apoptosome pourrait donc se former à proximité de la mitochondrie en dépit d'une absence de diffusion du cytochrome c dans le cytosol. Toutefois des études *in vitro* indiquent que l'assemblage de l'apoptosome de drosophile (constitué de 8 molécules de Dark) ne requière pas la présence de cytochrome c (D'Brot *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2011). Par ailleurs, des données structurales montrent que le cytochrome c ne peut pas former de complexe stable avec l'apoptosome Dark (Dorstyn and Kumar, 2006). Ces études *in vitro* pourraient ne pas refléter le comportement des protéines *in vivo* et doivent donc être interprétées avec précaution. Toutefois, elles suggèrent fortement que le cytochrome c ne jouerait pas un rôle déterminant dans l'activation de l'adaptateur Dark. Qu'en est-il alors de son rôle dans l'activation des caspases ?

Plusieurs études, utilisant des cellules en culture, indiquent que le cytochrome c n'est pas requis pour l'apoptose chez la drosophile (Abdelwahid *et al.*, 2007; Dorstyn *et al.*, 2004; Kiessling and Green, 2006; Zimmermann *et al.*, 2002). Toutefois, une activation modérée des caspases est observée après ajout de cytochrome c à des extraits cellulaires de drosophile (Kanuka *et al.*, 1999b) et l'addition des protéines recombinantes Cyt-c-d et Cyt-c-p de drosophile conduit à une forte activation des caspases dans des extraits de cellules de mammifères. Des données génétiques indiquent un rôle de *cyt-c-d* pour l'activation des caspases dans certains contextes développementaux alors que *cyt-c-p* est lui requis pour la respiration cellulaire. En effet, la perte de fonction de *cyt-c-d* induit une perte de l'individualisation des spermatides, processus dépendante d'une activation non-apoptotique des caspases (Arama *et al.*, 2003; Arama *et al.*, 2006; Huh *et al.*, 2004b). La mort des cellules inter-ommatidiales dans l'œil en développement est également supprimée par la perte de fonction de *cyt-c-d* (Mendes *et al.*, 2006). Il est important de noter que *cyt-c-d* n'est pas requis pour la respiration cellulaire, pour la différenciation cellulaire au sein de la rétine et pour la progression du développement pupal (Mendes *et al.*, 2006). Les défauts de mort cellulaire observés suite à la perte de fonction de *cyt-c-d* seraient donc dus à un rôle physiologique direct du cytochrome c dans l'activation des caspases. L'implication du cytochrome c dans l'activation des caspases chez la drosophile et dans l'induction d'apoptose serait donc limitée et reste encore aujourd'hui débattue.

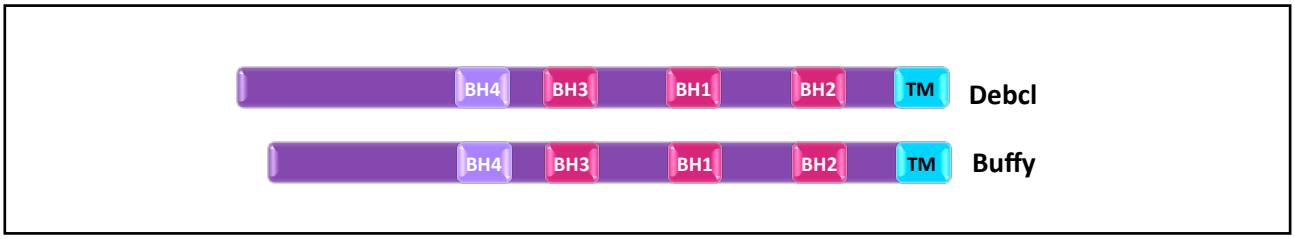


Figure n°17 : Structure des protéines de la famille Bcl-2 chez la drosophile
Représentation schématique de Debcl et Buffy. Ces deux protéines possèdent des domaines BH1, BH2 et BH3 (en rose). Une partie de la région N-terminale de ces protéines ressemble à un domaine BH4 mais n'est pas définie comme tel au sens stricte. On parle de faible domaine BH4 (en violet). Debcl et Buffy possède un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal (en bleu).
Adapté de Igaki and Miura, 2004

Fonction pro-apoptotique de *debcl*		
***debcl* induit de la mort cellulaire quand il est exprimé ectopiquement dans des cellules en culture**	**dans des cellules de drosophile**	Zimmerman *et al.*, 2002
		Colussi *et al.*, 2000
		Igaki *et al.*, 2000
		Dorstyn *et al.*, 2002
		Doumanis *et al.*, 2007
	dans les cellules CHO (chinese hamster ovary)	Brachmann *et al.*, 2000
	dans des cellules de mammifères	Colussi *et al.*, 2000
		Zhang *et al.*, 2000
	dans des cellules d'insectes (hors drosophile)	Zhang *et al.*, 2000
***debcl* induit de la mort cellulaire quand il est exprimé ectopiquement dans différents tissus pendant le développement de la drosophile**	**dans des embryons**	Brachmann *et al.*, 2000
	dans l'œil en développement	Brachmann *et al.*, 2000
		Igaki *et al.*, 2000
		Kanda *et al.*, 2011
		Park *et al.*, 2010
		Copeland *et al.*, 2007
		Quinn *et al.*, 2003
	dans l'aile en développement	Quinn *et al.*, 2003
		Grusche *et al.*, 2011
	dans le cerveau larvaire	Brachmann *et al.*, 2000
	dans les glandes salivaires	Brachmann *et al.*, 2000
***debcl* est requis pour la mort développementale**	**au stade embryonnaire**	Brachmann *et al.*, 2000
		Galindo *et al.*, 2009
		Senoo-Matsuda *et al.*, 2005
		Colussi *et al.*, 2000
	au cours de l'ovogenèse	Tanner *et al.*, 2011
	au cours de la spermatogenèse	Yacobi-Sharon *et al.*, 2013
***debcl* est requis pour la mort induite**	**La surexpression de *debcl* aggrave la mort cellulaire induite par irradiation dans l'œil en développement**	Brachmann *et al.*, 2000

Fonction anti-apoptotique de *debcl*	
L'expression de *debcl* protège de la mort induite par CED-3 en cellules de drosophile	Brachmann *et al.*, 2000
L'expression de *debcl* protège de la mort induite par une privation de sérum dans des cellules de drosophile	Brachmann *et al.*, 2000
L'expression d'un ARNi dirigé contre *debcl* aggrave la mort induite par un inhibiteur de la chaine respiratoire en cellules de drosophile	Senoo-Matsuda *et al.*, 2005
l'expression de *debcl* protège de la neurodégénération induite par la présence de protéines à polyglutamines	Senoo-Matsuda *et al.*, 2005

Figure n°18 : Debcl assure à la fois des fonctions pro- et anti-apoptotiques
Recensement des différents exemples des fonctions pro-apoptotiques de *debcl* (en bleu) et anti-apoptotiques de *debcl* (en orange)

b) La famille Bcl-2 chez la drosophile (Debcl et Buffy)

Dans les cellules de mammifères, en réponse à différents stress, la membrane externe mitochondriale est perméabilisée, ce qui permet la libération dans le cytosol de plusieurs facteurs pro-apoptotiques, précédemment contenus dans l'espace inter-membranaire mitochondriale comme le cytochrome c (**Figure 14**). Cette perméabilisation de la membrane externe mitochondriale est étroitement contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Les protéines appartenant à cette famille possèdent de 1 à 4 domaines d'homologie à Bcl-2 (domaine BH). Structurellement, on distingue deux sous-groupes (**Figure 16**) : les protéines à multi-domaines (trois à quatre domaines BH) et les protéines BH3-only qui, comme leurs noms l'indiquent, possèdent uniquement le domaine BH3. Les protéines BH3-only sont pro-apoptotiques alors que le sous-groupe des protéines à multi-domaines contient à la fois des facteurs anti-apoptotiques (comme Bcl-2) et des facteurs pro-apoptotiques (comme Bax ou Bak). Les membres de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés de la mort cellulaire chez les mammifères. Etant donné le rôle mineur du cytochrome c dans l'apoptose chez la drosophile, on peut s'interroger sur la place des protéines de la famille Bcl-2 au sein des processus de mort cellulaire chez cet organisme modèle.

Deux membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés chez la drosophile : Buffy et Debcl (Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). Ces deux protéines possèdent 3 domaines BH (BH1 à 3) et un domaine hydrophobe en C-terminal permettant leur ancrage dans les membranes cellulaires (**Figure 17**). Ainsi, Debcl a une localisation mitochondriale alors que Buffy est retrouvée au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (Doumanis *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). Dans la littérature, il existe des données divergentes quant à l'existence d'un domaine BH4 en N-terminal en amont des trois autres domaines BH, on parle donc de « faible » domaine BH4 (Igaki and Miura, 2004).

debcl et *buffy* ont un profil d'expression comparable (Quinn *et al.*, 2003) : ils sont exprimés de façon dynamique à tous les stades de développement (Brachmann *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003). Peu de données existent concernant la régulation de leur transcription. Toutefois, une étude a mis en évidence que le facteur de transcription NF-YB (Nuclear factor Y-box B) lie la région promotrice de *debcl* pour réguler son expression, au moins dans des cellules en culture (Ly *et al.*, 2013). De façon intéressante, le profil d'expression de *buffy* et *debcl* est corrélé au profil de mort cellulaire dans l'embryon en développement (Colussi *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003) ce qui suggère un rôle de ces gènes dans l'apoptose chez la drosophile.

L'expression ectopique de *debcl* induit de la mort cellulaire dans différents types de cellules en culture et *in vivo* dans différents tissus au cours du développement de la drosophile (**Figure 18**) (Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Copeland *et al.*, 2007; Dorstyn *et al.*, 2002; Doumanis *et al.*, 2007; Grusche *et al.*, 2011; Igaki *et al.*, 2000; Kanda *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010; Quinn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2002). A l'inverse, la surexpression de *buffy* sauve de la mort induite par l'expression ectopique de *rpr, hid* ou *grim* dans l'œil (Quinn *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que Debcl est une protéine pro-apoptotique alors que Buffy

<table>
<tr><th colspan="3">Fonction pro-apoptotique de buffy</th></tr>
<tr><td rowspan="5">buffy est requis pour l'apoptose</td><td>induite par un inhibiteur de la chaine respiratoire en cellules de drosophile</td><td>Senoo-Matsuda et al., 2005</td></tr>
<tr><td>des cellules germinales au cours de la spermatogenèse</td><td>Yacobi-Sharon et al., 2013</td></tr>
<tr><td>des cellules germinales au cours de l'ovogenèse</td><td>Tanner et al., 2011</td></tr>
<tr><td>des cellules gliales dans le lignage des microchaetes</td><td rowspan="2">Wu et al., 2010</td></tr>
<tr><td>induite par l'expression de grim dans l'œil en développement</td></tr>
<tr><td colspan="2">l'expression de buffy favorise la neurodégénération induite par la présence de protéines à polyglutamines</td><td>Senoo-Matsuda et al., 2005</td></tr>
<tr><td colspan="2">L'expression de buffy dans des cellules de drosophile induit de l'apoptose</td><td>Doumanis et al., 2007</td></tr>
<tr><th colspan="3">Fonction anti-apoptotique de buffy</th></tr>
<tr><td rowspan="6">L'expression de buffy inhibe la mort cellulaire</td><td>induite par irradiation dans des embryons et des disques imaginaux d'ailes</td><td rowspan="4">Quinn et al., 2003</td></tr>
<tr><td>Induite par la perte de fonction de diap1</td></tr>
<tr><td>au cours du développement embryonnaire</td></tr>
<tr><td>Induite par l'expression de rpr et hid</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Induite par l'expression de grim</td><td>Quinn et al., 2003</td></tr>
<tr><td>Sevrioukov et al., 2007</td></tr>
<tr><td colspan="2">La perte de fonction de buffy aggrave l'apoptose induite par irradiation dans des embryons</td><td>Sevrioukov et al., 2007</td></tr>
<tr><td colspan="2">buffy est requis pour la survie des cellules embryonnaires</td><td>Quinn et al., 2003</td></tr>
</table>

<u>Figure n°19</u> : Buffy assure à la fois des fonctions pro- et anti-apoptotiques
Recensement des différents exemples des fonctions pro-apoptotiques de *buffy* (en jaune) et anti-apoptotiques de *buffy* (en vert)

assure des fonctions anti-apoptotiques. En réalité, Debcl et Buffy ont tous les deux des fonctions pro- et anti-apoptotiques (**Figures 18 et 19**). En effet, il a par exemple été montré, que l'expression de *debcl* protège les neurones de la toxicité des protéines à polyglutamines, alors que l'expression de *buffy* favorise cette dégénérescence neuronale (Senoo-Matsuda *et al.*, 2005). En outre, l'expression de *buffy* induit de l'apoptose dans des cellules de drosophile en culture (Doumanis *et al.*, 2007) alors que *debcl* protège ces cellules de la mort induite par une privation de sérum (Brachmann *et al.*, 2000). Ce rôle double des protéines de la famille Bcl-2 n'est pas restreint au modèle de la drosophile (Cheng *et al.*, 2006). En effet, chez le nématode, CED-9 assure des fonctions pro- ou anti-apoptotiques. De plus, Bax et Bak, protéines pro-apoptotiques de mammifères, peuvent, dans certains cas, favoriser la survie. Quelle que soit l'espèce considérée, la capacité des protéines de la famille Bcl-2 à favoriser ou au contraire à inhiber l'apoptose dépend donc probablement du contexte cellulaire.

Les individus homozygotes mutants pour *debcl* ou *buffy* sont viables, fertiles et se développent normalement sans défaut apparent du programme de mort cellulaire développementale (Sevrioukov *et al.*, 2007). Debcl et Buffy ne sont donc pas essentiels pour la plupart des morts développementales. Il a toutefois été mis en évidence que leur fonction est requise de façon spécifique dans certains tissus : *debcl* et *buffy* sont notamment requis pour la mort des cellules germinales au cours de l'ovogenèse et de la spermatogenèse (Tanner *et al.*, 2011; Tanner and McCall, 2011; Yacobi-Sharon *et al.*, 2013). Par ailleurs, *buffy* est requis pour l'apoptose des cellules gliales dans le lignage des microchaetes (Wu *et al.*, 2010). Debcl et Buffy ont donc un rôle restreint à certains tissus et à un certains stades dans le contrôle de la mort développementale.

Le rôle de ces deux protéines dans la mort induite par un stress tel que les dommages à l'ADN n'est pas clair. Une étude indique que Debcl et Buffy modulent la réponse apoptotique embryonnaire à l'irradiation (Sevrioukov *et al.*, 2007). En effet, les embryons mutants pour *debcl* présentent moins de cellules apoptotiques en réponse à l'irradiation que les embryons témoins alors qu'on observe une légère augmentation des cellules en apoptose dans les embryons mutants pour *buffy*. A l'inverse, une autre étude indique que la perte de fonction de *debcl* ne modifie pas la réponse apoptotique à l'irradiation dans des disques imaginaux d'aile bien qu'une augmentation des défauts morphologiques soit observée chez l'adulte (Galindo *et al.*, 2009).

En outre, Buffy et Debcl régulent l'autophagie en réponse à une privation d'acides aminés dans des cellules en culture (Hou *et al.*, 2008) et *buffy* est requis pour la réponse à un stress nutritif au stade larvaire (Monserrate *et al.*, 2012).

Debcl interagit physiquement avec Buffy (Quinn *et al.*, 2003). Il est donc probable que ces deux protéines agissent de manière analogue à leurs homologues de mammifères en se liant et en se neutralisant mutuellement. Des données génétiques sont en accord avec cette idée. La surexpression de *buffy* inhibe la mort induite par *debcl* dans l'aile et dans l'œil (Quinn *et al.*, 2003). De même, la surexpression de *buffy* s'oppose au phénotype de régression dendritique induit par *debcl* (Tsubouchi *et al.*, 2009). De plus, des expériences de co-expression de *buffy* et *debcl* indiquent de Buffy a besoin d'inactiver Debcl pour induire la dégénérescence des neurones en réponse aux protéines à polyglutamines (Senoo-Matsuda *et al.*, 2005). Enfin, l'utilisation d'embryon double

Figure n°20 : Lien entre structure des RHG et localisation mitochondriale
En plus de leur motif IBM N-terminal (en gris), certains membres de la famille RHG (Rpr, Grim et Sickle) possède un domaine hélical appelé motif GH3 (en vert). Ce motif est requis pour leur localisation mitochondriale. Hid possède une séquence d'adressage mitochondriale (riche en acides aminés hydrophobes) en C-terminal (en violet).
Adapté de Claveria and Torres 2003

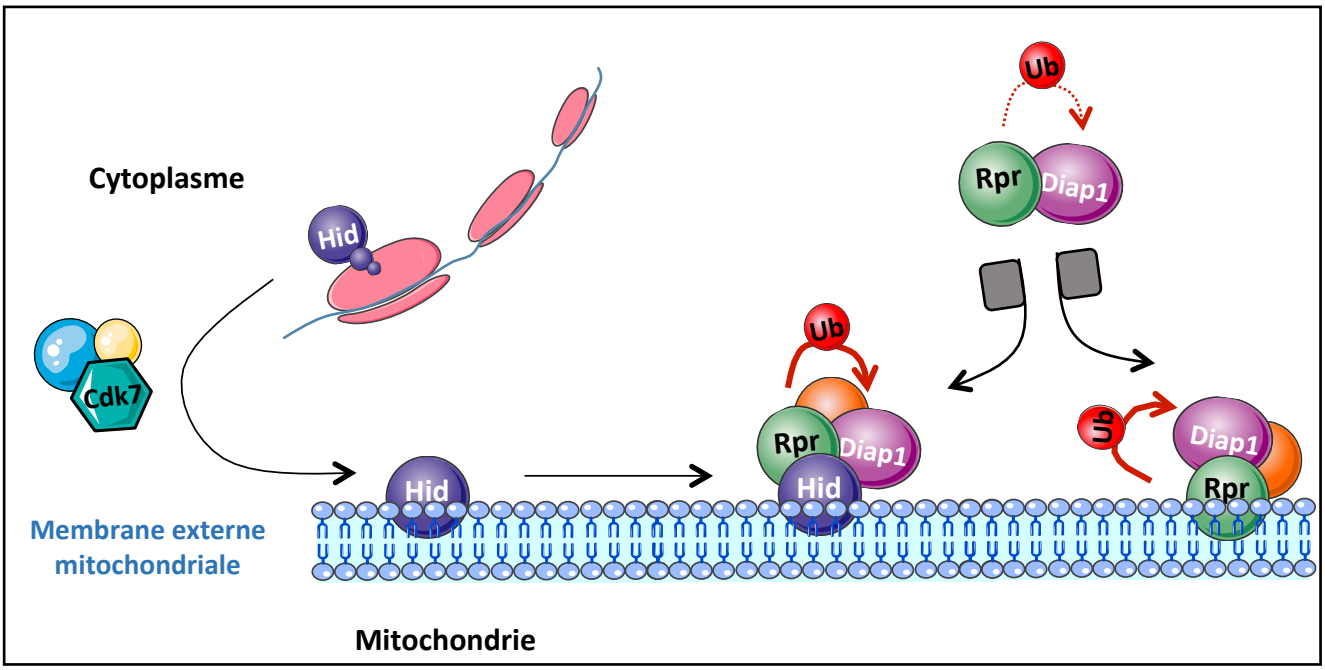


Figure n°21 : Modèles de la localisation mitochondriale de Rpr
Hid possède une séquence en C-terminal permettant son adressage à la mitochondrie de façon dépendante de Cdk7. Il existe deux modèles concernant la localisation mitochondriale de Rpr. Le premier modèle (à gauche) indique que Rpr est recruté à la mitochondrie en interagissant avec Hid qui est lui-même mitochondrial. Le second modèle (à droite) indique que Rpr interagit directement avec les lipides membranaires mitochondriaux. Cette interaction permettrait l'intégration de Rpr dans la membrane externe mitochondriale. Quel que soit le modèle considéré, la localisation mitochondriale de Rpr augmente sa capacité à stimuler l'ubiquitination (Ub) de Diap1. Cette ubiquitination pourrait impliquer une protéine additionnelle (en orange).

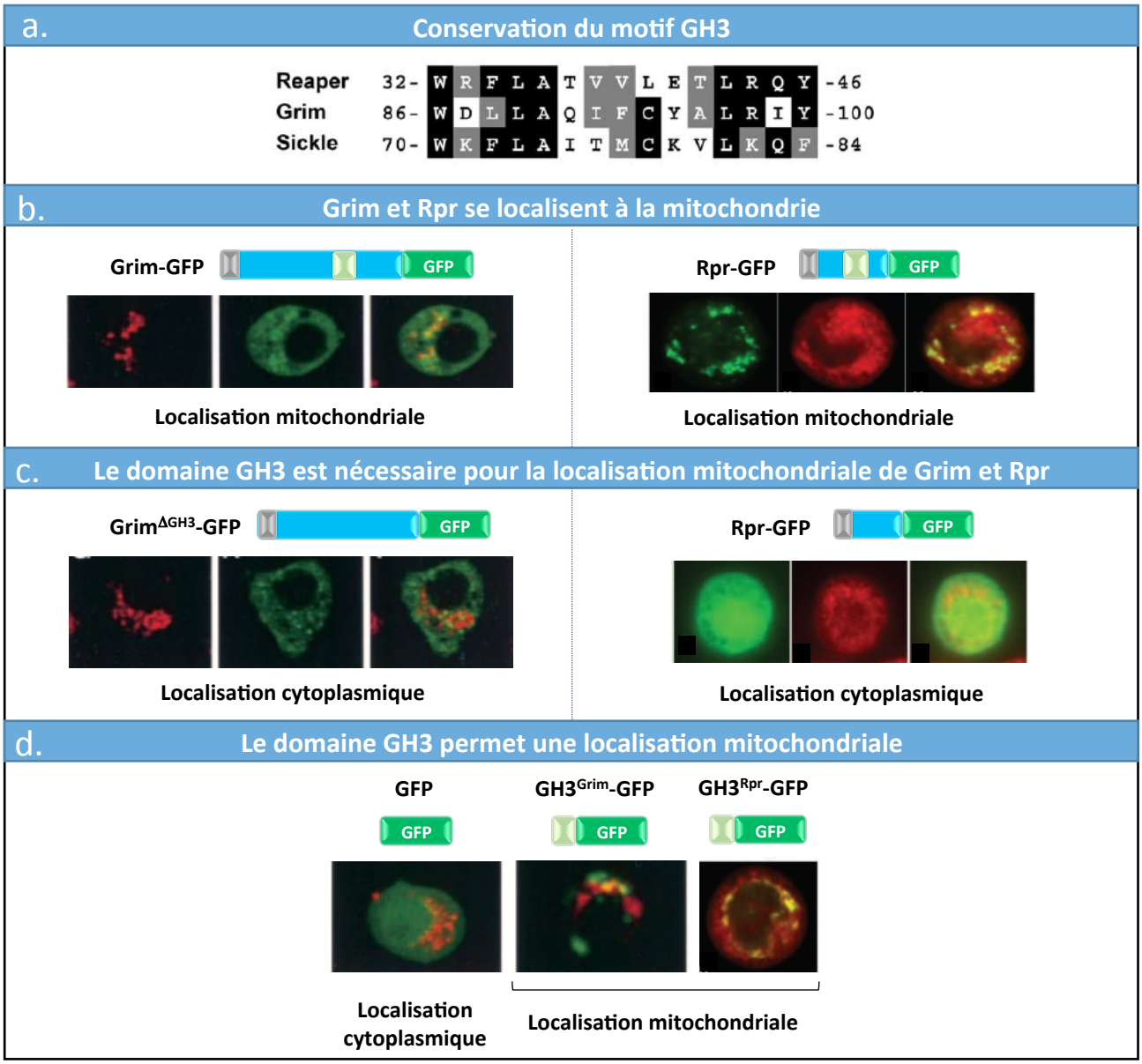
mutant pour *buffy* et *debcl* a permis de mettre en évidence une action antagoniste de ces deux gènes dans la mort induite par irradiation (Sevrioukov *et al.*, 2007). Toutefois, Buffy et Debcl n'assurent pas toujours des rôles opposés. En effet, des données indiquent que *buffy* et *debcl* peuvent, dans de rares cas, coopérer pour induire la mort cellulaire (Tanner *et al.*, 2011; Yacobi-Sharon *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, on ne connait pas précisément les mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par Debcl et les quelques informations présentes dans la littérature sont souvent contradictoires. En effet, selon l'étude considérée, la mort induite par l'expression ectopique de *debcl* est totalement, partiellement ou n'est pas inhibée par un inhibiteur de caspases (Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2002). Ces données laissent penser que Debcl induirait la mort selon des voies dépendante et indépendante des caspases. De même, l'implication de Dark dans la mort induite par Debcl est un sujet débattu : si deux études s'accordent sur le fait qu'il est requis pour l'apoptose induite par Debcl (Colussi *et al.*, 2000; Galindo *et al.*, 2009), une troisième étude rejette son implication (Zimmermann *et al.*, 2002). De la même manière, le domaine BH3 de Debcl peut être décrit comme indispensable ou non pour la capacité d'inducteur de mort de Debcl (Colussi *et al.*, 2000; Doumanis *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2000). Bien que cela n'ait pas été systématiquement testé, il semblerait que les RHG ne soient pas requis pour la mort induite par Debcl et inversement Debcl ne serait pas impliqué dans l'activité pro-apoptotique des RHG.

En résumé, des controverses persistent concernant la fonction précise des protéines de la famille Bcl-2 dans la mort cellulaire chez la drosophile. Des études supplémentaires *in vivo* sont donc requises pour mieux caractériser l'importance de ces protéines dans l'apoptose chez cet organisme modèle. Il est toutefois possible que le rôle de Debcl et Buffy soit restreint et que la voie de mort mitochondriale soit contrôlée par d'autres protéines comme Rpr, Hid ou Grim, chez la drosophile.

c) Rôle des RHG dans une voie de mort mitochondriale chez la drosophile

En dépit de la forte conservation du domaine RHG/IBM N-terminal et du rôle de ce domaine dans la fonction pro-apoptotique des membres de la famille RHG, de façon intrigante, plusieurs études indiquent que les protéines Rpr et Grim dépourvues de ce domaine conservent la capacité d'induire la mort cellulaire (Chen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1996a; Claveria *et al.*, 1998; Claveria *et al.*, 2002; Claveria *et al.*, 2004; McCarthy and Dixit, 1998; Tait *et al.*, 2004; Thress *et al.*, 1999; Wing *et al.*, 2001; Wing *et al.*, 1998). Ces données suggèrent qu'au moins une autre région de Rpr et Grim assure un rôle pro-apoptotique. En effet, un second domaine conservé entre Rpr, Grim et Sickle a été identifié (**Figure 20**) (Chen *et al.*, 2004; Claveria *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2003a; Wing *et al.*, 2001; Zhou, 2005). Ce domaine interne correspondant à une hélice α amphiphatique a été nommé domaine GH3 (Grim Helix 3) (Claveria *et al.*, 2002) ou domaine R3 (RHG domain 3) (Chen *et al.*, 2004) ou encore bloc-Trp (Tryptophane) (Wing *et al.*, 2001). Ce domaine est requis pour la fonction pro-apoptotique de Rpr et



<u>Figure n°22</u> : Le motif GH3, conservé entre Rpr, Grim et Sickle, est nécessaire et suffisant pour assurer une localisation mitochondriale.

(a) Alignement du domaine conservé GH3 de Rpr, Grim et Sickle. Les résidus identiques et similaires sont respectivement indiqués dans des carrés noirs et gris.
Issu de Claveria and Torres, 2003

(b-d) Les différentes protéines étudiées sont détectées en vert et on visualise en rouge un marqueur mitochondrial. Grim-GFP et Rpr-GFP se localisent à la mitochondrie dans des cellules de drosophile (b). Les protéines Grim$^{\Delta GH3}$-GFP et Rpr$^{\Delta GH3}$-GFP sont cytoplasmiques (c). Le domaine GH3 est donc nécessaire à la localisation mitochondriale de Grim et Rpr. Contrairement à la GFP qui est cytoplasmique, GH3^{Grim}-GFP et GH3^{Rpr}-GFP ont une localisation mitochondriale (d). Le domaine GH3 est donc suffisant pour assurer une localisation mitochondriale.
Adapté de Claveria *et al.*, 2002 et Olson *et al.*, 2003a

Grim et il est suffisant *in vitro* pour induire de la mort cellulaire (Chen *et al.*, 2004; Claveria *et al.*, 2002; Claveria *et al.*, 2004; Freel *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2003a; Wing *et al.*, 1998).

De façon intéressante, Rpr et Grim se localisent à la mitochondrie et cette localisation est dépendante du domaine GH3 (**Figure 21 et 22**) (Claveria *et al.*, 1998; Claveria *et al.*, 2002; Claveria *et al.*, 2004; Freel *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2003a; Sandu *et al.*, 2010; Thomenius *et al.*, 2011). Ce domaine ne correspond pourtant pas, en tant que tel, à une séquence d'adressage mitochondriale. Freel *et al.* ont montré que le domaine GH3 permet à Rpr de s'enchâsser dans la membrane externe mitochondriale *via* une interaction de ce domaine avec les lipides membranaires (**Figure 21**) (Freel *et al.*, 2008). Sandu *et al.* envisagent un autre modèle pour expliquer la localisation mitochondriale de Rpr. Comme Rpr et Grim, Hid est retrouvé localisé au niveau de la mitochondrie (Haining *et al.*, 1999; Sandu *et al.*, 2010). Mais contrairement aux deux autres, Hid possède une séquence d'insertion dans la membrane mitochondriale en C-terminal (**Figure 20**). La présence de cette séquence et la protéine Cdk7 (Cyclin-dependent kinase 7) sont requises pour la localisation mitochondriale de Hid (**Figure 21**) (Haining *et al.*, 1999; Morishita *et al.*, 2013; Sandu *et al.*, 2010). Sandu *et al.* ont mis en évidence une interaction physique entre Hid et Rpr par le biais de la région hélicale centrale de Rpr qui comprend le domaine GH3. Cette interaction est requise pour la localisation mitochondriale de Rpr (Sandu *et al.*, 2010). Rpr serait donc recruté à la mitochondrie par l'intermédiaire de son domaine GH3 en interagissant avec Hid qui lui possède une séquence d'insertion dans les membranes mitochondriales (**Figure 21**).

Plusieurs études indiquent que la localisation mitochondriale des RHG est importante pour leur fonction pro-apoptotique. $Rpr^{\Delta GH3}$, une forme de Rpr dépourvue du domaine GH3 qui n'est donc pas mitochondriale, a une capacité réduite à induire de la mort cellulaire (Olson *et al.*, 2003a). De façon intéressante, $Rpr^{\Delta GH3}$ est incapable de stimuler l'ubiquitination et la dégradation de Diap1 bien qu'elle conserve la capacité de lier les IAPs (Olson *et al.*, 2003a). Toutefois, l'ajout de la séquence d'adressage mitochondriale de Hid à $Rpr^{\Delta GH3}$ est suffisant pour restaurer la dégradation de Diap1 et l'induction efficace de mort cellulaire (Olson *et al.*, 2003a). Par ailleurs, $Rpr^{\Delta GH3}$ peut induire la dégradation de Diap1, si Diap1 est adressé artificiellement à la mitochondrie (Freel *et al.*, 2008). Ces données indiquent que la dégradation de Diap1 induite par Rpr requière une localisation mitochondriale de Rpr. En outre, la protéine Hid, qui est impliquée dans la localisation mitochondriale de Rpr, est requise pour que Rpr stimule efficacement l'ubiquitination de Diap1 (Sandu *et al.*, 2010). L'équipe d'Hermann Steller envisage que le principal rôle de Hid serait d'assembler un complexe macro-moléculaire au niveau de la mitochondrie afin de recruter Rpr (**Figure 21**) (Sandu *et al.*, 2010). Au sein de ce complexe, Rpr induirait l'ubiquitination de Diap1 et serait plus actif à la mitochondrie, du fait de la concentration locale de différents régulateurs de l'apoptose. Il a notamment été montré que Dronc et Drice se localisent à la mitochondrie (Dorstyn *et al.*, 2002). Rpr pourrait donc faire partie d'un grand complexe localisé à la mitochondrie qui régulerait la stabilité de Diap1 et l'activation des caspases.

Cette dépendance entre inhibition de Diap1 et localisation mitochondriale n'est pas vraie dans le cas de Grim. En effet, des données indiquent que les domaines RHG et GH3 de Grim activent des voies de mort

différentes, respectivement une inhibition de Diap1 et une voie de mort mitochondriale (Claveria *et al.*, 2002). Ces deux voies peuvent coopérer *in vivo* pour induire efficacement la mort cellulaire (Claveria *et al.*, 2002). La voie de mort mitochondriale induite par le domaine GH3 de Grim n'est pas bien caractérisée. Il a été montré que Grim peut interagir physiquement avec Buffy et Debcl (Wu 2010), mais les conséquences de cette interaction restent à déterminer.

Au-delà de cette localisation mitochondriale de Rpr, Hid et Grim, d'autres données soutiennent l'existence d'une voie de mort mitochondriale en aval de ces protéines pro-apoptotiques. En effet, Rpr, Grim et Hid induisent une perméabilisation de la mitochondrie associée à une libération du cytochrome c dans des cellules de drosophile ou dans d'autres systèmes modèles (Abdelwahid *et al.*, 2007; Claveria *et al.*, 1998; Claveria *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1997; Goyal *et al.*, 2007; Thress *et al.*, 1999; Thress *et al.*, 1998). De plus, une perméabilisation mitochondriale dépendante des RHG est observée au cours de l'apoptose induite par des dommages à l'ADN dans des embryons de drosophile (Abdelwahid *et al.*, 2007). Par ailleurs, la surexpression de *rpr* conduit à des défauts mitochondriaux, comme une chute du potentiel de membrane mitochondriale (Brun *et al.*, 2002).

Ces données suggèrent une homologie fonctionnelle entre les RHG de drosophile et les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 de mammifères. Il est intéressant de noter que les domaine GH3 (des RHG) et BH3 (des protéines de la famille Bcl-2) ont une structure similaire (hélice alpha amphiphatique) (Claveria *et al.*, 2002). Par ailleurs, cette homologie fonctionnelle est soutenue par le fait que le remplacement du domaine BH3 de Bad par le domaine GH3 de Grim n'altère ni la localisation mitochondriale ni la capacité de Bad d'induire la libération de cytochrome c et la mort cellulaire (Claveria *et al.*, 2004). En outre, comme décrit précédemment Grim peut s'associer à Debcl et Buffy (Wu *et al.*, 2010). Par conséquent Debcl, Buffy et les RHG pourraient conjointement contrôler une voie de mort mitochondriale et ainsi ces protéines assureraient ensemble une fonction comparable à celle tenue par les membres de la famille Bcl-2 chez les mammifères.

d) Il existe d'autres protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose

Au-delà des RHG et des membres de la famille Bcl-2, d'autres protéines mitochondriales semblent jouer un rôle dans le processus apoptotique chez la drosophile.

Chez les mammifères, Omi/HtrA2 est séquestré dans l'espace membranaire mitochondriale. Au cours de l'apoptose, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permet sa libération dans le cytosol où il peut exercer son activité apoptotique en liant et en clivant les IAPs. Un homologue de cette protéine a été identifié chez la drosophile : dOmi/HtrA2 (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). Dans les cellules vivantes, dOmi/HtrA2 est localisé dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Après un stimulus apoptotique, il est libéré dans le cytosol mais reste à proximité de la mitochondrie (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). La surexpression de *domi/htra2* induit de la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Challa

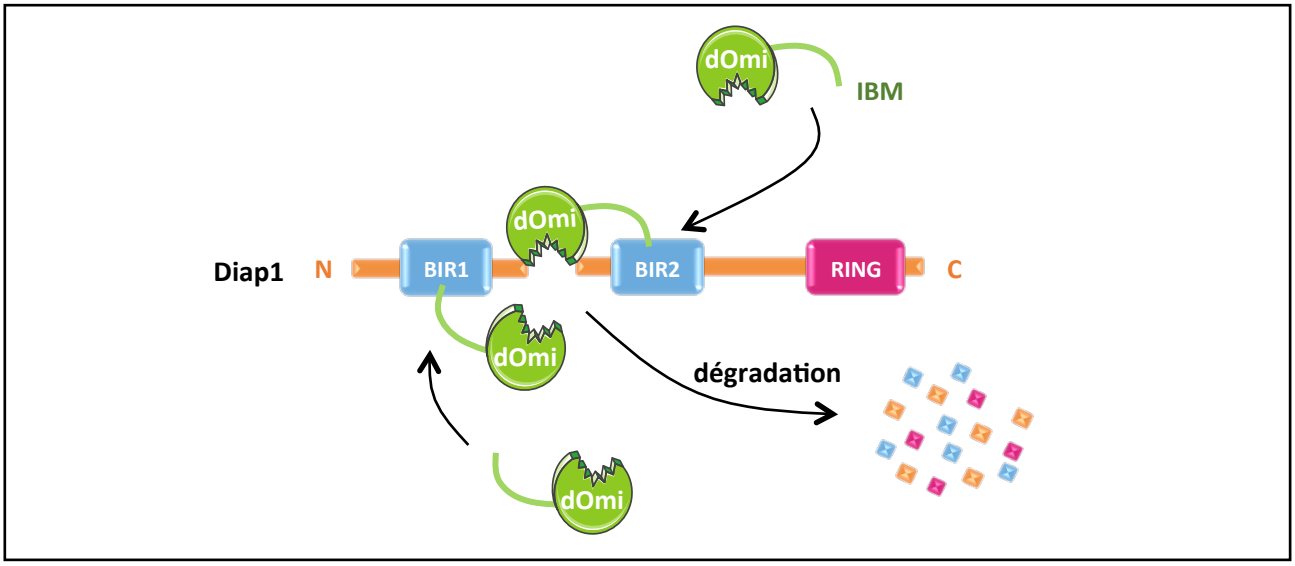


Figure n°23 : La fonction pro-apoptotique de dOmi/HtrA2 implique son activité sérine protéase
En réponse à un signal apoptotique, dOmi/HtrA2 est libéré de la mitochondrie. Une fois dans le cytosol, dOmi, *via* son motif IBM, interagit avec Diap1 au niveau des domaines BIR. Cette interaction permet le clivage de Diap1 par dOmi/HtrA2 ce qui conduit à la dégradation de Diap1 et donc indirectement à l'activation des caspases.
Adapté de Khan *et al.*, 2008

Protéines de mammifères	Homologues de drosophile	Phénotypes associés à la perte de fonction chez la drosophile	Maladies associées à la perte de fonction chez l'Homme
OPA1	OPA1	Létalité, cardiomyopathie, œil rugueux et lisse	Atrophie optique autosomique dominante
Mfn1/Mfn2	Marf	Létalité, cardiomyopathie	Maladie de Charcot-Marie-Tooth
Drp1	Drp1	Létalité, défaut du Nebenkern, perturbation de la distribution des mitochondries et de la dynamique mitochondriale, défaut de neurotransmission	Maladies d'Alzheimer et de Huntington, Atrophie optique autosomique dominante, maladie de Charcot-Marie-Tooth
Fis1	Fis1	Perturbation de la dynamique mitochondriale	
Mff	Tango11	Défaut de fission mitochondriale	

Figure n°24 : Acteurs de la dynamique mitochondriale chez les mammifères et la drosophile
Les principaux acteurs de la dynamique mitochondriale chez les mammifères et leur homologue chez la drosophile sont listés dans le tableau ci-dessus. La perte de fonction des gènes codant pour ces protéines conduit à divers phénotypes chez la drosophile ainsi qu'à plusieurs maladies chez l'Homme.
Adapté de Debattisti and Scorrano 2013

et al., 2007; Igaki *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). A l'inverse, l'expression d'un ARNi dirigé contre *domi/htra2* retarde l'activation des caspases observées dans des cellules en culture en réponse à un stress (Challa *et al.*, 2007). De plus, la perte de fonction de *domi/htra2* réduit la mort de cellules germinales males (Yacobi-Sharon *et al.*, 2013). Ces données suggèrent une conservation de la fonction pro-apoptotique de dOmi/HtrA2 chez la drosophile. dOmi/HtrA2 appartient à la famille des RHG : il possède une séquence IBM par l'intermédiaire de laquelle il est capable d'interagir avec Diap1 (Challa *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008) (**Figure 23**). dOmi/HtrA2 interagit préférentiellement avec le domaine BIR2 de Diap1 mais une interaction est également possible *via* le domaine BIR1 (Khan *et al.*, 2008). Cette interaction conduit au clivage de Diap1 et à sa dégradation (**Figure 23**) (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). En dépit de ces données, une étude indique que dOmi/HtrA2 ne serait requis ni pour la mort cellulaire développementale ni pour l'apoptose en réponse à un stress (Tain *et al.*, 2009).

En dehors du rôle de dOmi/HtrA2, il existe des données éparses dans la littérature indiquant un rôle de protéines mitochondriales dans la mort cellulaire chez la drosophile. Il a notamment été mis en évidence que la perte de fonction d'*AIF* (*Apoptosis Inducing Factor*) réduit la mort cellulaire embryonnaire ce qui conduit à la présence de cellules surnuméraires (Joza *et al.*, 2008). Par ailleurs, dMiro, une GTPase de la membrane externe mitochondriale, est requise pour l'activation des caspases et la mort cellulaire induite par l'expression d'un ARNi dirigé contre *diap1* dans des cellules de drosophile en culture (Yi *et al.*, 2007). De plus, dTSPO (drosophila translocator protein), une autre protéine de la membrane externe mitochondriale est requise pour l'apoptose induite par irradiation ou par un stress oxydant dans le cerveau larvaire (Lin *et al.*, 2014). En outre, les espèces activées de l'oxygène (EAO) produites au niveau de la mitochondrie peuvent participer à la signalisation de mort (Ishii *et al.*, 2013).

e) Dynamique mitochondriale

(1) Une fragmentation mitochondriale est observée au cours de l'apoptose

Les mitochondries existent sous la forme d'un réseau qui se fragmente précocement au cours de processus de mort cellulaire chez les mammifères (Frank *et al.*, 2001). Cette fragmentation peut également être observée dans des cellules de drosophile pendant l'apoptose (Abdelwahid *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2007). Cette perturbation de la dynamique mitochondriale survient *in vivo* pendant la mort cellulaire développementale (Galindo *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2007) et *in vitro* dans des cellules en culture après exposition à différents stimulus apoptotiques comme l'étoposide, la cycloheximide ou encore l'expression ectopique de *rpr* ou *hid* (Abdelwahid *et al.*, 2007; Goyal *et al.*, 2007; Thomenius *et al.*, 2011). La dynamique mitochondriale semble donc être altérée au cours de l'apoptose, à la fois chez la drosophile, et chez les mammifères. Je vais présenter ci-dessous les principaux effecteurs de la dynamique mitochondriale (**Figure 24**), puis je discuterais de leur implication éventuelle dans la survenue de la mort cellulaire.

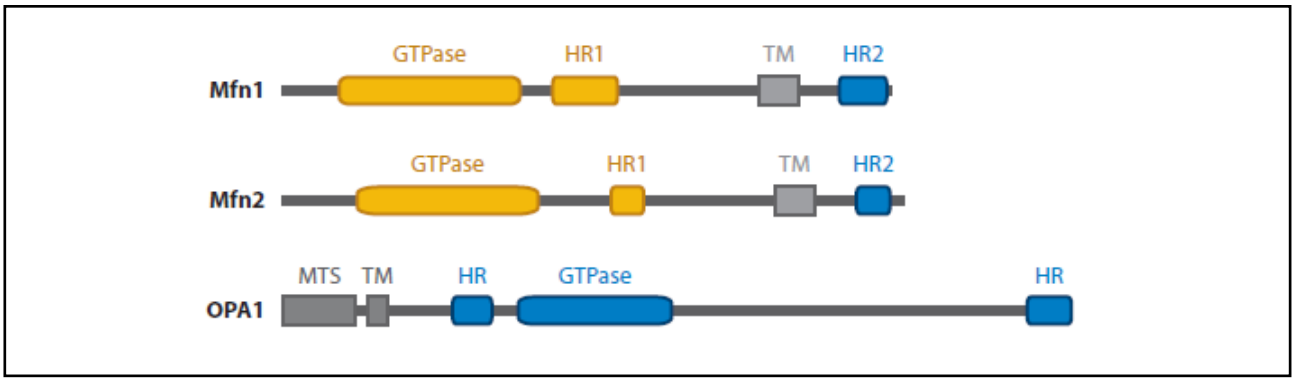


Figure n°25 : Représentation schématique des molécules impliquées dans la fusion chez les mammifères

OPA1, Mfn1 et Mfn2 sont les trois principaux effecteurs de la fusion mitochondriale chez les mammifères. Au niveau de la mitochondrie, elles sont insérées dans la membrane interne (OPA1) ou dans la membrane externe (Mfn1 et Mfn2) par l'intermédiaire de leur domaine transmembranaire (TM).
MTS : mitochondrial targeting sequence, HR : heptad repeat
Issu de Chan 2012

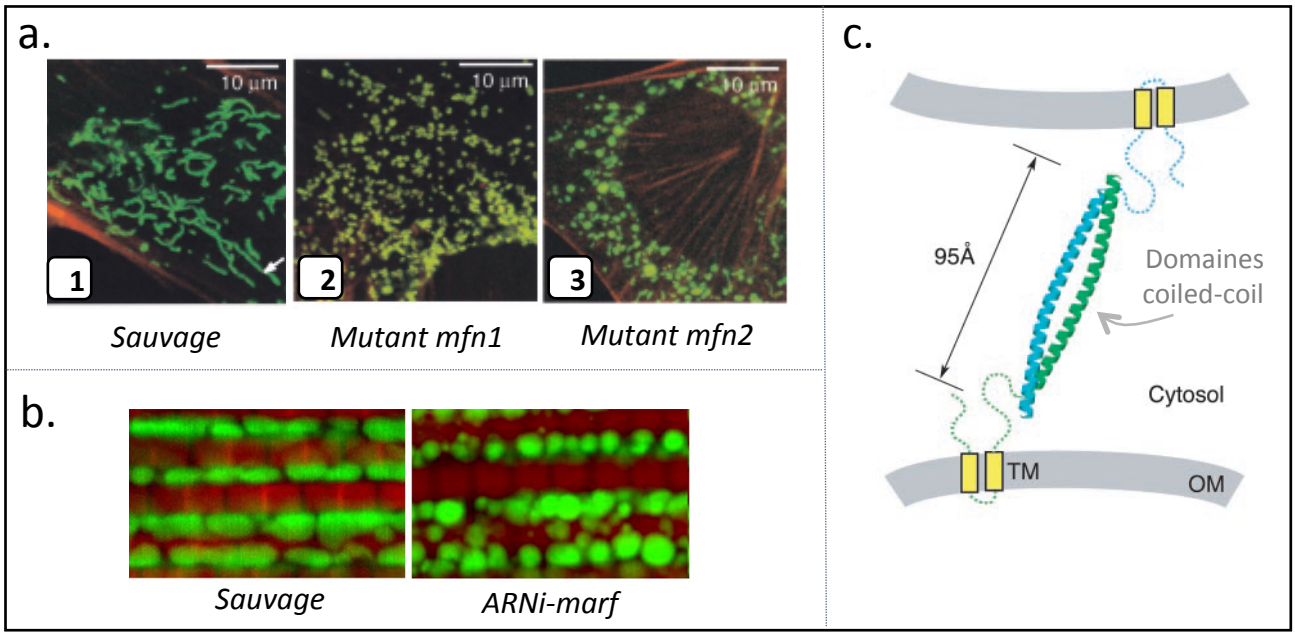


Figure n°26 : Les Mitofusines sont requises pour la fusion mitochondriale

(a) Les fibroblastes embryonnaires de souris exprimant une YFP mitochondriale (en vert) sont co-marqués avec la rhodamine-phalloïdine. La perte de fonction de *mfn1* (2) ou de *mfn2* (3) conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial par rapport au réseau tubulaire observé dans des cellules sauvages (1)
Issu de Chen *et al.*, 2003

(b) Les muscles sont visualisés en rouge et les mitochondries en vert. L'expression d'un ARNi dirigé contre *marf* conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial par rapport aux individus sauvages.
Issu de Deng *et al.*, 2008

(c) Les domaines coiled-coil (des mitofusines présentes sur deux mitochondries adjacentes) interagissent de façon anti-parallèle, ce qui permet de rapprocher les membranes externes mitochondriales à 95 A° l'une de l'autre.
Issu de Koshiba *et al.*, 2004

(2) Machinerie de la dynamique mitochondriale

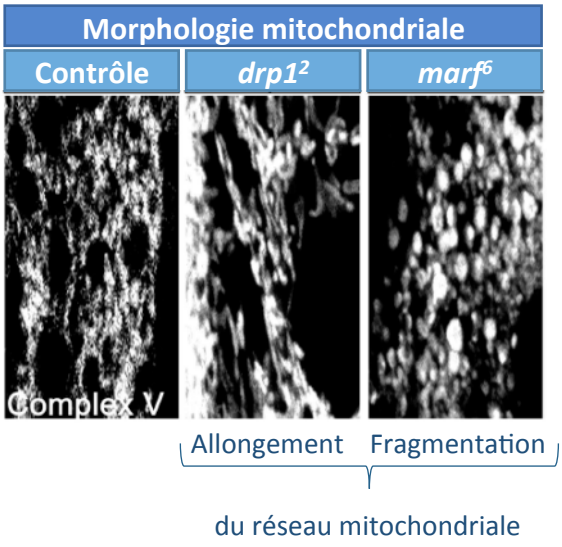
Au sein de la cellule, les mitochondries s'organisent sous la forme d'un réseau de tubules interconnectés. Les mitochondries sont des organites extrêmement dynamiques qui fusionnent et fissionnent de façon continue. Cette dynamique mitochondriale permet de contrôler la forme et la taille du réseau mitochondrial ainsi que le nombre de mitochondries. Cette balance est essentielle pour le fonctionnement normal de la mitochondrie. Les molécules impliquées dans la fission et la fusion ont été identifiées et sont conservées au cours de l'évolution (Sauvanet *et al.*, 2010) mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont encore aujourd'hui que partiellement compris. J'ai choisi de ne présenter ici que les principaux effecteurs de la dynamique mitochondriale chez la drosophile en les comparants à ceux présents dans les cellules de mammifères (**Figure 24**).

Présentation des principaux acteurs de la fusion mitochondriale

Au cours du processus de fusion mitochondriale, deux événements de fusion membranaires doivent survenir : les membranes interne et externe d'une mitochondrie fusionnent avec les membranes correspondantes de la mitochondrie adjacente. Ces deux événements de fusion membranaires sont coordonnés et surviennent la plupart du temps simultanément. La fusion mitochondriale implique plusieurs grandes GTPases transmembranaires de la famille de la dynamine à savoir OPA1 (optic atrophy 1) et les mitofusines (Marf et Fuzzy Onions chez la drosophile et Mfn1 et Mfn2 chez les mammifères) (**Figure 25**).

- **Les mitofusines**

Mfn1 et Mfn2 sont responsables de la fusion de la membrane externe mitochondriale chez les mammifères (Chen *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004). Des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de Mfn1 ou Mfn2 ont des mitochondries fortement fragmentées contrairement au réseau tubulaire observé dans des cellules sauvages (Chen *et al.*, 2003) (**Figure 26**). Mfn1 et Mfn2 sont ancrées dans la membrane externe mitochondriale et exposent leurs extrémités N- et C-terminales dans le cytosol (Rojo *et al.*, 2002). La région N-terminale de ces protéines contient le domaine GTPase alors que la région C-terminale possède des motifs HR (Heptad Repeat) permettant la formation d'une structure coiled-coil (Chen *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004; Koshiba *et al.*, 2004) (**Figure 25**). Mfn1 et Mfn2 peuvent former des homodimères et des hétérodimères par le biais d'une liaison antiparallèle de leur domaine coiled-coil. L'interaction en trans des mitofusines présentes sur deux mitochondries adjacentes permet d'aligner les membranes externes mitochondriales et de les maintenir à une distance d'environ 95A° l'une de l'autre (Koshiba *et al.*, 2004) (**Figure 26**). Un changement de conformation des mitofusines nécessitant l'hydrolyse du GTP permettrait ensuite la fusion à proprement parler des membranes externes mitochondriales (Knott *et al.*, 2008).



<u>Figure n°27</u> : Drp1 et Marf ont une action antagoniste sur la morphologie mitochondriale

La morphologie mitochondriale dans les cellules musculaires larvaires est visualisée grâce à un immunomarquage du complexe V. La perte de fonction de *drp1* (*drp1*^{2}) conduit à la présence d'un réseau mitochondrial allongé par rapport à la condition contrôle. A l'inverse, la perte de fonction de *marf* (*marf*^{6}) conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial.

Issu de Sandoval *et al.*, 2014

Le génome de la drosophile code pour deux membres de la famille des mitofusines : *fuzzy onions* (*fzo*) et *marf* (*mitochondrial assembly regulatory factor*). Dans les spermatides précoces de drosophile, les mitochondries sont situées à proximité du noyau haploïde. Quand les spermatides maturent, les mitochondries s'agrègent et fusionnent pour former deux larges mitochondries qui s'enroulent l'une autour de l'autre. La structure sphérique ainsi obtenue est appelé Nebenkern. Lorsqu'il est observé en microscopie électronique à partir de coupes de spermatides, le Nebenkern a une apparence de tranche d'oignon à cause de la présence de membranes concentriques formées par les mitochondries enroulées. Le gène *fuzzy onions* tire son nom du fait que la structure du Nebenkern est altérée dans un contexte mutant (Hales and Fuller, 1997). La perte de fonction de *fzo* conduit à un échec de fusion des mitochondries. Toutefois, l'expression de *fzo* est restreinte à la lignée germinale male (Hwa *et al.*, 2002). *marf* est lui exprimé de façon ubiquitaire et est impliqué dans le processus de fusion mitochondriale dans les autres tissus (**Figures 26 et 27**) (Deng *et al.*, 2008; Hwa *et al.*, 2002).

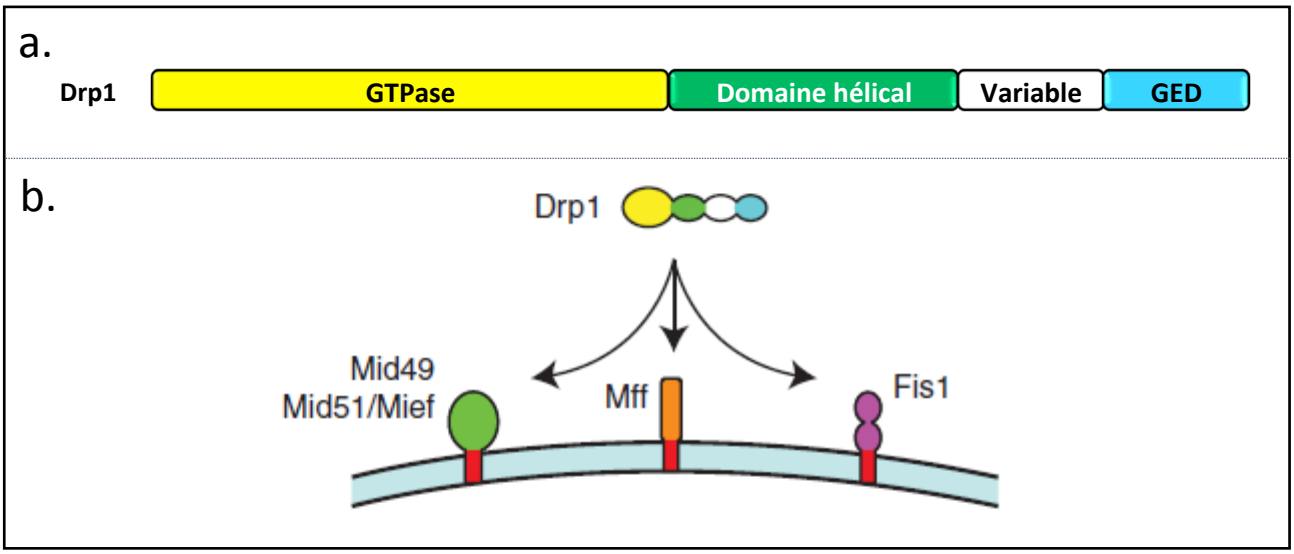
- **OPA1**

Le gène *OPA1* (*Optic Atrophy 1*) doit son nom au fait qu'il est retrouvé fréquemment muté chez les patients atteints d'atrophie optique autosomique dominante (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000), une maladie dans laquelle les cellules ganglionnaires de la rétine dégénèrent ce qui conduit à l'atrophie du nerf optique et donc à une perte de l'acuité visuelle. La protéine OPA1 se localise au niveau de la membrane interne mitochondriale (Olichon *et al.*, 2002). La réduction du niveau d'OPA1 conduit à la présence d'un réseau mitochondrial fragmenté du fait d'un déficit de fusion (Cipolat *et al.*, 2004; Ishihara *et al.*, 2006). Il a été démontré qu'OPA1 est requis pour la fusion de la membrane interne mitochondriale (Cipolat *et al.*, 2004; Landes *et al.*, 2010).

Un homologue d'OPA1 a été identifié chez la drosophile : il est appelé OPA1 ou OPA1-like (McQuibban *et al.*, 2006; Yarosh *et al.*, 2008). L'expression d'un ARNi dirigé contre *OPA1* induit une fragmentation des mitochondries dans des cellules de drosophile en culture (McQuibban *et al.*, 2006) et *in vivo* dans des hémocytes larvaires (Banerjee and Chinthapalli, 2014). De même, une fragmentation du réseau mitochondrial est observée suite à la perte de fonction d'*OPA1* dans l'œil en développement (Yarosh *et al.*, 2008). Ces données suggèrent fortement que le rôle d'OPA1 dans la fusion mitochondriale serait conservé chez la drosophile.

Drp1 : le principal acteur de la fission mitochondriale

Drp1 (dynamin-related protein 1) est le principal effecteur de la fission mitochondriale. Une déplétion de *drp1* ou son inhibition augmente la longueur et la connectivité des mitochondries et empêche leur fragmentation (Lee *et al.*, 2004; Sauvanet *et al.*, 2010; Smirnova *et al.*, 2001).



<u>Figure n°28</u> : Recrutement de la GTPase Drp1 à la mitochondrie

(a) Représentation schématique de Drp1. Drp1 contient un domaine GTPase N-terminal nécessaire au mécanisme de fission, un domaine hélical central comparable à celui de la dynamine et un domaine effecteur de la GTPase (GED pour GTPase effector domaine) en C-terminal.

(b) Dans les cellules de mammifères, différentes protéines peuvent servir de récepteurs pour recruter Drp1 au niveau de la membrane externe mitochondriale.

Adapté de Van der Bliek *et al.*, 2013

Drp1 est une grande GTPase, principalement cytosolique, qui fait continuellement la navette entre le cytosol et la membrane externe mitochondriale (Smirnova *et al.*, 2001). Au niveau de cette membrane, Drp1 n'est pas reparti uniformément, il est présent au niveau de sites restreints correspondant aux futurs sites de fission (Smirnova *et al.*, 2001). Drp1 n'interagit pas directement avec les phospholipides membranaires, il est recruté à la mitochondrie *via* une interaction avec une protéine adaptatrice servant de récepteur (**Figure 28**). Plusieurs protéines de la membrane externe mitochondriale ont été proposées pour être le récepteur de Drp1 mais le mécanisme précis de recrutement et leur importance relative dans le processus de fission mitochondriale ne sont pas clairs. En effet, Fis1, une protéine transmembranaire de la membrane externe mitochondriale, a été longtemps considérée comme le récepteur de Drp1 du fait que la perte de fonction de *fis1* inhibe le processus de fission mitochondriale. Son rôle a toutefois été remis en cause : la perte de fonction de *fis1* ou sa surexpression ne perturbe pas la localisation mitochondriale de Drp1 (Lee *et al.*, 2004; Otera *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2003). De plus, Fis1 est localisé uniformément dans la membrane externe mitochondriale alors que Drp1 est recruté au niveau de sites discrets (Suzuki *et al.*, 2003). A l'inverse, la perte de fonction du gène *mff* (*mitochondrial fission factor*), codant pour une protéine de la membrane externe mitochondriale, réduit le recrutement de Drp1 à la mitochondrie. De plus, une interaction physique entre Mff et Drp1 a été mise en évidence (Otera *et al.*, 2010). Un rôle de récepteur de Drp1 a également été proposé pour les protéines MiD49 et MiD51 (mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa) (Palmer *et al.*, 2011). Leur surexpression conduit à une augmentation du recrutement de Drp1 à la mitochondrie et, en outre, une interaction physique a été mise en évidence par double hybride et co-immunoprécipitation (Palmer *et al.*, 2011). Plusieurs protéines pourraient donc recruter Drp1 à la mitochondrie pour permettre la fission (**Figure 28**) (Loson *et al.*, 2013). L'importance relative de ces différents récepteurs dépendrait du type cellulaire considéré.

Drp1 contient un domaine GTPase N-terminal (**Figure 28**) qui fournit la force mécanique nécessaire au phénomène de fission, un domaine hélical central comparable à celui de la dynamine et un domaine effecteur de la GTPase (GED pour GTPase effector domaine) en C-terminal (Ugarte-Uribe and Garcia-Saez, 2014). Une fois recruté à la mitochondrie, Drp1 s'oligomérise et forme une spirale autour de la membrane externe ce qui crée une courbure de cette membrane. Un changement de conformation de Drp1 induit par l'hydrolyse du GTP va provoquer la constriction des membranes interne et externe et finalement la fission mitochondriale (Otera *et al.*, 2013).

L'homologue de drosophile de Drp1 a été identifié par le biais d'un crible génétique recherchant des gènes affectant la neurotransmission dans l'œil (Verstreken *et al.*, 2005). Les synapses neuronales mutantes pour *drp1* sont dépourvues de mitochondries, ces dernières sont regroupées au niveau du corps cellulaire. Cette mauvaise localisation des mitochondries conduit à un déficit en ATP au niveau de la synapse. Du fait de ce déficit, les neurones mutants sont incapables de mobiliser les vésicules synaptiques et donc échouent à maintenir une neurotransmission correcte pendant une stimulation neuronale intense (Verstreken *et al.*, 2005). Il a, par la suite, été mis en évidence que *drp1* est exprimé dans les spermatocytes de drosophile où il est requis pour une structure correcte du Nebenkern (Aldridge *et al.*, 2007). En outre, suite à l'expression d'un ARNi dirigé contre

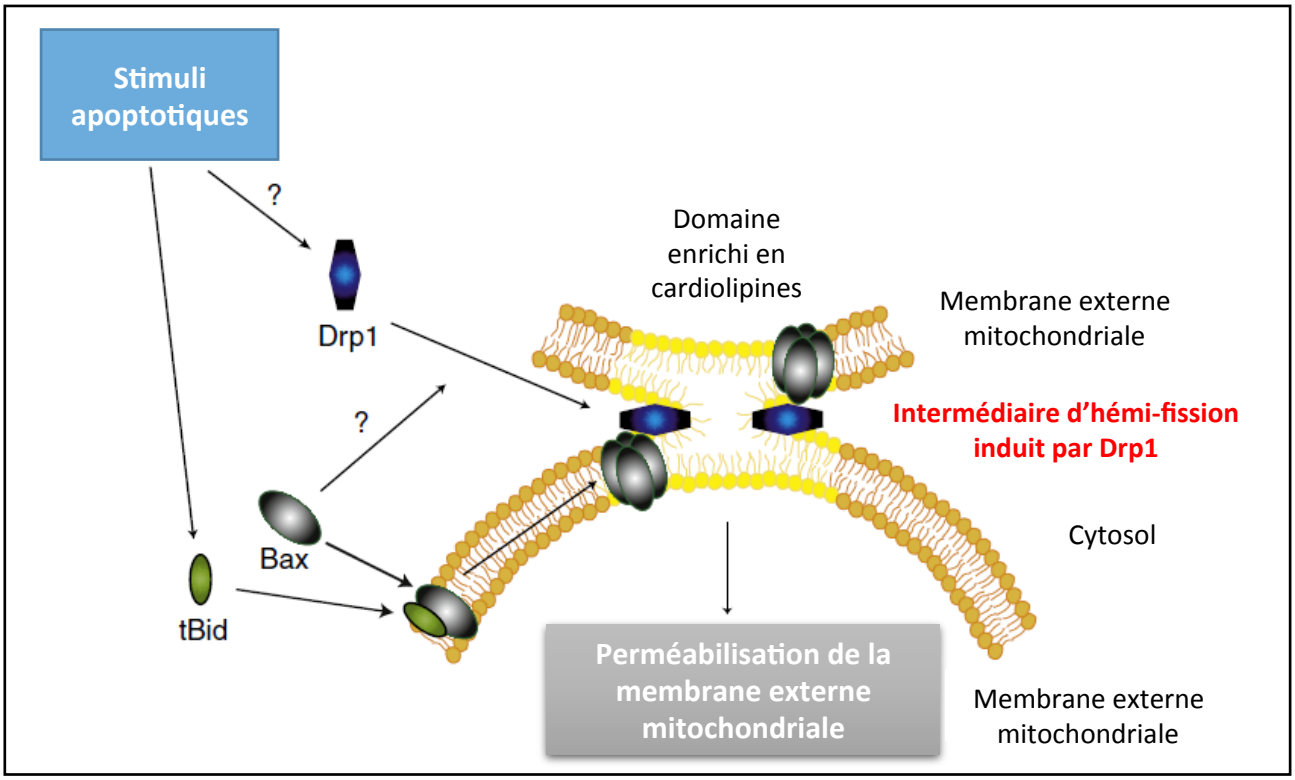
drp1 des défauts de fission mitochondriale sont observés dans des cellules de drosophile en culture (Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008). Ces différentes études ont permis de mettre en évidence que *drp1* est essentiel, chez la drosophile, pour assurer une morphologie et une distribution correcte des mitochondries, ainsi que pour le phénomène de fission mitochondriale (**Figure 27**). Son rôle semble donc conservé entre drosophile et mammifères. De façon intéressante, il y a une forte conservation de la séquence d'acides aminés entre les protéines Drp1 humaine et de drosophile (Debattisti and Scorrano, 2013).

Chez la drosophile, le mécanisme de recrutement de Drp1 à la mitochondrie est mal compris. En effet, il existe peu de données concernant le rôle de Fis1 dans la dynamique mitochondriale chez cet organisme même si un rôle dans la régulation de la forme des mitochondries a été suggéré (Yang *et al.*, 2008). Toutefois une étude menée sur des cellules de drosophile en culture indique que l'expression d'un ARNi dirigé contre *tango11* (l'homologue de drosophile de *mff*) inhibe la fragmentation mitochondriale et conduit à la présence d'un réseau allongé comparable à celui observé suite à la déplétion de *drp1* (Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre plus précisément le mécanisme de recrutement et de fonctionnement de Drp1 à la mitochondrie, que ce soit, chez la drosophile ou chez les mammifères.

(3) Fragmentation mitochondriale : une cause ou une conséquence de l'apoptose ?

Il est aujourd'hui communément admis qu'une fragmentation du réseau mitochondrial existe au cours de l'apoptose qui survient en réponse à un grand nombre de stimulus (Martinou and Youle, 2011; Suen *et al.*, 2008). Toutefois, le rôle de cette fragmentation mitochondriale dans le processus d'apoptose est un sujet de débat. En effet, comme on va le voir, certaines études indiquent que cette fragmentation est requise pour le déroulement correct de la mort cellulaire alors que d'autres suggèrent que cette fragmentation ne serait qu'une conséquence du processus apoptotique (Castanier and Arnoult, 2010).

Il existe plusieurs arguments en faveur d'un rôle actif de la fragmentation mitochondriale dans la régulation du processus apoptotique. Tout d'abord, cette fragmentation survient en amont de l'activation des caspases, que ce soit, dans des cellules de mammifères ou de drosophiles (Goyal *et al.*, 2007). De plus, quelle que soit l'espèce considérée, l'inhibition des caspases ne bloque pas la fragmentation mitochondriale (Frank *et al.*, 2001; Goyal *et al.*, 2007). A l'inverse, et de façon intéressante, l'inhibition de *drp1* conduit à une inhibition de l'activation des caspases et de la mort cellulaire, là encore, chez la drosophile et dans des cellules de mammifères (Abdelwahid *et al.*, 2007; Cassidy-Stone *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2001; Goyal *et al.*, 2007; Ishihara *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2004; Wakabayashi *et al.*, 2009). Ceci laisse penser que la fission mitochondriale est requise pour l'apoptose. Toutefois, ces expériences n'excluent pas l'existence d'une fonction de Drp1 dans le processus de mort cellulaire indépendante de son rôle dans la dynamique mitochondriale. En outre, dans des cellules de mammifères, l'inhibition de *drp1* inhibe la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération du cytochrome c dans le cytosol (Frank *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Par ailleurs, la surexpression de



<u>Figure n°29</u> : Drp1 induit un remodelage membranaire au niveau de la mitochondrie et stimule l'oligomérisation de Bax

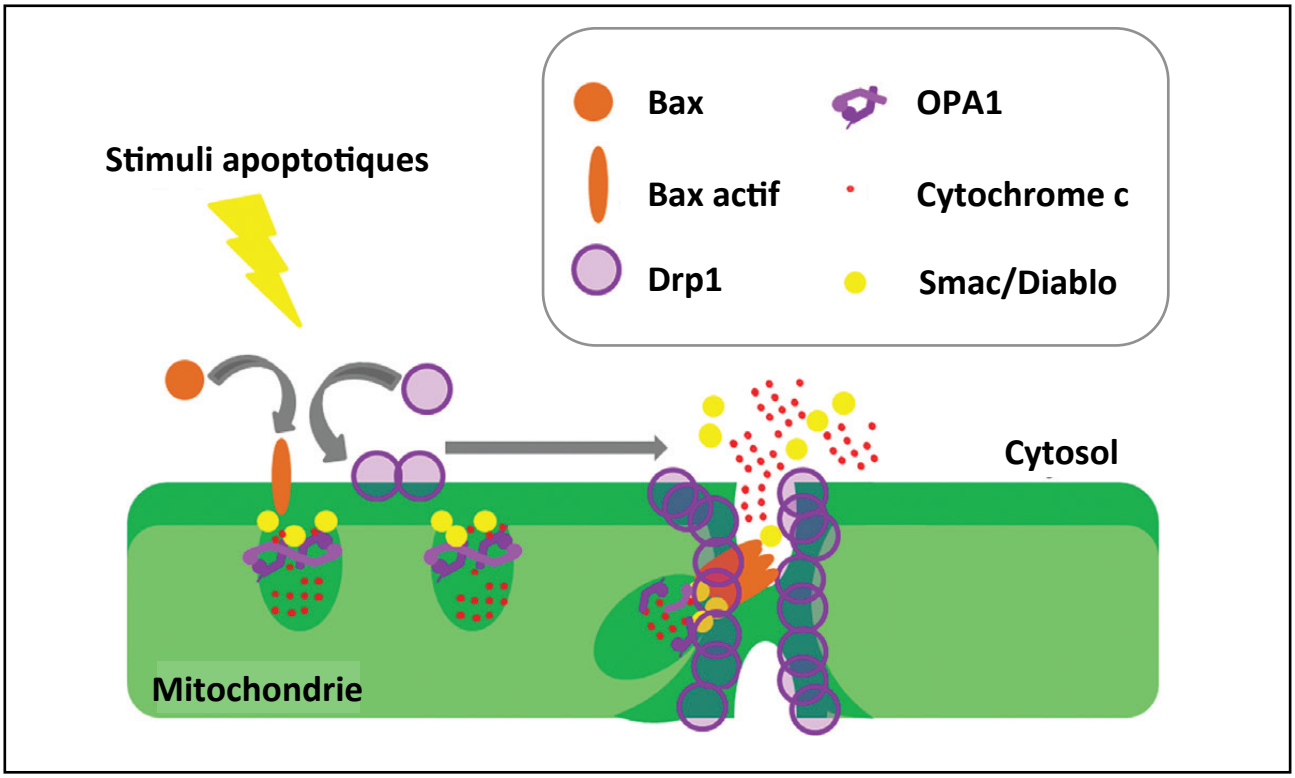
En présence d'un stimulus apoptotique, la protéine tBid active s'insère dans des microdomaines de la membrane externe mitochondriale enrichie en cardiolipines et permet le recrutement de Bax. De façon concomitante, Drp1 est recruté à la mitochondrie où il permet la formation d'un intermédiaire d'hémi-fission. Ce remodelage membranaire favorise l'oligomérisation de Bax induite par tBid et par conséquent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Adapté de Landes and Martinou, 2011

fis1 dans des cellules de mammifères induit une fission mitochondriale et de l'apoptose (James *et al.*, 2003). De façon cohérente avec ces données, l'expression d'un ARNi dirigé contre *mff* dans des conditions apoptotiques conduit à une élongation du réseau mitochondriale associée à un retard de la libération du cytochrome c et de la mort cellulaire (Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008; Otera *et al.*, 2010). De même, la déplétion des mitofusines ou au contraire leur surexpression, module la réponse des cellules à l'apoptose (Jahani-Asl *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Sugioka *et al.*, 2004; Thomenius *et al.*, 2011). Il a été mis en évidence que Rpr induit une fragmentation mitochondriale en liant et en inhibant la protéine pro-fusion Marf (Thomenius *et al.*, 2011). La surexpression de *marf* induit une élongation du réseau mitochondrial et s'oppose à l'apoptose induite par Rpr ou par irradiation chez la drosophile (Thomenius *et al.*, 2011). Cela suggère que la fragmentation mitochondriale serait requise pour l'activité pro-apoptotique de Rpr.

Un certain nombre de composants de la machinerie de fission/fusion, dont OPA1, Fis1, Drp1 et les mitofusines, semblent donc impliqués dans la régulation de l'apoptose (Abdelwahid *et al.*, 2007; Estaquier and Arnoult, 2007; Frank *et al.*, 2001; Frezza *et al.*, 2006; Goyal *et al.*, 2007; James *et al.*, 2003; Olichon *et al.*, 2003; Sugioka *et al.*, 2004; Thomenius *et al.*, 2011). Le mécanisme moléculaire par lequel ces différentes protéines contrôlent la mort cellulaire reste assez flou. Néanmoins, certaines données existent concernant Drp1. L'équipe de Jean-Claude Martinou a mis en évidence qu'après son recrutement à la mitochondrie, dans des conditions apoptotiques, Drp1 permet la formation d'un intermédiaire d'hémi-fission (**Figure 29**) (Montessuit *et al.*, 2010). Ce remodelage membranaire mitochondrial crée des sites de contacts entre la membrane interne et la membrane externe et favorise l'oligomérisation de Bax ce qui conduit à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Landes and Martinou, 2011; Montessuit *et al.*, 2010; Ugarte-Uribe and Garcia-Saez, 2014). La fission mitochondriale participerait donc à la libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques précédemment contenues dans la mitochondrie. Il a également été proposé que les sites de fissions soient des lieux d'assemblage de complexes macro-moléculaires impliqués dans l'induction de l'apoptose (Karbowski *et al.*, 2002; Krieser and White, 2009).

D'autres données de la littérature suggèrent à l'inverse que la fission mitochondriale ne serait pas requise pour l'apoptose. En effet, contrairement à l'apparente fonction de Drp1 dans l'apoptose décrite ci-dessus, l'inhibition de la fission par l'expression d'un ARNi dirigé contre *drp1* conduit spontanément à de l'apoptose dans des cellules cancéreuses humaines provenant d'un cancer du poumon ou du colon (Inoue-Yamauchi and Oda, 2012). De plus l'inhibition de *drp1* n'a pas, ou peu, d'effet sur l'apoptose des cellules HeLa (Estaquier and Arnoult, 2007; Ishihara *et al.*, 2009; Parone *et al.*, 2006). En outre, des souris KO (knock-out) pour *drp1* présentent un taux élevé d'apoptose ce qui suggère que Drp1 n'est pas indispensable à la mort cellulaire (Ishihara *et al.*, 2009). Enfin, un inhibiteur pharmacologique de Drp1, mdivi-1, inhibe la libération du cytochrome c dépendante de tBid à partir de mitochondries isolées qui sont incapables *in vitro* de fissionner (Cassidy-Stone *et al.*, 2008; Lackner and Nunnari, 2010). Ces données suggèrent que mdivi-1 inhibe une fonction de Drp1 autre que sa capacité à induire une fission mitochondriale. Par conséquent, si tant est que Drp1 ait un rôle dans le processus apoptotique, ce dernier ne correspondrait pas à une modulation de la dynamique mitochondriale.



<u>Figure n°30</u> : Modèle proposé pour la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la fragmentation mitochondriale survenant au cours de l'apoptose dans des cellules de mammifères
Après un stimulus apoptotique, Bax et Drp1 colocalisent à la mitochondrie au niveau des sites de fission. La fragmentation mitochondriale et la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale surviennent au niveau de ces sites de fission. Ces évènements conduisent à la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques précédemment contenus dans l'espace intermembranaire mitochondrial comme le cytochrome c ou Smac/Diablo
Adapté de Ugarte-Uribe and García-Sáez, 2014

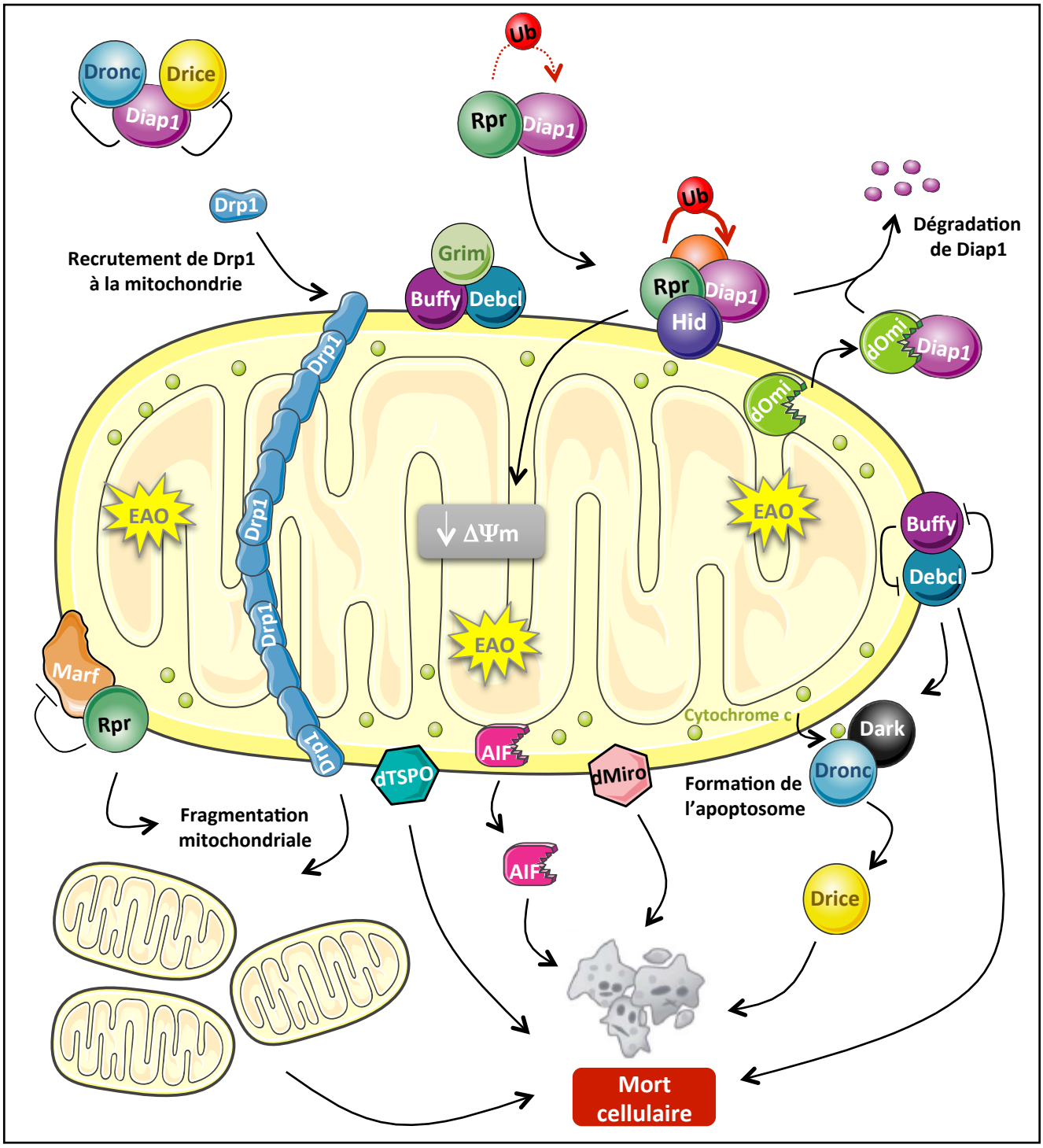
(4) Lien entre les membres de la famille Bcl-2 et la dynamique mitochondriale

Au cours des étapes précoces de l'apoptose, Bax, normalement localisé dans le cytosol, est recruté au niveau de la membrane externe mitochondriale ou il co-localise avec Drp1 et Mfn2 au niveau des futurs sites de fission mitochondriaux (Karbowski *et al.*, 2002). Une fois Bax recruté à la mitochondrie, Drp1 ne fait plus la navette entre le cytosol et la mitochondrie, il reste localisé au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cette rétention mitochondriale est permise par une SUMOylation de Drp1 dépendante de Bax et Bak (Wasiak *et al.*, 2007). La SUMOylation de Drp1 augmente son activité GTPase ce qui conduit à la fission du réseau mitochondrial (Braschi *et al.*, 2009; Scorrano and Liu, 2009). Par ailleurs, Drp1 stimule l'oligomérisation de Bax (Montessuit *et al.*, 2010) et donc la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Il est intéressant de noter que l'insertion de Bax est facilitée dans des mitochondries fragmentées (Brooks *et al.*, 2011). Drp1 et Bax stimuleraient donc réciproquement leur activité au cours du processus apoptotique. Par ailleurs, Bax interagit physiquement avec Mfn1 pendant l'apoptose (Brooks *et al.*, 2007). Cette interaction pourrait inhiber Mfn1 et entrainer la fission mitochondriale. Chez les mammifères, les protéines de la famille Bcl-2 modulent donc la dynamique mitochondriale et cet aspect de leur activité est important pour la régulation de l'apoptose (**Figure 30**).

Chez la drosophile, il existe beaucoup moins de données sur un lien éventuel entre les membres de la famille Bcl-2 et la dynamique mitochondriale. Une étude menée par l'équipe de John Abrams indique que la perte de fonction de *debcl* n'induit pas, *in vivo*, de défauts de l'organisation des mitochondries dans les cellules vivantes (Galindo *et al.*, 2009). De même, la fragmentation mitochondriale, qui survient au cours de la mort cellulaire développementale des glandes salivaires, n'est pas modifiée suite à la perte de fonction de *debcl* (Galindo *et al.*, 2009). Par contre, l'expression de *buffy* supprime les changements mitochondriaux associés à l'apoptose induite par la perte de fonction de *pink1* (Park *et al.*, 2006), un gène codant pour une kinase mitochondriale dont la perte de fonction chez l'Homme est associée à la maladie de Parkinson. Buffy et Debcl sont requis pour la mort des cellules nourricières au cours de l'ovogenèse. Dans ce contexte, la perte de fonction de *debcl* ou de *buffy* conduit à une élongation du réseau mitochondriale (Tanner *et al.*, 2011; Tanner and McCall, 2011). Il semble donc exister un lien entre les membres de la famille Bcl-2, la dynamique mitochondriale et la mort cellulaire chez la drosophile. Toutefois, des études supplémentaires, sont nécessaires afin de mieux le caractériser et d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents.

f) Bilan de la place de la mitochondrie chez la drosophile

Contrairement à ce que laissaient présager les premières études concernant les mécanismes d'apoptose chez la drosophile, la mitochondrie a une place de choix dans le contrôle de la mort cellulaire chez cet organisme modèle comme c'est le cas chez les mammifères (Abdelwahid *et al.*, 2011; Desagher and Martinou, 2000). Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans des cellules de mammifères, chez la drosophile peu de



<u>Figure n°31</u> : Voie de mort mitochondriale chez la drosophile

En réponse à un stimulus apoptotique, dOmi/HtrA2 est libérée de la mitochondrie. Une fois dans le cytosol, il dégrade Diap1 par clivage. AIF est également libérée de la mitochondrie et participe à l'induction de mort cellulaire. Les protéines mitochondriales dTSPO et dMiro, localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, sont également impliquées dans le programme de mort. Le cytochrome c est exposé à la surface mitochondriale en réponse au stimulus apoptotique. Cette exposition favoriserait la formation d'un apoptosome à proximité de la mitochondrie. Debcl et Buffy, toutes deux mitochondriales, jouent un rôle dans la mort induite par un stress mais leur mode d'action reste à identifier. Debcl et Buffy interagissent avec Grim mais la signification biologique de cette interaction est encore inconnue. Les RHG sont recrutés à la mitochondrie en réponse au stimulus apoptotique. Cette localisation mitochondriale accroit la capacité de Rpr d'induire la dégradation de Diap1. Rpr peut également altérer le potentiel de membrane mitochondriale. En outre, Rpr favorise la fragmentation mitochondriale en inhibant la protéine pro-fusion Marf. Cette fragmentation dépendante de la protéine Drp1 est requise pour une mort cellulaire efficace. Enfin des EAO produits au niveau de la mitochondrie participent également à l'induction de mort cellulaire.

protéines semblent être libérées de la mitochondrie au cours du processus apoptotique, et l'existence d'une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale reste, aujourd'hui encore, un sujet de débat au sein de la communauté drosophiliste. Néanmoins, plusieurs protéines mitochondriales sont impliquées dans le programme de mort chez la drosophile et diverses protéines dont les RHG sont recrutées à la mitochondrie en condition apoptotique (**Figure 31**). A la vue de ces données, il a été proposé que la cascade apoptotique soit inversée entre la drosophile et les mammifères : chez les mammifères les acteurs de l'apoptose sont libérés depuis la mitochondrie dans le cytosol alors que chez la drosophile les régulateurs de l'apoptose subissent une relocalisation inverse, ils sont concentrés dans, ou à proximité de la mitochondrie, pendant l'apoptose (Estaquier *et al.*, 2012).

Par ailleurs, une fragmentation mitochondriale est observée pendant l'apoptose à la fois chez la drosophile et les mammifères et l'implication des protéines de la machinerie de fission/fusion dans la voie de mort mitochondriale semble être conservée entre les deux espèces. Une hypothèse envisagée est que la mitochondrie, et plus particulièrement les sites de fission, serviraient de sites d'ancrage pour recruter et concentrer les protéines impliquées dans la mort cellulaire (Abdelwahid *et al.*, 2011).

La mitochondrie apparait donc aujourd'hui chez la drosophile comme un régulateur majeur du processus de mort cellulaire. Les disparités qui existent entre les voies de morts mitochondriales dans des cellules de drosophile et de mammifères pourraient n'être dues qu'à l'état incomplet de nos connaissances. La drosophile se révèle être un système modèle puissant pour comprendre les maladies humaines, impliquant une voie de mort mitochondriale, ou associées à une altération du fonctionnement mitochondrial (Abdelwahid *et al.*, 2011; Bueler, 2010; Guo, 2012). Il apparait donc essentiel de poursuivre les recherches concernant la contribution de la mitochondrie dans la mort cellulaire chez la drosophile.

5. La voie JNK : une voie de signalisation importante pour les processus apoptotiques

Les voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont connues pour contrôler divers processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation ou encore la balance survie cellulaire versus apoptose en intégrant des signaux créés par des stimuli extra- ou intra-cellulaires. Trois voies MAPK conservées au cours de l'évolution ont été décrites : la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase), la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) et la voie p38. La voie JNK, également appelée voie SAPK (stress activated protein kinase pathway), est impliquée dans l'activation de la machinerie d'apoptose dans de nombreux systèmes biologiques et expérimentaux (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Kanda and Miura, 2004; Sui *et al.*, 2014). Alors que les différents composants de la voie JNK sont représentés par de larges familles de gènes chez les vertébrés, la redondance génétique est moindre chez la drosophile ce qui simplifie l'étude de cette voie de signalisation (Igaki, 2009; Johnson and Nakamura, 2007). Je vais m'attacher à décrire ici succinctement les acteurs de la voie JNK chez la drosophile et à présenter les modes d'activation possibles de cette voie de signalisation dans le cas de processus apoptotiques.

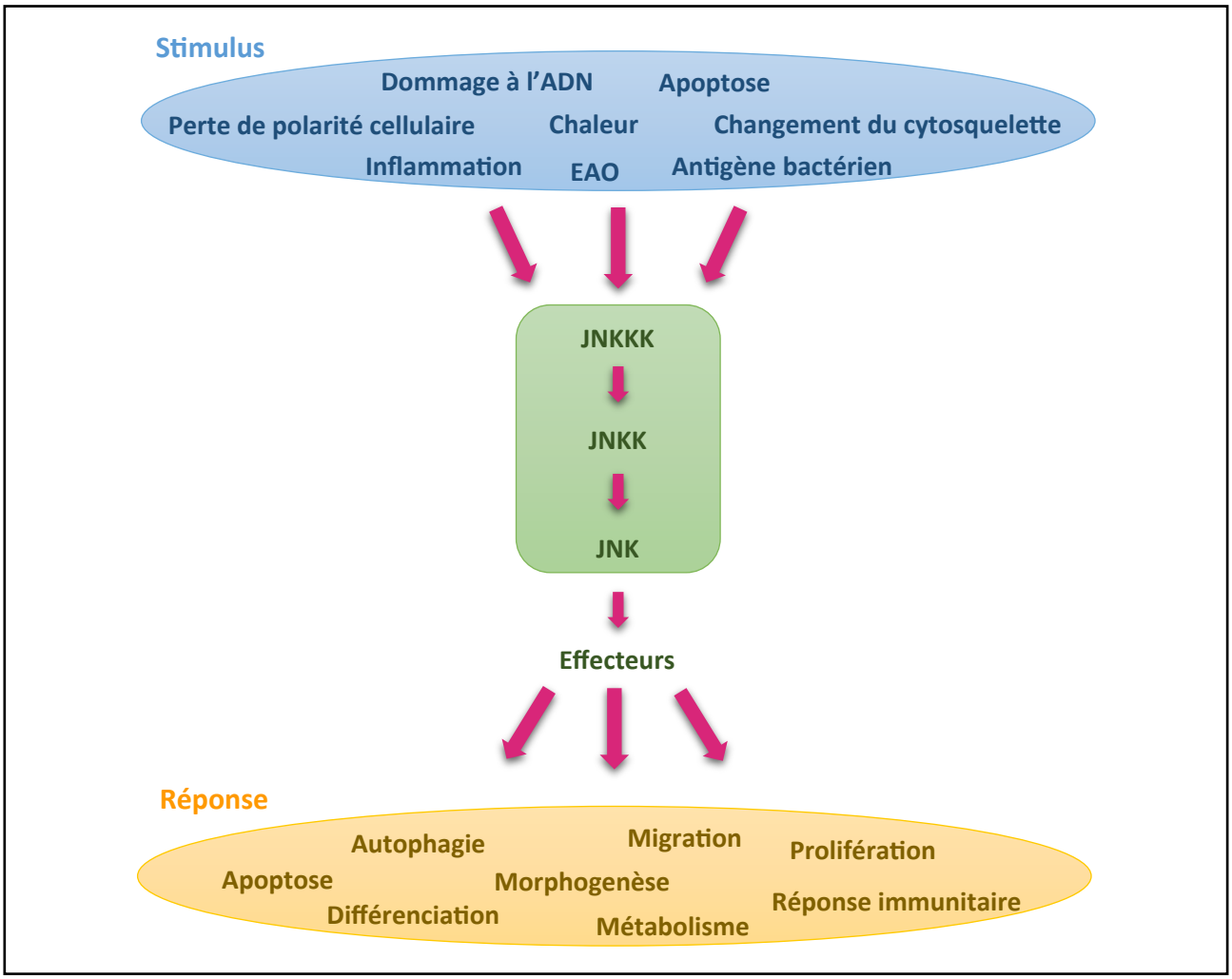


Figure n°32 : Stimuli d'activation de la voie JNK et réponses cellulaires
La voie JNK peut être activée par une grande variété de stimuli intrinsèques ou environnementaux. Une fois activée, par l'intermédiaire de différents effecteurs, cette voie de signalisation régule diverses fonctions cellulaires. Les différents stimuli d'activation de la voie JNK et les réponses à cette activation, listés ici, ne sont que des exemples et ne correspondent pas à un état des lieux exhaustif des divers stimuli et/ou réponses possibles.

a) La voie JNK chez la drosophile : signaux déclencheurs et fonctions biologiques

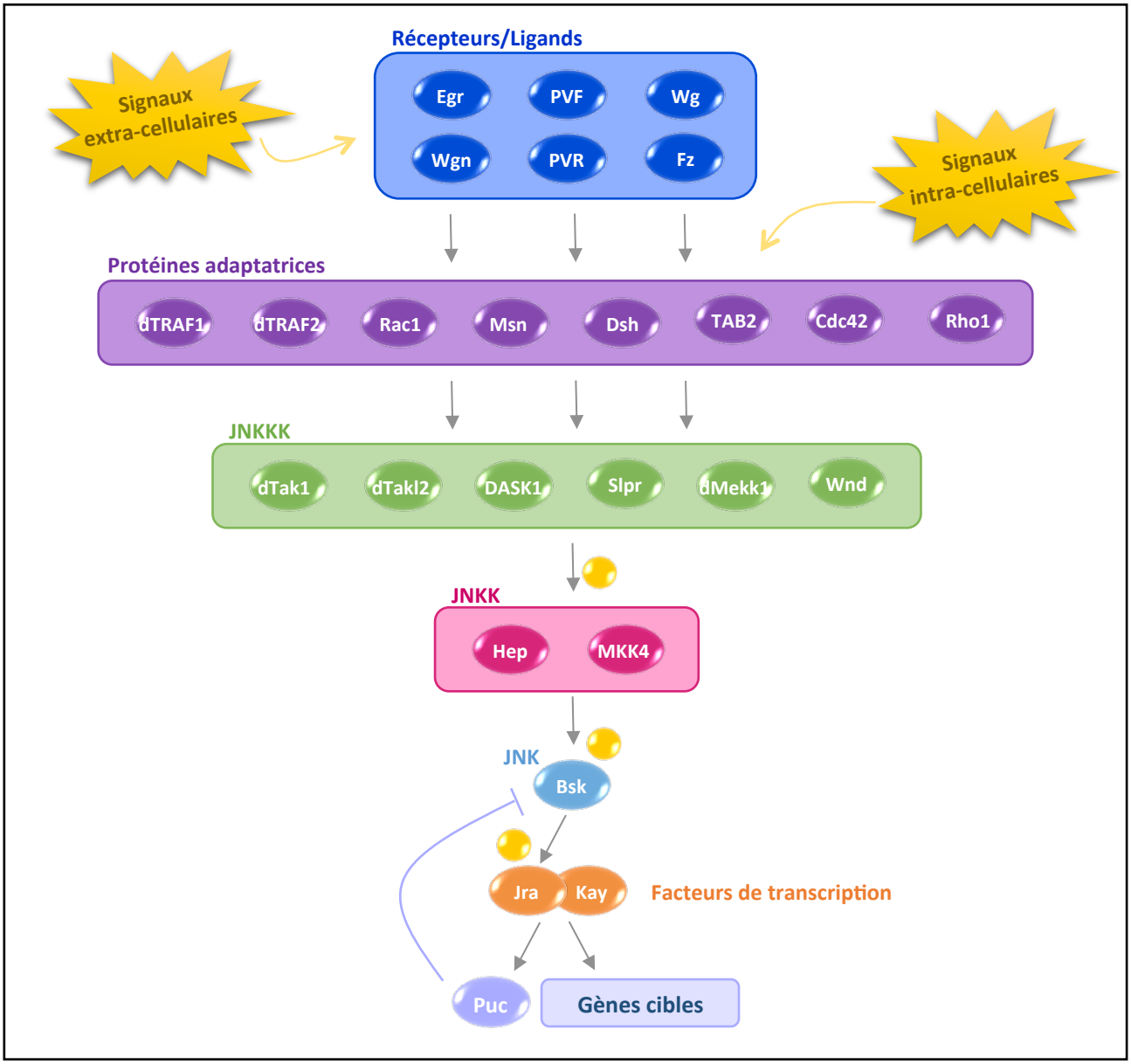
La voie JNK peut être activée par une grande variété de stimuli intrinsèques ou environnementaux (**Figure 32**). On peut citer par exemple les dommages à l'ADN, la présence d'espèces activées de l'oxygène, la chaleur ou encore la présence d'antigènes bactériens ou de cytokines inflammatoires. L'activation de la voie JNK peut conduire à une grande diversité de réponses. Une activation de cette voie peut notamment conduire à l'induction d'apoptose ou au contraire stimuler la prolifération cellulaire. Du fait de cette pléiotropie, la voie JNK joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques (Igaki, 2009) tels que la morphogenèse des tissus (Harden, 2002; Noselli and Agnes, 1999), la cicatrisation des blessures (Galko and Krasnow, 2004), la réponse immunitaire (Kleino and Silverman, 2014), la longévité (Biteau *et al.*, 2011), la régénération des cellules souches (Biteau *et al.*, 2008) ou encore la croissance tumorale (Igaki *et al.*, 2006). De façon cohérente avec l'importance de la signalisation JNK dans la réponse cellulaire au stress, sa mauvaise régulation a été impliquée dans une grande variété de pathologies dont les maladies neurodégénératives et les cancers (Sabapathy, 2012; Weston and Davis, 2002).

b) Les acteurs de la voie JNK chez la drosophile

La signalisation JNK correspond à une cascade de phosphorylations permettant *in fine* l'activation de la kinase JNK. Chez la drosophile, il existe une seule protéine JNK nommée Basket (Bsk). Bsk est le substrat de la kinase Hemipterous (Hep, une JNKK (JNK kinase)). Bsk peut également être phosphorylé par la JNKK Mkk4 (MAP kinase kinase 4) mais ce type d'activation est restreint à certains cas particuliers comme par exemple l'activation de la voie par l'intermédiaire du couple récepteur/ligand Eiger (eda-like cell death trigger)/Wengen (Geuking *et al.*, 2005).

La cascade Hep-Bsk peut être activée par les 6 JNKKKs (JNKK kinase) de drosophile (**Figure 33**) : dTak1 (drosophila TGF-β activated kinase 1), dTakl2 (drosophila Tak1-like 2), DASK1 (drosophila Apoptosis signal-regulating kinase 1), Slipper (Slpr) et dMekk1 (drosophila MEK kinase 1) et Wallenda (Wnd). Ces JNKKKs peuvent elles-mêmes être régulées par diverses protéines adaptatrices, à savoir par des petites GTPases telles que Rac1, Rho1 (Ras homologous 1) et Cdc42 (Cell division cycle 42), par des kinases comme Misshapen (Msn) ou encore par des protéines d'échafaudage comme les facteurs dTRAF1 et dTRAF2 (TNF receptor-associated factors) de la famille du TNF (tumor necrosis factor). Chaque module de signalisation JNK qui correspond à la combinaison de l'une de ces protéines adaptatrices associée à une JNKKK, et de la cascade Hep-Bsk, peut être activé par différents couples de récepteur/ligand à savoir Eiger/Wengen (homologue de TNF/TNFR), PVF (PDGF- and VEGF-related factor)/PVR (PDGF- and VEGF-receptor related) (homologue de PDGF/PDGFR) et Wingless (Wg)/Fz(Frizzled) (Igaki, 2009; Rios-Barrera and Riesgo-Escovar, 2013).

L'activation de la signalisation JNK conduit à la phosphorylation par Bsk du facteur de transcription Jra (Jun-related antigen, homologue de Jun) au niveau de résidus sérines et thréonines situés dans la région



<u>Figure n°33</u> : La voie JNK chez la drosophile

La voie de signalisation JNK peut être activée chez la drosophile par différents couples de récepteurs/ligands (en bleu) à la surface de la cellule. Des protéines adaptatrices (en violet) relaient le signal en activant une ou plusieurs JNKKKs (en vert). Les protéines adaptatrices répondent également à des signaux intra-cellulaires. Ces JNKKKs activent à leur tour par phosphorylation les JNKKs (en rose) ce qui aboutit à l'activation du facteur de transcription Jra par la JNK Bsk. Sous sa forme phosphorylée, Jra interagit avec Kay et ensemble ils régulent la transcription de différents gènes cibles. L'activation transcriptionnelle de *puc* permet la mise en place d'un rétrocontrôle négatif de la voie : Puc déphosphoryle Bsk et donc l'inactive. La combinaison entre les différents éléments de cette voie est déterminante pour la spécificité de la réponse.

Adapté de Igaki, 2009

N-terminale de la protéine. Cette phosphorylation permet l'association de Jra avec un autre facteur de transcription appelé Kay (Kayak, homologue de Fos) pour former le complexe AP-1 (Adaptor Protein complex-1). Ce complexe va moduler la transcription de différents gènes cibles. Ainsi, par le biais de phosphorylations séquentielles, la signalisation JNK peut engager rapidement un programme d'expression génique pour répondre de façon adaptée en fonction du stimulus d'origine. Jra n'est pas le seul substrat de Bsk, ce dernier peut phosphoryler une grande variété de substrats cytosoliques, ce qui diversifie encore plus les effets induits en réponse à une activation de la voie JNK.

La voie JNK est négativement régulée par Puckered (Puc) (McEwen and Peifer, 2005). Puc est une phosphatase qui inactive la voie en déphosphorylant Bsk. Le gène *puc* est également une cible transcriptionnelle du complexe AP-1, ce qui permet la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négative (Martin-Blanco *et al.*, 1998).

Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années concernant la compréhension des conséquences biologiques de l'activation de la voie JNK. Néanmoins, on ne connait pas encore précisément les mécanismes qui contrôlent les effets pléiotropes, et parfois même opposés, observés en réponse à l'activation de cette voie. La combinaison entre les différentes JNKK, JNKKK et les diverses protéines adaptatrices pourrait être responsable de la spécificité de réponse. Une hypothèse envisagée dans la littérature est que cette spécificité soit apportée, non pas par la combinaison des différents acteurs de la voie, mais par le choix de la JNKKK activée (Stronach, 2005).

c) Mode d'activation de la voie JNK dans le cas de processus apoptotiques

Diverses études indiquent que la voie JNK joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose que ce soit dans le cas d'une apoptose développementale ou en réponse à un stress cellulaire (Griswold *et al.*, 2008; Igaki, 2009; Lee *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007; McEwen and Peifer, 2005). Par exemple, la voie JNK est nécessaire à l'apoptose induite par des rayonnements γ. Plus précisément, il a été mis en évidence que la voie JNK est activée de façon dépendante de Dmp53 en réponse à ce type de stress. Dans ces conditions, une fois activée la voie JNK permet une activation transcriptionnelle de *rpr* (McEwen and Peifer, 2005). Par ailleurs, en réponse à des dommages à l'ADN causés par une exposition aux ultraviolets, la voie JNK active le complexe AP-1 et le facteur de transcription Foxo (Forkhead Box O) ce qui permet une augmentation de la transcription de *hid* (Luo *et al.*, 2007). A l'inverse, il a été mis en évidence que la voie JNK peut être requise en aval de Rpr. En effet, la mort cellulaire induite par Rpr peut être partiellement supprimée par une perte de fonction de *bsk*. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'activation de la voie JNK par Rpr a été élucidé. Diap1 poly-ubiquitine dTraf1 ce qui conduit à sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome. Rpr en favorisant l'ubiquitination et la dégradation de Diap1 permet indirectement une stabilisation de dTraf1 ce qui conduit à une activation de la voie d'apoptose DASK1-Hep-Bsk (**Figure 34**) (Kanda and Miura, 2004; Kuranaga *et al.*, 2002).

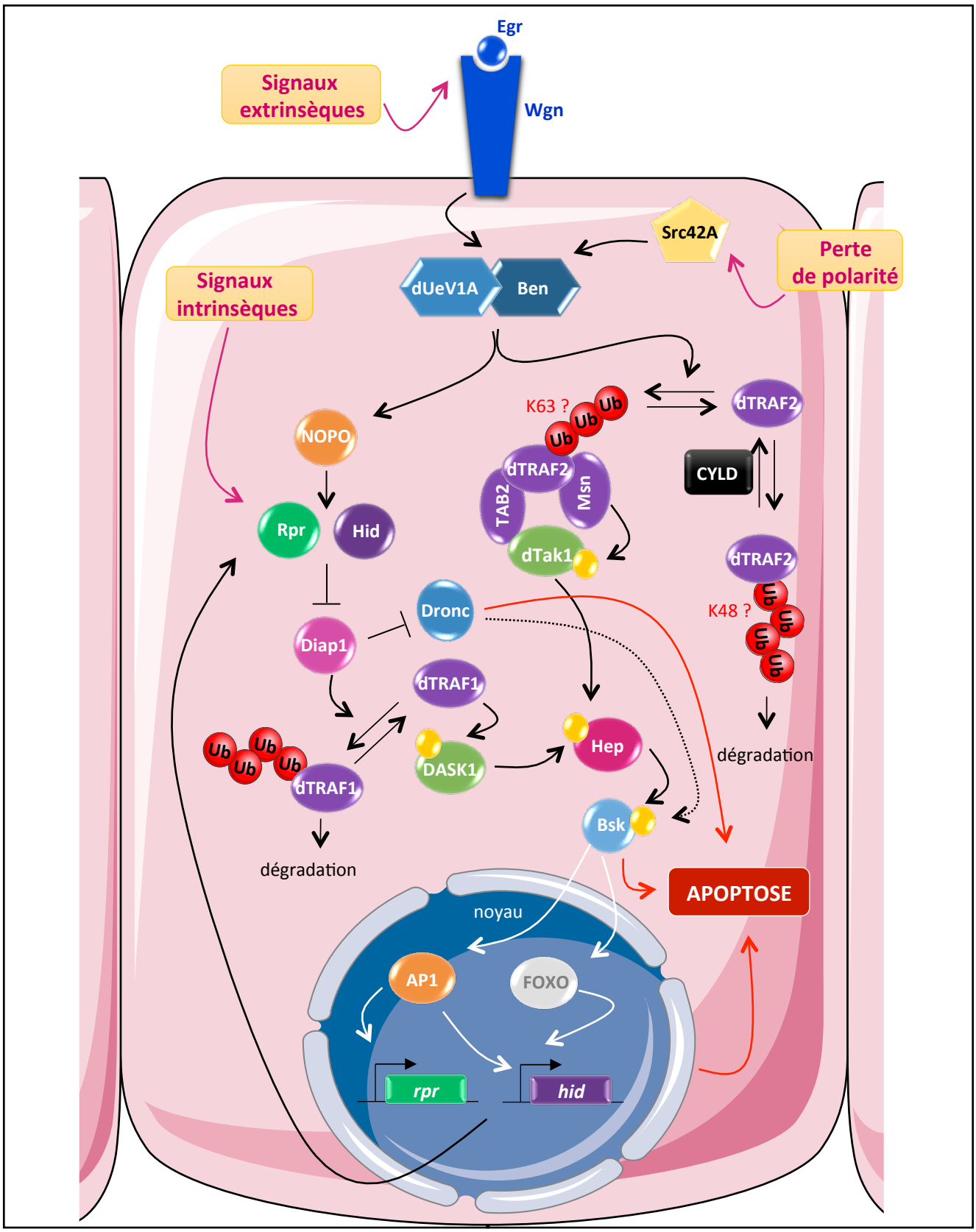


Figure n°34 : Mode d'activation de la voie JNK dans le cas de processus apoptotiques chez la drosophile

Une activation de la voie JNK, survenant en réponse à divers stimuli, peut conduire à de l'apoptose. Le complexe dUeV1a-Ben joue un rôle crucial dans l'induction d'apoptose en agissant en aval du complexe Egr/ Wgn qui répond à des signaux extracellulaires et en aval de la protéine Src42A qui, elle, répond à une perte de polarité cellulaire. dUeV1a-Ben permet, d'une part, d'activer dTraf2 en stimulant sa poly-ubiquitination (sans doute de type K63) ce qui active la signalisation dTak1-Hep-Bsk et, d'autre part, active la machinerie de mort cellulaire *via* la protéine NOPO. Les RHG en favorisant la dégradation de Diap1 permettent indirectement la stabilisation de dTRAF1 et donc l'activation de la signalisation DASK1-Hep-Bsk. Bsk active différents facteurs de transcription et ainsi favorise *via* Rpr et Hid la dégradation de Diap1. Dronc peut également induire l'activation de la voie JNK mais le mécanisme reste inconnu.

La plupart de nos connaissances concernant le mode d'activation de la voie JNK dans le cas de processus apoptotiques provient de l'étude de la voie Eiger (Egr)/Wengen (Wgn) (**Figure 34**) (Igaki and Miura, 2014). L'expression ectopique d'*egr in vivo* au cours du développement ou dans des cellules de drosophile en culture induit massivement de la mort cellulaire (Igaki *et al.*, 2002a; Kanda *et al.*, 2002; Kauppila *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2002). Wgn est requis pour cette induction de mort cellulaire (Kanda *et al.*, 2002; Kauppila *et al.*, 2003). Des études génétiques et biochimiques ont permis de mettre en évidence que la mort induite par Egr/Wgn nécessite la signalisation Msn-dTak1-Bsk (Igaki *et al.*, 2002a; Moreno *et al.*, 2002). Par la suite, une implication de dTraf2 et TAB2 dans cette voie de mort a été démontrée. Ces deux protéines serviraient d'adaptateurs pour regrouper au sein d'un même complexe Msn et dTak1. Au sein de ce complexe Msn activerait dTak1 (Geuking *et al.*, 2005).

Des données récentes détaillent un peu plus la régulation de la voie de signalisation en aval du couple Egr/Wgn (**Figure 34**). Il a été mis en évidence que l'expression d'*eiger* stimule la polyubiquitination de dTraf2 sans modifier la stabilité de la protéine (Ma *et al.*, 2014). Cela suggère que la polyubiquitination de dTraf2 induite par Eiger ne déclenche pas la dégradation de dTraf2 par le protéasome. Il a été proposé que cette polyubiquitination serve de signal pour recruter et/ou activer les membres de la voie JNK en aval de dTraf2, comme c'est le cas pour son homologue Traf2 chez les mammifères (Shi and Kehrl, 2003). Une étude génétique et moléculaire a démontré que Bendless (Ben), une enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine, est requise pour la mort cellulaire induite par l'expression ectopique d'*eiger*. Dans la voie de signalisation, Ben agit en aval de Wengen. Il interagit physiquement avec dTraf2 et est nécessaire pour la polyubiquitination de dTraf2 induite par Egr (Ma *et al.*, 2014). La perte de fonction de *dUev1a (Ubiquitin-conjugating enzyme variant 1A)*, qui code pour un variant de conjugaison de l'ubiquitine, sauve du phénotype d'œil réduit induit par l'expression ectopique d'*egr*. Ben et dUev1a interagissent pour former un complexe E2 hétérodimèrique et coopèrent en aval d'Eiger pour activer la voie JNK via dTraf2 (Ma *et al.*, 2013b).

L'enzyme de déubiquitination dCYLD (drosophila cylindromatosis ortholog) est également requise pour la mort cellulaire induite par Eiger. Une perte de fonction de dCYLD conduit à une diminution du niveau protéique de dTraf2 associée à une augmentation des formes ubiquitinées de dTraf2 (Simonson *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007). dCYLD favorise donc la mort induite par Egr en stabilisant la protéine dTraf2. L'ensemble de ces données suggèrent que l'ubiquitination de dTraf2 peut avoir différentes conséquences. On peut envisager que dTraf2 soit la cible de deux types d'ubiquitination : une poly-ubiquitination de type K48 et de type K63. dTraf2 liée à une chaine de poly-ubiquitine K48 serait adressée au protéasome. Cette poly-ubiquitination K48 pourrait être éliminée par dCYLD mais l'enzyme E3 ubiquitine ligase responsable de cette ubiquitination reste à identifier. La poly-ubiquitination K63 de dTraf2 par le complexe dUev1a/Ben ne conduirait pas à sa dégradation mais au contraire permettrait d'activer la voie de signalisation JNK en aval de dTraf2.

Il est intéressant de noter que la protéine Src42A, une tyrosine kinase non-membranaire, module la mort cellulaire dépendante de la voie JNK en amont de Ben et dUev1a (**Figure 34**) (Ma *et al.*, 2013a). Src42A serait notamment important pour induire la mort des cellules *via* la voie JNK en réponse à une perte de polarité

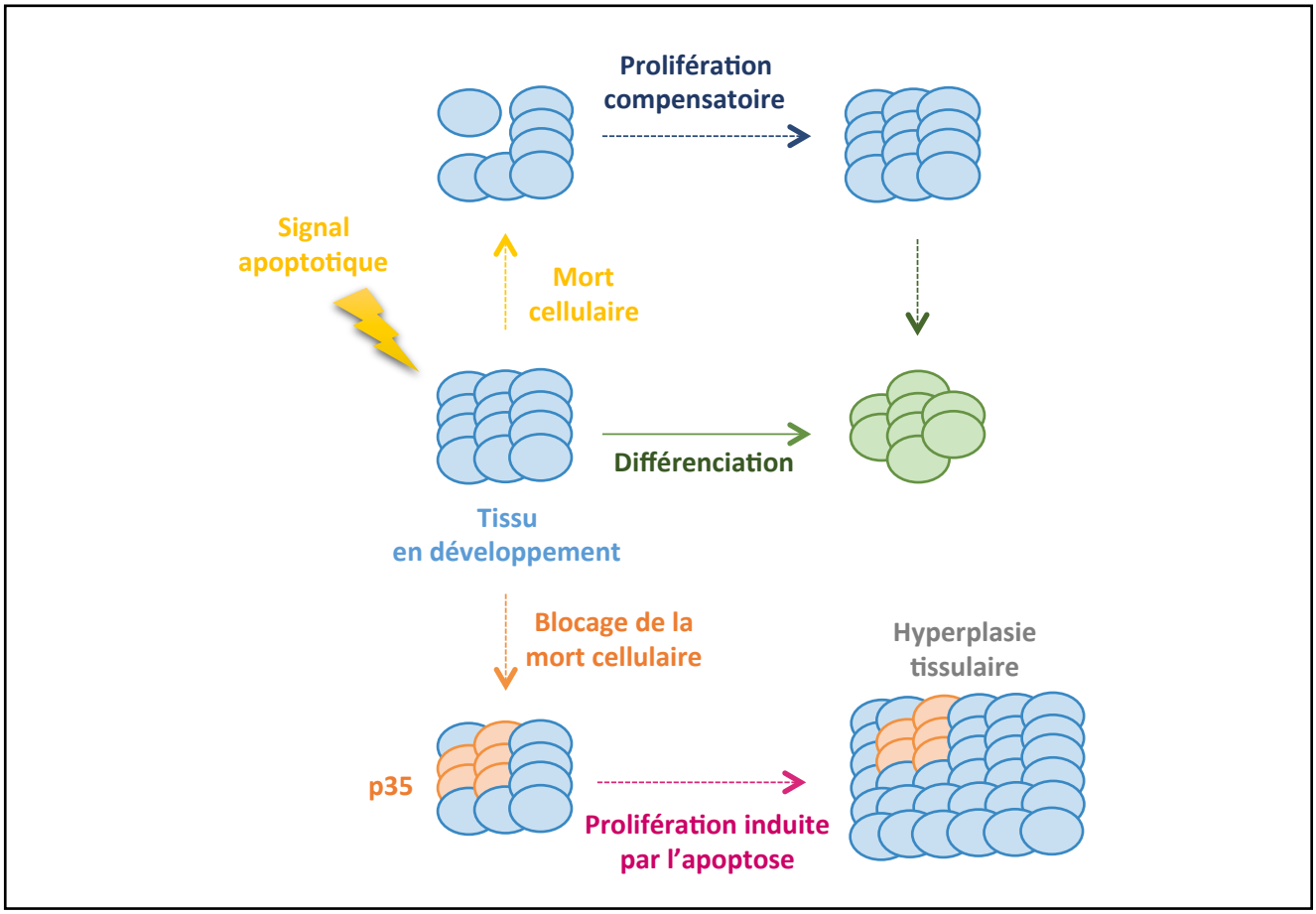
cellulaire. Par conséquent le complexe dUev1a/Ben joue un rôle crucial dans l'induction d'apoptose dépendante de la voie JNK que ce soit en réponse à des signaux extracellulaires intégrés par Egr/Wgn ou suite à une altération de la polarité cellulaire.

Cette activité pro-apoptotique de la voie JNK n'est pas restreinte à la drosophile, elle a également été observé à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des systèmes de mammifères (Davis, 2000; Dhanasekaran and Reddy, 2008; Weston and Davis, 2002; Weston and Davis, 2007).

Par ailleurs, la mort induite par Eiger ne dépend pas exclusivement de la voie JNK. En effet, il existe deux voies de mort indépendantes en aval du complexe dUev1a/Ben : l'une dépend de la voie JNK et implique dTraf2 comme décrit précédemment alors que l'autre implique la protéine NOPO (No poles) (Ma *et al.*, 2012). NOPO est une E3 ubiquitine ligase requise pour l'activation transcriptionnelle de *rpr* et *hid* induite par Eiger. Il y a donc une voie de mort caspase dépendante mais JNK indépendante en aval d'Eiger.

C. Effets des cellules apoptotiques sur le tissu environnant : focus sur la prolifération induite par l'apoptose

L'apoptose est traditionnellement présentée comme une mort cellulaire silencieuse car elle ne déclenche pas de réponse inflammatoire. En réalité, chez la drosophile, la présence de cellules apoptotiques a de nombreuses conséquences sur le tissu environnant, et est donc loin d'être silencieuse. En effet, la présence de cellules apoptotiques peut occasionner la prolifération des cellules voisines (Martin *et al.*, 2009; Mollereau *et al.*, 2013) ou au contraire induire un arrêt de prolifération des cellules du compartiment adjacent (Mesquita *et al.*, 2010; Robinson, 2010). Une apoptose des cellules environnantes a également été observée en réponse à la présence de cellules apoptotiques (Morata and Herrera, 2013; Perez-Garijo *et al.*, 2013). A l'inverse, il a été rapporté que les cellules à proximité des cellules apoptotiques sont plus résistantes à l'apoptose induite par irradiation (Bilak *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'apoptose peut avoir des conséquences au niveau systémique en induisant un retard de développement (Demay *et al.*, 2014; Halme *et al.*, 2010; Mirth and Shingleton, 2012). En outre dans les cellules post-mitotiques, une croissance cellulaire hypertrophique peut contribuer à la réparation des tissus (Tamori and Deng, 2014). L'ensemble de ces mécanismes permet de maintenir l'homéostasie tissulaire au cours du développement et semble impliqué dans l'apparition des tumeurs. J'ai choisi de m'intéresser ici uniquement à la prolifération induite par l'apoptose (AiP pour Apoptosis-induced Proliferation) en détaillant le mécanisme moléculaire chez la drosophile et son implication dans la tumorigenèse chez l'Homme.



<u>Figure n°35</u> : Prolifération compensatoire et prolifération induite par l'apoptose.
Si des cellules d'un tissu en développement sont éliminées par apoptose en réponse à un stimulus, un mécanisme se met en place pour maintenir l'homéostasie tissulaire : les cellules voisines des cellules apoptotiques prolifèrent. Cette prolifération induite par l'apoptose (AiP) permet de compenser la perte cellulaire. On parle de prolifération compensatoire. A l'issue de ce processus, le tissu retrouve une taille correcte et se différencie normalement.
Des cellules « undead » peuvent être générées par un blocage de l'exécution du programme de mort en bloquant les caspases *via* l'inhibiteur p35. Les cellules « undead » ne sont pas éliminées du tissu, elles sécrètent en permanence des signaux induisant la prolifération des cellules voisines. Du fait de la persistance des cellules « undead » et de la permanence des signaux mitogéniques, cette AiP conduit à une hyperplasie tissulaire.
Adapté de Fan and Bergmann, 2008a

1. Définition du processus de prolifération compensatoire

Les tissus des animaux en développement ont une étonnante capacité de régénération. L'irradiation de larves de drosophile de troisième stade conduit à l'élimination par apoptose de 40 à 60% des cellules du disque imaginal d'aile. De façon intéressante, à l'issue du développement, en dépit de cette apoptose massive, les adultes présentent des ailes normales (Haynie and Bryant, 1977). La perte des cellules est en fait compensée par une augmentation de la prolifération des cellules saines environnantes. Ce processus, par lequel un tissu endommagé restaure sa taille originelle, est appelé prolifération compensatoire (**Figure 35**) (Mollereau *et al.*, 2013). L'expression, dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile, d'une toxine de plante qui inhibe la synthèse protéique conduit, d'une part, à l'élimination de certaines cellules de ce compartiment et d'autre part, à une augmentation de la prolifération qui est observée dans cette même région postérieure (Milan *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que des facteurs mitogéniques sont produits dans cette région. Une hypothèse envisagée est que les cellules apoptotiques soient elles-mêmes la source de la production et de la sécrétion de ces facteurs favorisant la prolifération. Toutefois, les cellules apoptotiques étant rapidement éliminées du tissu, il est techniquement difficile de tester cette hypothèse. Des cellules « undead » ont donc été générées pour tenter de répondre à cette question.

2. Cellules « undead » : un outil pour caractériser la prolifération induite par l'apoptose

Les cellules « undead » sont des cellules au sein desquelles le processus de mort cellulaire a été initié mais qui sont maintenues en vie du fait d'un blocage de l'exécution du programme de mort (Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Perez-Garijo *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2005; Ryoo *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2006). Cela est par exemple rendu possible par l'expression de l'inhibiteur de caspase *p35*. Au sein de ces cellules « undead », la totalité de la cascade apoptotique est activée, à l'exception des caspases effectrices Drice et Dcp1 qui sont bloquées. Cette activation de la cascade apoptotique est théoriquement maintenue indéfiniment. De façon intéressante, la présence de cellules « undead » conduit à un phénotype d'hyperplasie tissulaire ce qui suggère un accroissement de la prolifération cellulaire en réponse à ce type particulier de cellules apoptotiques (**Figure 36**) (Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Perez-Garijo *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2005; Ryoo *et al.*, 2004).

Les cellules « undead » ont été très largement utilisées chez la drosophile pour tenter d'élucider les bases moléculaires du processus de prolifération compensatoire. Toutefois, les cellules « undead » n'étant pas éliminées du tissu, il n'y a pas, dans ces conditions expérimentales, à proprement parler, de compensation des cellules perdues. On ne peut donc pas parler de prolifération compensatoire, on utilise plutôt le terme AiP pour faire référence à ce phénomène au cours duquel les cellules apoptotiques (ici les cellules « undead ») favorisent la prolifération des cellules saines environnantes (**Figure 35**) (Mollereau *et al.*, 2013).

Il a été mis en évidence que les cellules « undead » expriment ectopiquement les morphogènes *wingless* (*wg*) et *decapentaplegic* (*dpp*) (Fan *et al.*, 2014; Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Perez-Garijo *et al.*, 2004;

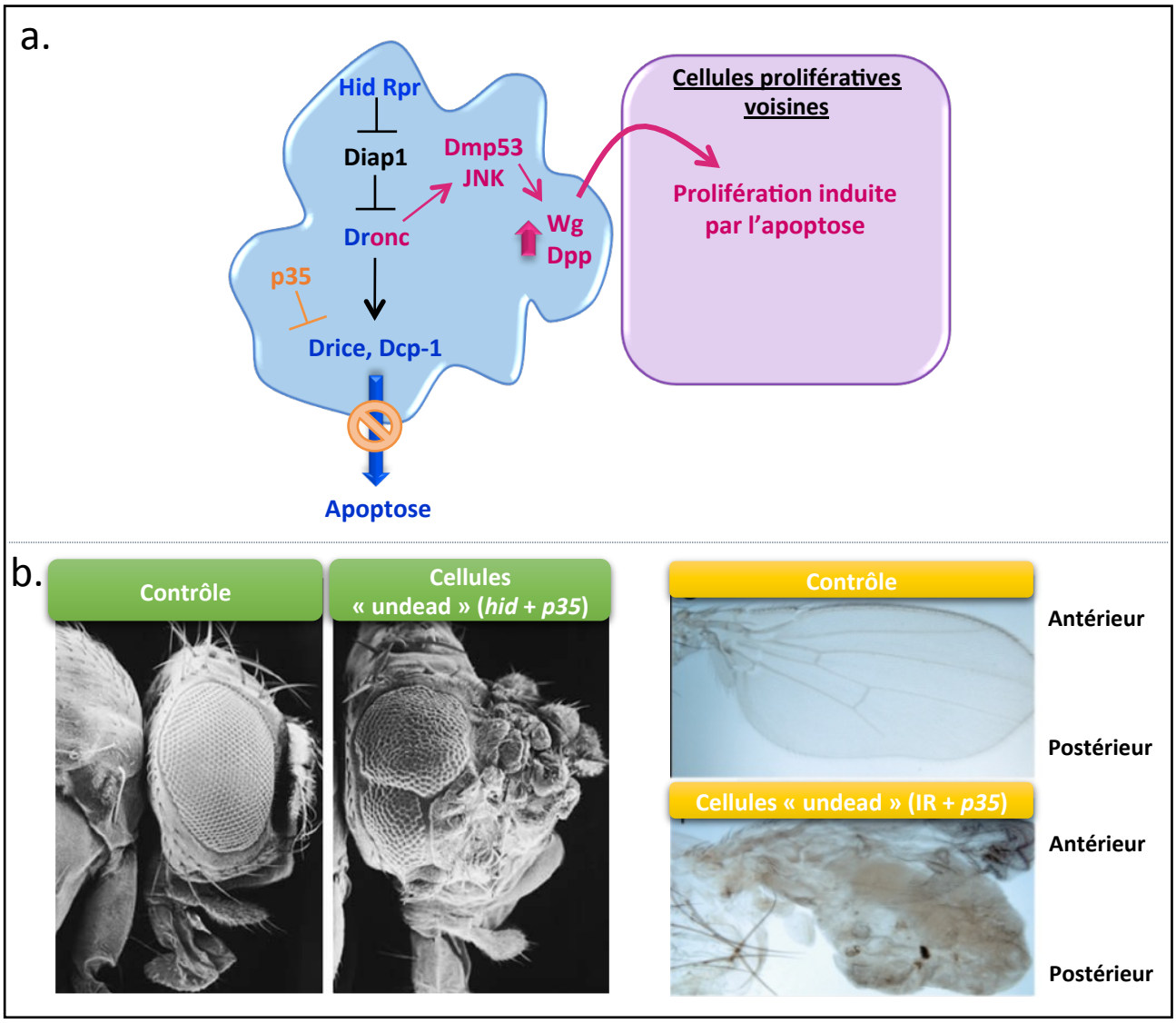


Figure n°36 : Mécanisme d'AiP en présence de cellules « undead » dans un tissu prolifératif

(a) En présence de p35, l'induction d'apoptose active la machinerie de mort cellulaire (en bleu) mais les cellules ne meurent pas, du fait d'une inhibition des caspases effectrices. Ainsi, l'induction d'apoptose, en présence de p35, génère des cellules « undead ». Dans ces cellules « undead », Dmp53 et la voie JNK sont activées de façon dépendante de Dronc. La voie JNK et Dmp53 permettent l'expression et la sécrétion des facteurs mitogéniques Wg et Dpp ce qui déclenche la prolifération des cellules voisines. Une signalisation (en rose) se met donc en place pour déclencher l'AiP. Du fait de la persistance des cellules « undead » et de la permanence des signaux mitogéniques cette AiP conduit à une hyperplasie tissulaire.
Adapté de Kashio *et al.* 2014, Ryoo and Bergmann, 2012 et Fan and Bergmann, 2008a

(b) Exemples de phénotypes d'hyperplasie tissulaire observés, chez l'adulte, après induction de mort cellulaire dans un tissu prolifératif au stade larvaire en présence de p35. Dans l'exemple présenté à gauche, la mort cellulaire a été induite dans les cellules prolifératives du disque imaginal d'œil par l'expression ectopique de *hid*. *p35* est exprimé par toutes les cellules qui expriment *hid*. Dans l'exemple présenté à droite, la mort cellulaire est induite par irradiation (IR) dans des disques imaginaux d'aile. La mort est bloquée par l'expression de *p35* uniquement dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile.
Issus de Ryoo and Bergmann 2012 et Pérez-Garijo *et al.*, 2004

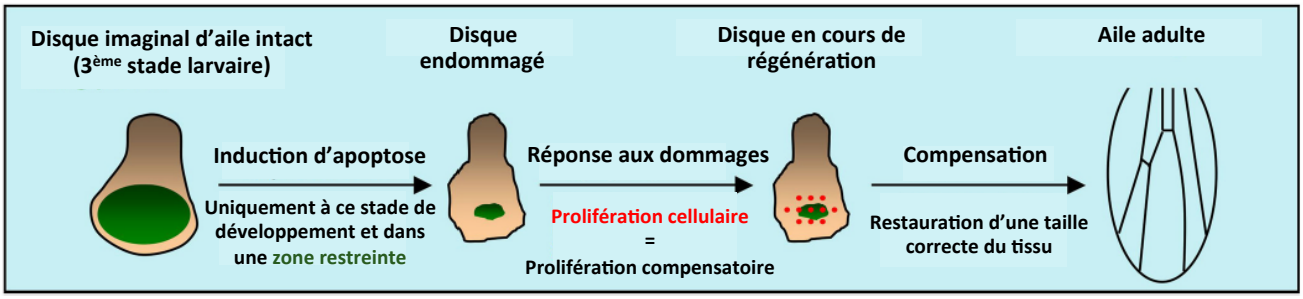
Ryoo *et al.*, 2004). De façon intéressante, la perte de fonction de *wg* ou *dpp* réduit fortement la surprolifération des cellules voisines des cellules « undead » ainsi que le phénotype d'hyperplasie tissulaire associé (Perez-Garijo *et al.*, 2005; Perez-Garijo *et al.*, 2009; Ryoo *et al.*, 2004). Ainsi, les cellules « undead » en produisant ectopiquement et de façon continue ces deux morphogènes stimulent, par un mécanisme non-autonome cellulaire, la prolifération des cellules adjacentes ce qui conduit à une hyperplasie du disque imaginal et du tissu adulte correspondant (Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Morata *et al.*, 2011; Perez-Garijo *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2005; Ryoo *et al.*, 2004). Bien qu'elle soit plus difficilement observable, une expression ectopique de *wg* et *dpp* survient également dans les cellules apoptotiques normales (Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004).

Différentes études ont permis de mettre en évidence que la caspase initiatrice Dronc et le facteur de transcription Dmp53 assurent une fonction non-apoptotique au sein des cellules « undead » : ils sont requis pour la production de mitogènes pendant l'AiP et l'hyperplasie tissulaire qui lui est associée (Fan *et al.*, 2014; Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Wells and Johnston, 2012; Wells *et al.*, 2006). Par ailleurs, la voie de signalisation JNK est activée dans les cellules «undead » et est requise pour la production ectopique de *wg* et *dpp* et pour l'AiP provoquée par la présence de cellules « undead » (**Figure 36**) (Perez-Garijo *et al.*, 2009; Ryoo *et al.*, 2004; Suissa *et al.*, 2011; Warner *et al.*, 2010).

Il est intéressant de noter que les cellules « undead » présentes dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile ont la capacité de migrer et d'envahir le compartiment antérieur (Perez-Garijo *et al.*, 2004). Bien qu'elles transgressent la frontière antéro-postérieure, les cellules « undead » conservent leur identité postérieure et ne se mélangent pas avec les cellules antérieures (Martin *et al.*, 2009; Morata *et al.*, 2011). Cette capacité des cellules « undead » à migrer est conférée par la persistance d'une activation de la voie JNK dans ces cellules (Morata *et al.*, 2011). De même, il est envisagé que l'expression ectopique de *dpp* et *wg* observée dans les cellules « undead » ou dans les cellules apoptotiques normales soit un effet secondaire de l'activation de la voie JNK et non une conséquence directe de l'apoptose (Morata *et al.*, 2011; Perez-Garijo *et al.*, 2009) .

3. Modèles de prolifération induite par l'apoptose n'utilisant pas p35

Au-delà de l'utilisation des cellules « undead », d'autres approches ont été utilisées pour étudier la prolifération compensatoire chez la drosophile. En combinant l'utilisation du système d'induction conditionnelle UAS-Gal4 et son inhibiteur thermosensible $Gal80^{ts}$, on peut facilement induire la mort cellulaire en exprimant ectopiquement un gène pro-apoptotique dans un domaine donné du disque imaginal d'aile uniquement pendant un lapse de temps limité (Bergantinos *et al.*, 2010a; Fan *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2013; Nachtrab and Poss, 2009; Smith-Bolton *et al.*, 2009; Sun and Irvine, 2011). Ainsi, la mort cellulaire survient précocement au cours du $3^{ème}$ stade larvaire et des mécanismes de compensation, notamment de prolifération compensatoire, peuvent se mettre en place pendant tout ce stade de développement jusqu'à la formation de la pupe (Halme *et al.*, 2010;



<u>Figure n°37</u> : Une induction spatio-temporellement restreinte d'apoptose pour étudier le mécanisme de prolifération compensatoire.

En utilisant les outils génétiques disponibles chez la drosophile, on peut aisément induire l'apoptose à un stade de développement donné (début du 3ème stade larvaire) et dans une zone restreinte du disque imaginal d'aile (ici la poche du disque en vert). Une prolifération en réponse à cette mort cellulaire peut se mettre en place jusqu'à la fin du 3ème stade larvaire pour compenser cette perte de tissu. Cette prolifération compensatoire permet de restaurer une taille correcte du tissu. Ainsi, l'aile adulte obtenue est semblable à une aile contrôle.

Adapté de Nachtrab and Poss 2009

Nachtrab and Poss, 2009; Smith-Bolton *et al.*, 2009). Du fait de cette compensation, les tissus adultes ne présentent pas d'altération en dépit de l'apoptose massive induite au stade larvaire (**Figure 37**).

L'utilisation de ces modèles d'apoptose temporellement et localement restreinte a permis de mettre en évidence que la présence de cellules apoptotiques « authentiques » induit bien un accroissement de la prolifération. Cette augmentation de la prolifération survient, dans un premier temps, à proximité des cellules apoptotiques puis cette augmentation peut être observée à une plus grande distance de la région contenant les cellules en train de mourir (Bergantinos *et al.*, 2010a; Smith-Bolton *et al.*, 2009). A l'inverse, l'équipe de Ginés Morata a observé une réponse proliférative systémique (le taux de prolifération est augmenté dans tout le disque imaginal d'aile) associée à une migration des cellules pour recoloniser le domaine endommagé (Herrera *et al.*, 2013). Cette différence de réponse à la présence de cellules apoptotiques pourrait être due à l'inducteur de mort utilisé ou à la taille et la localisation de la zone endommagée. Quoiqu'il en soit, cette modification du niveau de prolifération s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette au sein des cellules vivantes bordant le domaine dans lequel les cellules meurent. Ceci permet le maintien de la structure de l'épithélium au cours de l'élimination des cellules apoptotiques (Bergantinos *et al.*, 2010a).

Ces modèles de prolifération induite par une apoptose temporellement et localement restreinte ont été utilisés pour étudier le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette augmentation du taux de prolifération. Les études réalisées s'accordent sur le fait que la voie de signalisation JNK est requise pour l'AiP dans ces modèles (Bergantinos *et al.*, 2010a; Fan *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2013; Sun and Irvine, 2011). Toutefois, selon l'étude considérée, la voie JNK peut être activée à la fois dans les cellules apoptotiques et dans les cellules vivantes voisines ou exclusivement dans les cellules voisines (Bergantinos *et al.*, 2010a; Fan *et al.*, 2014). En dépit de ce rôle crucial de la voie JNK, on ne sait pas encore aujourd'hui précisément comment la voie JNK est activée et quels sont les membres de la voie impliqués dans cette prolifération compensatoire.

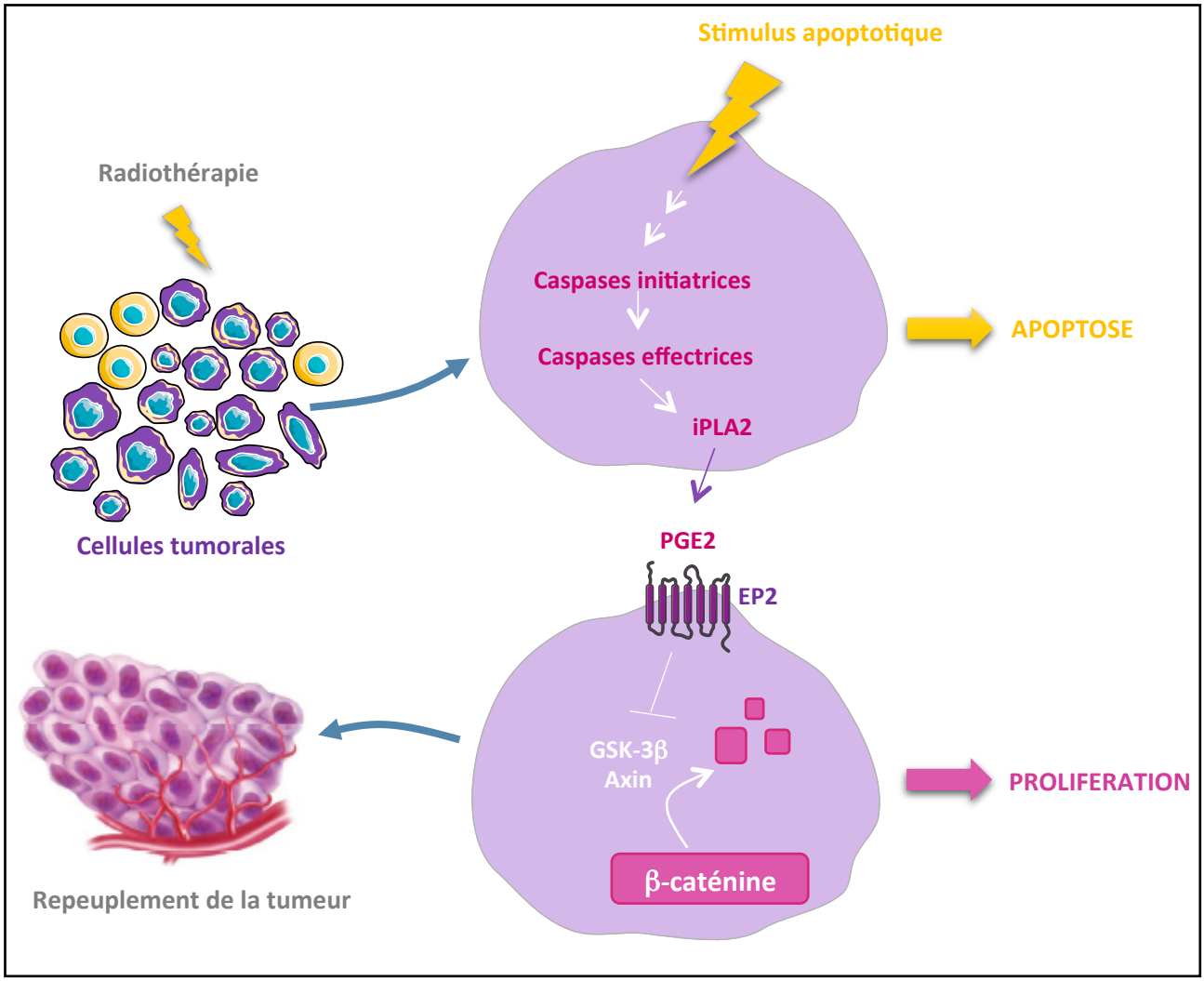
Comme décrit précédemment, la sécrétion de Wg et Dpp par les cellules apoptotiques n'est pas une caractéristique propre des cellules « undead », mais survient également dans des cellules apoptotiques classiques (Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004; Smith-Bolton *et al.*, 2009). Cette donnée suggère que l'AiP induite par ces morphogènes pourrait avoir un rôle important dans la prolifération compensatoire. Toutefois, bien que ces deux morphogènes soient produits dans les cellules apoptotiques, diverses données indiquent qu'ils ne sont pas requis pour la prolifération compensatoire (Herrera *et al.*, 2013; Perez-Garijo *et al.*, 2009). En effet, cette prolifération survient tout de même dans un contexte mutant pour l'un ou l'autre des morphogènes (Herrera *et al.*, 2013; Perez-Garijo *et al.*, 2009). De même, la perte de fonction conjointe des deux morphogènes n'altère pas ce processus de compensation (Perez-Garijo *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans le cas de la mort induite transitoirement et localement au sein du disque imaginal d'aile par la surexpression d'*eiger* ou de *rpr*, *wg* est exprimé dans les cellules en prolifération mais pas dans les cellules en train de mourir (Smith-Bolton et al. 2009). En outre, aucune modification du profil d'expression de *wg* et *dpp* n'est observée dans le cas de la mort induite transitoirement par *hid* (Herrera *et al.*, 2013). Par conséquent, Wg et Dpp ne semblent pas indispensables pour

le phénomène de prolifération compensatoire. Le signal provenant des cellules apoptotiques et permettant la prolifération compensatoire reste donc à identifier.

Une étude suggère que ce signal serait fourni par une altération, au sein des cellules apoptotiques, de la localisation des protéines de polarité Par. Cette altération induit l'activation de la voie JNK et conduit à la prolifération des cellules environnantes (Warner and Longmore, 2010; Warner *et al.*, 2010). On ne sait pas encore aujourd'hui précisément comment la voie JNK induit cette prolifération compensatoire. Toutefois, il existe des données dans la littérature permettant d'envisager plusieurs modes d'action possibles. En effet, il a été mis en évidence que l'induction d'apoptose stimule l'activation du facteur de transcription Yorkie dans les cellules saines environnantes où Yorkie est requis pour le processus de compensation (Sun and Irvine, 2011). Cette activation dépend de la voie JNK mais pas de la caspase Dronc (Sun and Irvine, 2011). Plus précisément, il a été montré que la protéine Jub (Ajuba LIM protein), connue pour lier physiquement Warts et l'inhiber est requis pour l'activation de Yorkie dépendante de la voie JNK (Du Toit, 2013; Sun and Irvine, 2013). Une autre étude réalisée récemment indique que la voie EGFR est importante pour l'AiP et que son activation survient en aval de la voie JNK (Fan *et al.*, 2014). Ils envisagent donc un modèle où Spitz serait produit en réponse à la voie JNK dans les cellules apoptotiques, puis ce ligand serait secrété ce qui permettrait d'activer la voie EGFR dans les cellules adjacentes puis de déclencher la prolifération compensatoire (Fan *et al.*, 2014) .

Par ailleurs, des données récentes indiquent que Dmp53 pourrait avoir un rôle dans la prolifération compensatoire. Il existe deux isoformes de Dmp53 : la forme longue (Dmp53) et une forme tronquée en N-terminal (DΔNp53). L'expression ectopique de DΔNp53 induit de l'apoptose, accroit l'expression de *wg* et augmente le taux de prolifération cellulaire (Dichtel-Danjoy *et al.*, 2013). Cette prolifération induite par DΔNp53 dépend de *Notch* (N). De façon intéressante, il existe des sites putatifs pour Dmp53 en amont de *N*. Ces données suggèrent que l'isoforme DΔNp53 pourrait contrôler l'AiP via la régulation transcriptionnelle de *N* (Simon *et al.*, 2014).

Ce mécanisme de prolifération compensatoire n'est pas restreint aux tissus prolifératifs. En effet, une prolifération compensatoire peut être observée, en réponse à l'apoptose, dans un tissu en cours de différenciation. Lorsque *hid* est exprimé ectopiquement sous contrôle du promoteur GMR, une prolifération ectopique est observée en postérieur du sillon morphogénétique dans une région où les cellules ont normalement arrêté de proliférer (Srivastava *et al.*, 2007). Une activation du morphogène Hedgehog (Hh) a été observée dans les cellules en train de mourir en postérieur du sillon morphogénétique. Cette activation est dépendante des caspases effectrices Drice et Dcp1 (Fan and Bergmann, 2008a; Fan and Bergmann, 2008b). Hh permet le retour, dans le cycle cellulaire, des cellules post-mitotiques voisines qui ne sont pas encore différenciées en photorécepteurs, et ainsi favorise la prolifération (Fan and Bergmann, 2008a; Fan and Bergmann, 2008b).



<u>Figure n°38</u> : La radiothérapie peut avoir des conséquences délétères du fait de l'existence d'un mécanisme d'AiP des cellules tumorales

La radiothérapie génère des stimuli apoptotiques qui activent les caspases. Les caspases effectrices clivent différents substrats cellulaires dont iPLA2. Ce clivage induit une signalisation paracrine à l'origine d'un processus d'AiP. En effet, le clivage d'iPLA2 augmente son activité, ce qui entraine une augmentation du niveau de PGE2. PGE2 se lie à son récepteur EP2 présent à la surface des cellules tumorales voisines qui ont survécu à l'apoptose. Cela permet d'activer EP2 et conduit à une signalisation cellulaire aboutissant à la signalisation de la β-caténine et donc à la prolifération cellulaire. Cette AiP permet de repeupler la tumeur. La radiothérapie peut donc, du fait de cette AiP, être contre-productive et indirectement favoriser la croissance tumorale.

Adapté de Boland *et al.,* 2013, Jager and Fearnhead, 2012 et Huang *et al.* 2011.

4. Lien entre prolifération induite par l'apoptose et tumorigenèse

La radiothérapie est fréquemment utilisée chez l'Homme pour tenter d'éliminer par apoptose les cellules cancéreuses nocives pour l'organisme. Toutefois le bénéfice de ce traitement a été remis en cause (Huang *et al.*, 2011). En effet, il a été mis en évidence que l'apoptose induite par les radiations ionisantes active une voie de signalisation dans les cellules tumorales qui stimule la prolifération des cellules tumorales ayant survécu à l'irradiation (**Figure 38**) (Connell and Weichselbaum, 2011; Huang *et al.*, 2011). Cette AiP qui survient en réponse à la radiothérapie contribue donc au repeuplement de la tumeur (Connell and Weichselbaum, 2011; Huang *et al.*, 2011). La radiothérapie pourrait donc dans certains cas être inefficace et même contre-productive en stimulant la prolifération des cellules tumorales survivantes.

Le mécanisme moléculaire permettant l'AiP dans ce contexte tumoral a été en partie caractérisé (Boland *et al.*, 2013a; Connell and Weichselbaum, 2011; Huang *et al.*, 2011; Jager and Fearnhead, 2012; Li *et al.*, 2010). L'activation de la caspase 3 dans les cellules tumorales est requise pour l'AiP (Huang *et al.*, 2011). De façon cohérente une déficience de la *caspase 3* rend les cellules tumorales plus sensibles à la radiothérapie (Huang *et al.*, 2011). Par ailleurs il est intéressant de noter qu'un niveau élevé de caspase 3 dans les cellules tumorales est associé à un mauvais pronostic pour le patient (Connell and Weichselbaum, 2011; Huang *et al.*, 2011). La caspase 3 stimule la synthèse d'une molécule de signalisation à savoir la prostaglandin E2 (PGE2). Il a été mis en évidence que la caspase 3 clive l'enzyme iPLA2 (Calcium-independent phospholipase A2) qui contribue à la production de PGE2 (Huang *et al.*, 2011). Ce clivage augmente l'activité catalytique de l'enzyme. Ainsi le traitement par radiothérapie augmente le taux de PGE2 de façon caspase 3 dépendante. Des données indiquent que la liaison de PGE2 à son récepteur couplé aux protéines G conduit à l'activation de la β caténine ce qui permettrait *in fine* la prolifération (Boland *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2010).

A la vue de l'ensemble de ces données, on comprend aisément que la compréhension du mécanisme d'AiP est importante pour améliorer les traitements par radiothérapie utilisés dans le cas de cancer.

Nom de la famille	Protéine de mammifères	Homologue chez la drosophile	Fonction(s) conservée(s)
Famille Rb ou Famille des protéines à poche	pRb	Rbf1	Répression transcriptionnelle, liaison des E2Fs activateurs et répresseurs, formation du complexe DREAM/dREAM ?
	p107 p130	Rbf2	Répression transcriptionnelle, liaison des E2Fs répresseurs, formation du complexe DREAM/dREAM
Famille E2F	E2F1 E2F2 E2F3	dE2F1	Activation transcriptionnelle, liaison à pRb/ Rbf1
	E2F4 E2F5	dE2F2	Répression transcriptionnelle, liaison à p107, p130/Rbf2, composant du complexe DREAM/dREAM
	E2F6	Aucun	Répression transcriptionnelle *
	E2F7 E2F8	Aucun	Répression transcriptionnelle des cibles de facteurs E2Fs *
Famille DP	DP1 DP2 DP3	dDP	Liaison aux E2Fs, liaison à l'ADN
Famille des cyclines de type D	Cycline D1 Cycline D2 Cycline D3	Cycline D	Activation de Cdk4,6, phosphorylation de pRb/Rbf1, favorise la progression en G1/S, formation d'un complexe avec les inhibiteurs de CDK Cip/Kip *
Famille des cyclines de type E	Cycline E1 Cycline E2	Cycline E	Activation de Cdk2, phosphorylation de pRb/Rbf1, favorise la progression en G1/S
Inhibiteur de Cdk Cip/Kip	p21/Cip1 p27/ Kip1 p57/Kip2	Dacapo	Inhibition de l'activité du complexe CyclineE/Cdk2, Inhibition de la progression en G1/S
Inhibiteur de Cdk INK4	p16-INK4a p15-INK4b p18-INK4c p19-INK4d	Aucun	Inhibition de l'activité du complexe CyclineD/Cdk4,6 *, inhibition de la progression en G1/S

Figure n°39 : Conservation des membres des familles Rb et E2F et de leurs régulateurs entre les mammifères et la drosophile

Il existe chez la drosophile des homologues des protéines à poches, des facteurs de transcription de la famille E2Fs, ainsi que des homologues de leurs principaux régulateurs. Les principales fonctions de ces différentes protéines sont conservées entre la drosophile et les mammifères. Toutefois, les protéines de mammifères possèdent certaines fonctions spécifiques (notées * dans le tableau).

Adapté de Gordon and Du, 2011.

II. Présentation des protéines du rétinoblastome chez les mammifères et la drosophile : pRb et Rbf1

rb est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié chez l'Homme. Ce gène code pour la protéine de susceptibilité au rétinoblastome appelée pRb. Ce gène tient son nom du fait qu'il est retrouvé muté dans un cancer pédiatrique de la rétine appelé rétinoblastome. La protéine pRb est, directement ou indirectement, inactivée dans la quasi-totalité des cancers humains (Gordon and Du, 2011; Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr, 1996; Sherr and McCormick, 2002). Cette inactivation peut être due à une mutation du locus du gène *rb*, à une extinction de l'expression de ce gène du fait d'un mécanisme épigénétique (Feinberg and Tycko, 2004; Stirzaker *et al.*, 1997) ou au fait que la protéine pRb peut être fonctionnellement inactivée suite à l'altération de l'un de ces régulateurs. Par exemple, le gène *rb* est retrouvé muté dans plus de 90% des cancers du poumon à petites cellules, dans environ 50% des cancers de la vessie et dans 20% des cancers du sein et de la prostate (Burkhart and Sage, 2008; Kaye and Harbour, 2004). Au total, plus de 900 mutations de ce gène ont été recensées. pRb a donc un rôle crucial de suppresseur de tumeur chez l'Homme.

pRb interagit avec de nombreuses protéines nucléaires (Goodrich, 2003; Goodrich, 2006; Morris and Dyson, 2001). Par le biais de ces interactions, il régule de très nombreux processus biologiques. On peut citer, par exemple, la différenciation (Korenjak and Brehm, 2005; McClellan and Slack, 2007; Nguyen and McCance, 2005), la prolifération (Henley and Dick, 2012), l'apoptose (Hickman *et al.*, 2002) ou encore la stabilité génomique (Knudsen *et al.*, 2006). Au vu de son rôle de suppresseur de tumeur, il apparait important de comprendre les mécanismes sous-jacents à ses différentes fonctions. Toutefois, la forte redondance génétique et fonctionnelle qui existe au sein de la famille Rb et au sein des familles de ses partenaires complique l'étude de ses fonctions biologiques. La drosophile s'est imposée comme un modèle de choix pour étudier les fonctions de pRb. En effet, il existe chez la drosophile des homologues des protéines à poches, et de leurs principaux partenaires, mais ils sont en nombre plus restreint que chez les mammifères (**Figure 39**). De même, les principales voies de signalisation sont conservées chez cet organisme modèle mais avec une plus faible redondance génique. En outre, de très nombreux outils génétiques sont disponibles et on a facilement accès à différents stades de développement et à divers types cellulaires. Il est donc possible d'étudier les effets de Rbf1, l'homologue de pRb, sur le devenir cellulaire chez la drosophile.

Au cours de cette seconde partie d'introduction, je présenterai brièvement la structure des protéines de la famille Rb, chez les mammifères et la drosophile, et leur fonction de régulateur de la chromatine. Puis je présenterai les fonctions biologiques de pRb et Rbf1. J'ai choisi de détailler ici uniquement leur rôle et leur mécanisme d'action vis-à-vis de l'apoptose et de la prolifération car je me suis intéressée à ces deux rôles de Rbf1 au cours de mes travaux de thèse.

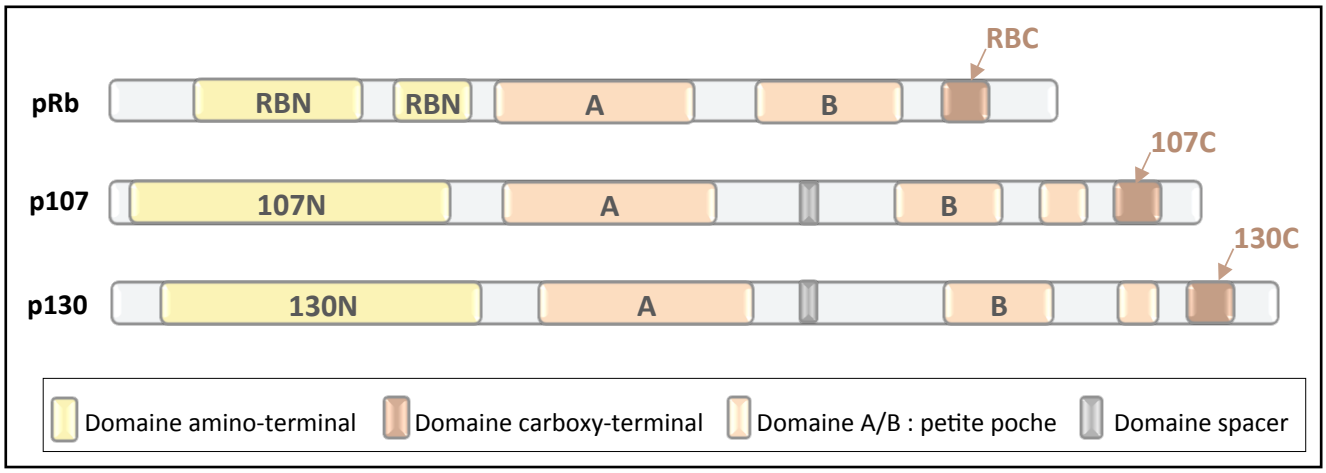


Figure n°40 : Famille des protéines à poche chez les mammifères

La famille des protéines à poche contient trois membres chez les mammifères (pRb, p107 et p130). Ces protéines se caractérisent pas la présence de deux domaines conservés : les domaines A et B qui forment une structure en poche permettant les interactions protéine/protéine. En outre, ces trois protéines possèdent des domaines amino- et carboxy-terminaux. Les protéines p107 et p130 possèdent un domaine spacer entre les domaines A et B. Ce domaine permet le recrutement de complexes cycline/cdk. Les protéines p130 et p107 se distinguent également de pRb par la présence d'une insertion au sein du domaine B.

Adapté de Dick and Rubin, 2013, Henley and Dick, 2012

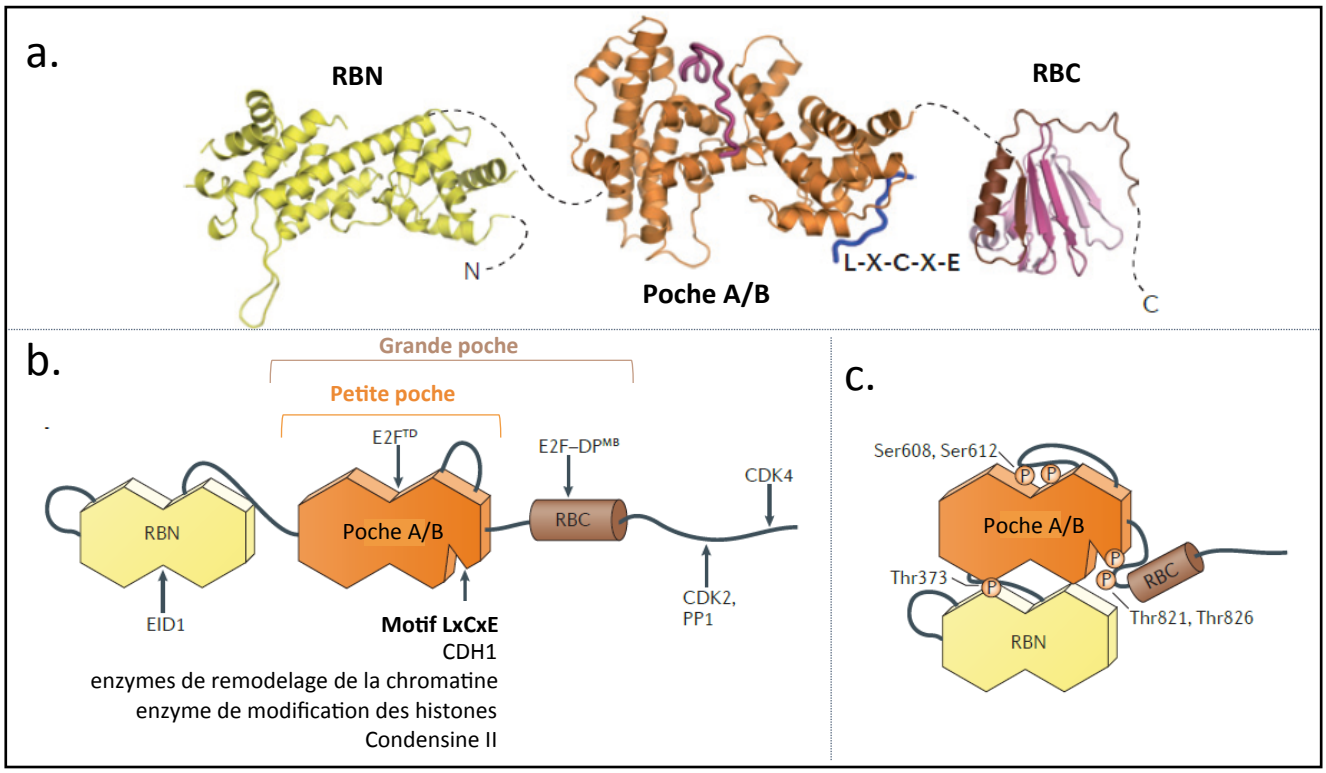


Figure n°41 : pRb est une plateforme d'interaction protéique

(a) Modèle de pRb sous sa forme active réalisé à partir des structures des différents domaines obtenues par cristallographie. On note la présence de nombreuses hélices α. Des feuillets β sont également présents au sein du domaine RBC. La ligne pointillée indique les régions flexibles entre les domaines structurés.

(b) Représentation schématique des domaines structuraux de pRb. La position de différents sites de liaison pour des protéines partenaires est indiqué.

(c) Représentation schématique de pRb dans sa conformation inactive et phosphorylée. La phosphorylation sur la thréonine 373 induit une interaction entre le domaine RBN et la poche A/B alors que des phosphorylations sur les thréonines 821 ou 826 entrainent une interaction entre une boucle de la poche A/B et le domaine RBC.

Adapté de Dick and Rubin, 2013

A. La famille des protéines à poche chez les mammifères et la drosophile

1. Les protéines à poche chez les mammifères

a) Structure des différents membres de la famille Rb chez les mammifères

pRb appartient à la famille des protéines à poche (**Figure 40**). Cette famille comprend trois membres chez les mammifères : pRb, p107 et p130 (Claudio *et al.*, 2002). Il existe des similarités de structure entre ces trois protéines et un certain nombre de fonctions communes ont été identifiées. Elles ont, par exemple, toutes les trois la capacité de réguler négativement le cycle cellulaire (Cobrinik, 2005; Henley and Dick, 2012). Des fonctions spécifiques ont également été mises en évidence pour ces protéines. Ainsi, contrairement à *rb*, *p107* et *p130* ne sont pas retrouvés fréquemment mutés dans les cas de cancer chez l'Homme (Dick and Rubin, 2013). Cela suggère que la capacité de suppresseur de tumeur de pRb est bien plus forte que celle de p107 et p130 en dépit de leur similarité structurale. Ceci explique que pRb soit la protéine la plus étudiée de la famille.

pRb contient deux domaines A et B qui ressemblent structurellement à un domaine hélical présent dans les cyclines (**Figure 41**) (Kim and Cho, 1997; Lee *et al.*, 1998). Ces domaines A et B interagissent ensemble pour former une seule unité structurale nommée « poche ». On parle de « petite poche » ou de « poche A/B ». Cette poche A/B est fortement conservée entre les différents membres de la famille Rb (Claudio *et al.*, 2002). Elle permet à pRb d'interagir avec de nombreux partenaires dont les facteurs de transcription de la famille E2F. Cette région permet notamment l'interaction avec des protéines possédant un motif LxCxE comme par exemple dans antigènes viraux ou des enzymes de remodelage de la chromatine. Deux domaines cyclines additionnels constituent le domaine N-terminal de pRb noté RBN et les 150 derniers résidus de pRb forment le domaine C-terminal (RBC) qui est désordonné (Dick and Rubin, 2013). Ce domaine RBC contient une séquence NLS qui permet à pRb d'être adressé au noyau (Zacksenhaus *et al.*, 1993). Comme la poche A/B, les domaines RBN et RBC permettent à pRb d'établir diverses interactions protéiques. En outre, le domaine RBC peut interagir avec la petite poche pour former la « grande poche ». Cette dernière est nécessaire et suffisante pour permettre à pRb d'inhiber la progression du cycle cellulaire (Hiebert, 1993; Qin *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que pRb peut adopter une conformation fermée donc inactive du fait de l'existence de différentes interactions intra-moléculaires (**Figure 41**) (Gordon and Du, 2011). Ces interactions intra-moléculaires sont régulées par diverses modifications post-traductionnelles de pRb et par la liaison de protéines régulatrices.

b) Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de pRb

rb est exprimé de façon constitutive et ubiquitaire. L'analyse génomique du locus *rb* révèle différentes caractéristiques qui font de lui un gène de ménage. En effet, la transcription de *rb* est initiée en de multiples positions. De plus, l'analyse génomique révèle qu'aucune boite TATA caractéristique des gènes différentiellement régulés n'est présente dans la région promotrice de *rb*. Par contre, cette région contient une

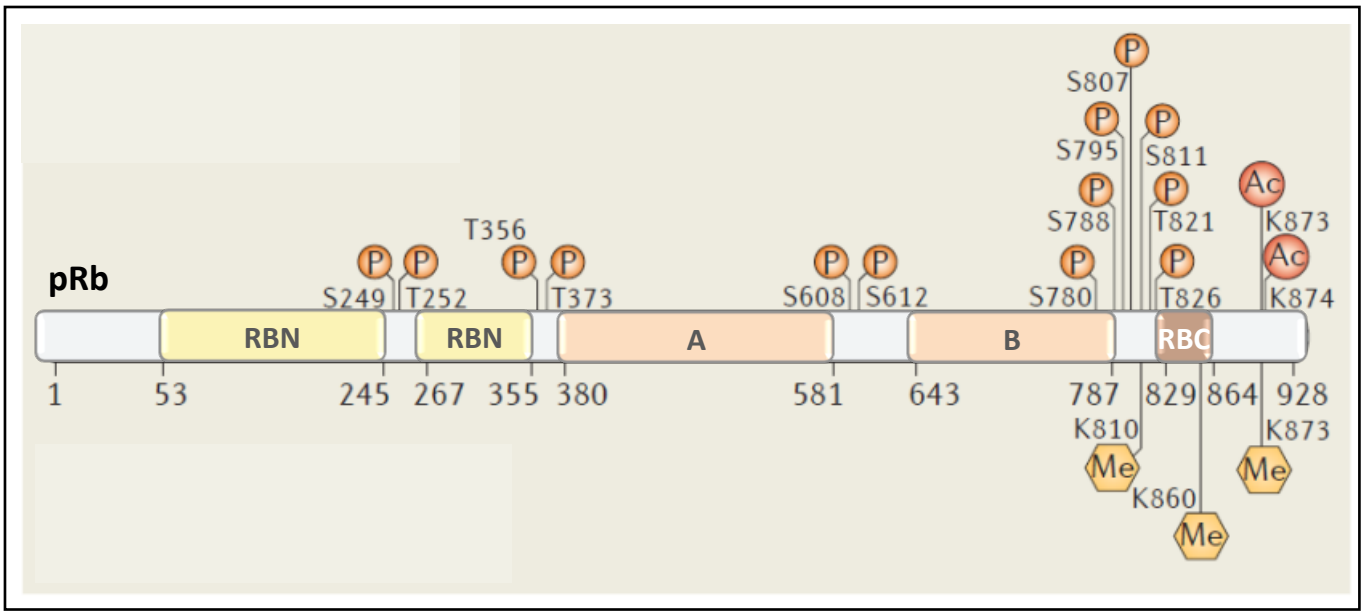


Figure n°42 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de pRb
La localisation de différentes modifications post-traductionnelles de pRb est indiquée (P=phosphorylation, Me=méthylation, Ac=acétylation). Ces modifications surviennent principalement en dehors des domaines structurés et jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de pRb.
Adapté de Dick and Rubin, 2013 et Munro *et al.,* 2012

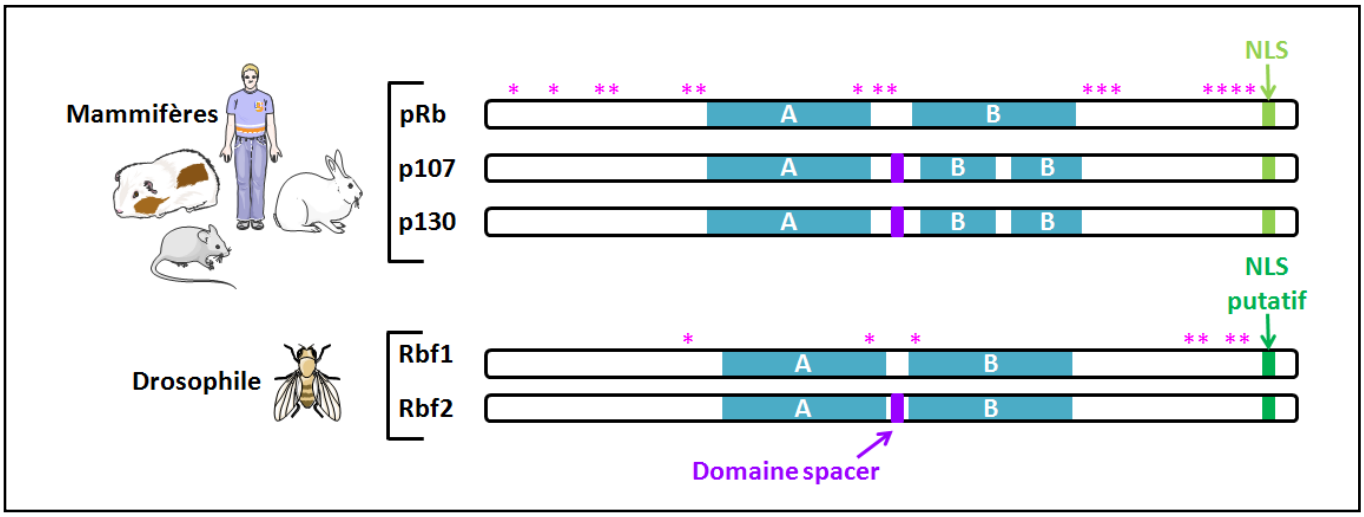


Figure n°43 : Comparaison entre mammifères et drosophile des membres de la famille Rb
La famille des protéines à poche contient trois membres chez les mammifères (pRb, p107 et p130) et deux membres chez la drosophile (Rbf1 et Rbf2). Ces protéines se caractérisent pas la présence de deux domaines conservés : les domaines A et B qui forment une structure en poche permettant les interactions protéine/protéine. Les membres de la famille Rb sont des protéines nucléaires. Pour les protéines de mammifères, la séquence NLS est bien caractérisée alors que pour les protéines de drosophile, elle reste putative. L'activité de pRb et de Rbf1 est régulée par phosphorylation au niveau de nombreux sites (*). Les sites de phosphorylations sur les autres protéines de la famille n'ont pas été précisément localisés. Les protéines p107, p130 et Rbf2 possèdent un domaine spacer entre les domaines A et B. Chez les mammifères, ce domaine permet le recrutement de complexes cycline/cdk. Chez la drosophile, une telle interaction n'a jamais été mise en évidence.
Adapté de Du and Pogoriler, 2006

zone riche en GC (Claudio *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 1989). Il existe peu de données faisant mention de régulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles de *rb*. Par contre pRb est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (**Figure 42**) (Munro *et al.*, 2012; Rubin, 2013). Il existe de nombreux sites de phosphorylation dans la séquence de pRb (Rubin, 2013). Ces sites sont localisés en dehors des domaines structurés. A quelques exceptions près, la phosphorylation conduit à une inactivation de pRb. La phosphorylation de pRb favorise des changements de conformation qui permettent de masquer les surfaces de liaison aux protéines partenaires (Burke *et al.*, 2012; Rubin, 2013). Cette modification post-traductionnelle joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activité de pRb vis-à-vis de la progression dans le cycle cellulaire.

Des sites d'acétylation et de méthylation ont été identifiés dans le domaine RBC de pRb (**Figure 42**) (Munro *et al.*, 2012). Ces modifications surviennent en réponse à divers signaux comme la différenciation cellulaire ou des dommages à l'ADN et sont généralement corrélées à une activation de la protéine pRb (Carr *et al.*, 2011; Markham *et al.*, 2006; Munro *et al.*, 2012). En outre pRb peut être la cible d'ubiquitination et de SUMOylation (Munro *et al.*, 2012). Enfin, pRb possède plusieurs sites consensus de clivage par les caspases. Ces clivages vont moduler le rôle de pRb dans le contrôle de l'apoptose (An and Dou, 1996; Boutillier *et al.*, 2000; Janicke *et al.*, 1996; Le Floch *et al.*, 2010; Lemaire *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 1997).

2. Les protéines à poche chez la drosophile

a) Structure des différents membres de la famille chez la drosophile

Le génome de la drosophile contient deux gènes codant pour des protéines de la famille Rb : *rbf1* (*retinoblastoma family 1*) et *rbf2* ((*retinoblastoma family 2*) (Du *et al.*, 1996a; Stevaux *et al.*, 2002). Ces deux protéines ont une structure proche des protéines à poche de mammifères (**Figure 43**), il existe de fortes similarités de séquences notamment au niveau des domaines A et B entre les protéines de deux espèces. De façon intrigante, la séquence nucléotidique de *rbf1* est plus proche de celle de *p107* et *p130* que de celle de *rb*, mais au niveau protéique Rbf1 a un plus fort pourcentage d'identité avec la protéine pRb qu'avec les protéines p107 ou p130 (Claudio *et al.*, 2002). Les protéines p107 et p130 possèdent un domaine « spacer » très conservé entre les domaines A et B. Il est intéressant de noter que ce domaine « spacer » est absent de Rbf1 et de pRb mais qu'il est présent dans Rbf2. Chez la drosophile, Rbf1 est considéré comme l'homologue de pRb alors que Rbf2 serait l'homologue de p107 et p130. Nous verrons dans la suite de cette introduction que des données génétiques et moléculaires soutiennent cette idée.

Le gène *rbf1* code pour une protéine de 845 acides aminés avec un poids moléculaire apparent de 95 kDa. En plus des domaines A et B qui composent la poche, la protéine Rbf1 possède un domaine N-terminal et un domaine C-terminal. Rbf1 interagit principalement avec ses partenaires par l'intermédiaire de la poche A/B, néanmoins des interactions protéiques sont également possibles par l'intermédiaire du domaine N-terminal. En effet, ce domaine est suffisant pour permettre à Rbf1 d'interagir avec ORC2 (une protéine du complexe de

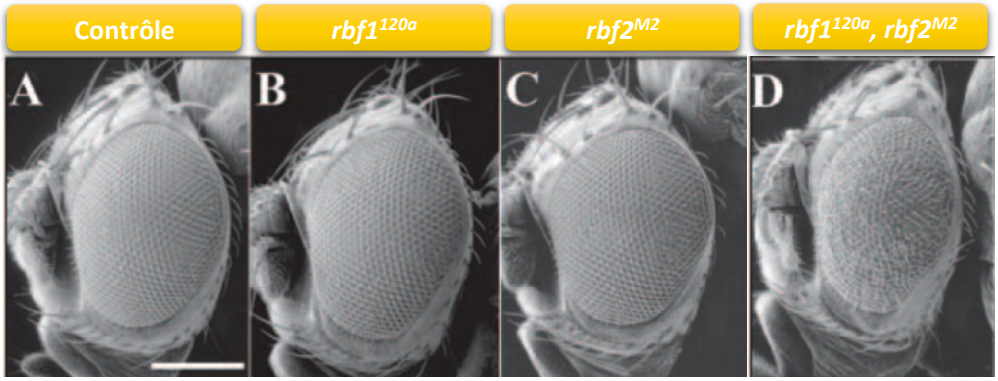


Figure n°44 : Interaction génétique entre Rbf1 et Rbf2
Les mouches portant une mutation hypomorphe de *rbf1* (*rbf1*^{120a}) et une mutation amorphe de *rbf2* (*rbf2*^{M2}) présentent un phénotype d'œil rugueux qui n'est observé ni dans le simple mutant *rbf1*^{120a} ni dans le simple mutant *rbf2*^{M2}. Les mutations de ces deux gènes ont donc un effet coopératif ce qui suggère que Rbf1 et Rbf2 assurent des fonctions biologiques communes.
Issu de Stevaux *et al.,* 2005

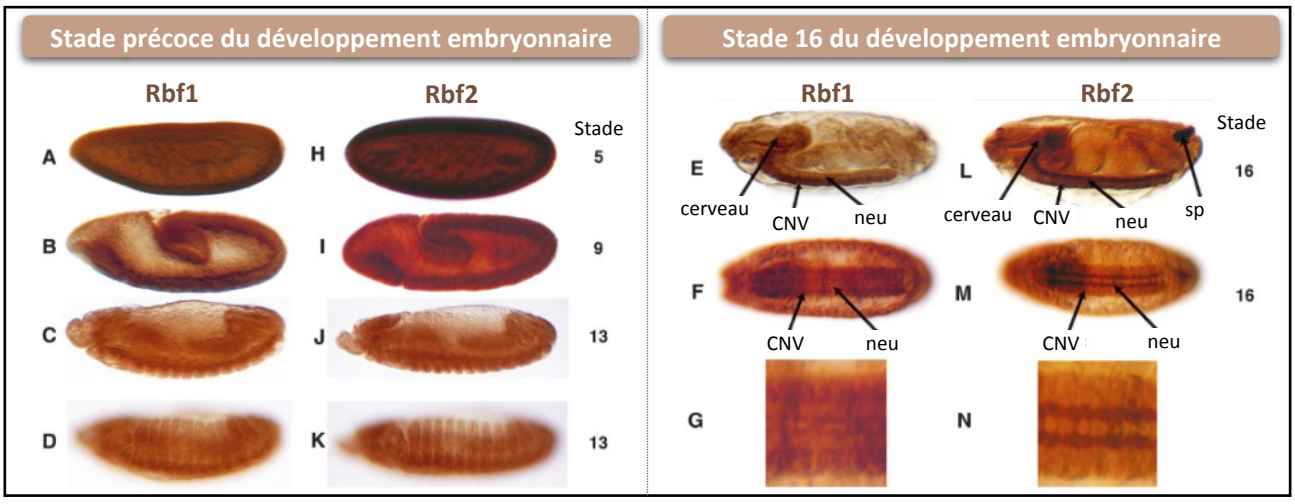


Figure n°45 : Rbf1 et Rbf2 ont un profil d'expression dynamique au cours du développement embryonnaire
Les embryons sont marqués avec un anticorps anti-Rbf1 (A-G) ou anti-Rbf2 (H-N). Au cours des stades précoces du développement, Rbf1 et Rbf2 ont un profil d'expression chevauchant (A-D et H-K). Puis, au stade 16, on observe une complémentarité d'expression de Rbf1 et Rbf2 dans le système nerveux central embryonnaire (E-G et L-N) ce qui suggère une complémentarité de fonction.
Tous les embryons sont orientés avec l'antérieur à gauche et le dorsal vers le haut sauf les embryons F, G, M et N pour lesquels la face ventrale est vers le lecteur.
CNV : corde nerveuse ventrale, neu : neuropile, sp : spiracle postérieur
Issu de Stevaux *et al.,* 2005

réplication) ou avec Squid (une protéine de liaison aux ARNs) (Ahlander and Bosco, 2009; Ahlander *et al.*, 2008). Contrairement à pRb, Rbf1 ne possède pas de séquence NLS bien caractérisée. Toutefois, une forme de Rbf1 dépourvue des acides aminés 787 à 845 perd sa localisation nucléaire, ce qui suggère que cette région C-terminale de Rbf1 contient une NLS.

La perte de fonction de *rbf1* est létale au stade jeune larve (Du, 2000; Du and Dyson, 1999; Frolov *et al.*, 2001) ce qui témoigne du rôle essentiel de Rbf1 au cours du développement larvaire. A l'inverse, la perte de fonction de *rbf2* n'est pas létale et les mouches adultes déficientes pour *rbf2* ne présentent pas de phénotype visible (Stevaux *et al.*, 2005). Néanmoins un phénotype d'œil rugueux est observé dans le cas d'une perte de fonction hypomorphe de *rbf1* associée à une mutation amorphe de *rbf2* (**Figure 44**). Ce phénotype d'œil n'étant pas observé pour les simples mutants, cela suggère que Rbf1 et Rbf2 partagent certaines fonctions biologiques (Stevaux *et al.*, 2005).

b) Profil d'expression de rbf1 et régulation post-transcriptionnelle

rbf1 est exprimé à tous les stades de développement et son expression est relativement uniforme (Keller *et al.*, 2005; Stevaux *et al.*, 2002). A l'inverse, l'expression de *rbf2* varie fortement au cours du développement : *rbf2* est exprimé à un fort niveau au cours des stades précoces de l'embryogenèse puis son niveau d'expression décroit (Keller *et al.*, 2005; Stevaux *et al.*, 2002). L'expression de *rbf2* n'est pas détectable au stade adulte chez les mâles et le faible niveau d'expression observé chez la femelle semble être dû à une expression restreinte aux ovaires. Il est intéressant de noter que *rbf1* et *rbf2* ont un profil d'expression complémentaire dans le système nerveux central embryonnaire (**Figure 45**) (Keller *et al.*, 2005), ceci suggère que Rbf1 et Rbf2 pourraient assurer des fonctions différentes mais complémentaires dans ce tissu au cours du développement.

Les facteurs capables de moduler le niveau d'expression de *rbf1* sont assez peu connus. Il a néanmoins été récemment mis en évidence que la perte de fonction du gène *ebi* conduit à une diminution du niveau d'ARNm de *rbf1* au stade larvaire (Lim *et al.*, 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que *rbf1* pouvait être la cible des complexes Polycomb, à savoir des complexes qui répriment l'expression génique en régulant l'état de méthylation de l'histone H3 (Enderle *et al.*, 2011; Oktaba *et al.*, 2008). Des données obtenues en cellules de drosophile en culture suggèrent que la protéine Ebi s'opposerait à l'action inhibitrice des complexes Polycomb et maintiendrait ainsi un niveau d'expression correcte de *rbf1* (Lim *et al.*, 2013).

Au-delà de ces régulations transcriptionnelles, l'activité de Rbf1 est régulée par le biais de différentes modifications post-traductionnelles. Comme pRb, Rbf1 est la cible de nombreuses phosphorylations (Frolov *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014). Sept sites de phosphorylation ont été identifiés dans la séquence de Rbf1. Ces phosphorylations sont notamment importantes pour réguler la fonction de Rbf1 au cours du cycle cellulaire. Par ailleurs, la protéine Rbf1 est sujette à une dégradation par le protéasome (Acharya *et al.*, 2010; Ullah *et al.*, 2007). Rbf1 est une protéine hautement instable : elle n'est plus détectable en cellules de drosophile

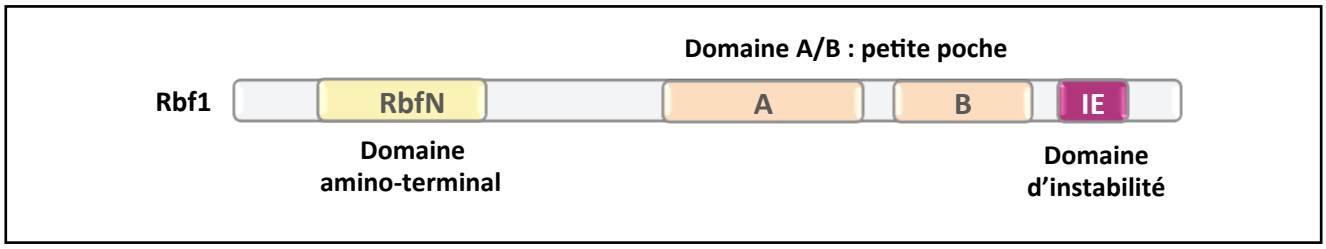


Figure n°46 : Représentation schématique de Rbf1
Rbf1 possède deux domaines A et B formant une structure en poche caractéristique de la famille Rb. Comme pRb, Rbf1 possède en N-terminal un domaine structuré qui lui permet d'établir des interactions protéine/protéine. De plus, Rbf1 possède en C-terminal un domaine d'instabilité qui favorise la dégradation de Rbf1 par la voie ubiquitine-protéasome.
Adapté de Raj *et al.,* 2012a

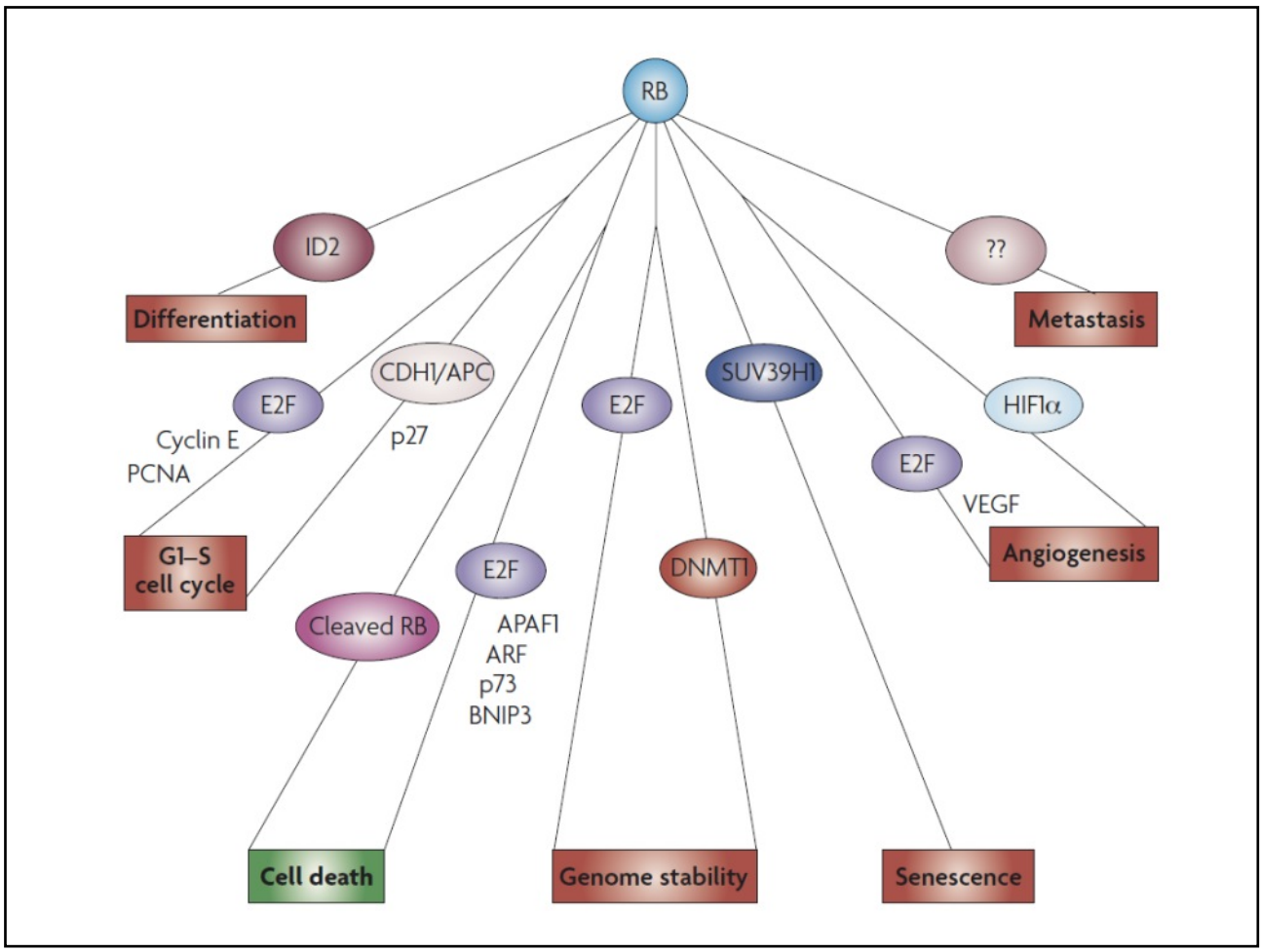


Figure n°47 : Aperçu de certains partenaires et gènes cibles de pRb impliqués dans sa fonction de suppresseur de tumeur.
Cette figure présente une vue simplifiée des fonctions de pRb jouant un rôle dans son activité de suppresseur de tumeur. Pour chaque fonction, certains partenaires clés sont indiqués. De même, les cibles transcriptionnelles, qui peuvent être nécessaires pour une fonction donnée, sont précisées.
Issu de Burkhart and Sage, 2008

une heure après traitement à la cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique) (Ullah *et al.*, 2007). Une forme de Rbf1 dépourvue en C-terminal des acides aminés 728 à 786 s'accumule à un niveau élevé et ce niveau n'augmente pas en présence d'un inhibiteur du protéasome (Acharya *et al.*, 2010). Rbf1 possède donc en C-terminal un domaine qui contribue à son instabilité et à sa dégradation par le protéasome, ce domaine a été appelé IE (Instability Element) (**Figure 46**). Il a, par la suite, été mis en évidence que Rbf1 est ubiquitiné *in vivo* et que cette ubiquitination est fortement réduite après délétion du domaine IE (Raj *et al.*, 2012b). Au cours du développement, Rbf1 est protégé par le signalosome COP9 de cette dégradation par le protéasome (Ullah *et al.*, 2007). Le signalosome est un complexe composé de huit sous-unités qui régule la dégradation par le protéasome de ses protéines cibles en interagissant avec certaines E3 ubiquitines ligases et en les deneddylant (Wei *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2002). En outre, des données obtenues au laboratoire suggèrent que Rbf1, comme pRb, serait sujet à un clivage post-traductionnel par les caspases (Milet *et al.*, 2014). Nous verrons plus loin dans cette introduction que la phosphorylation et l'ubiquitination de Rbf1 ont un impact important sur sa fonction de régulateur de la transcription.

B. pRb et Rbf1 régulent la structure chromatinienne

pRb assure ses différentes fonctions biologiques essentiellement en régulant la transcription de différents gènes cibles. Pour ce faire, pRb interagit physiquement avec de nombreuses protéines nucléaires (**Figure 47**), principalement des facteurs de transcription, des enzymes de modifications des histones ou des complexes de remodelages de la chromatine (Goodrich, 2003; Goodrich, 2006; Morris and Dyson, 2001). En plus de sa capacité à réguler la transcription au niveau de locus génomiques spécifiques, pRb peut influencer la structure chromatinienne au niveau de larges domaines génomiques voir même au niveau du chromosome entier. En effet, pRb participe à la compaction de larges régions hétérochromatiques et contribue ainsi au maintien de la stabilité génomique (Talluri and Dick, 2012). Ceci explique que les cellules déficientes pour *rb* présentent des aberrations chromosomiques. De même, Rbf1 est un régulateur transcriptionnel et ses gènes cibles sont impliqués dans une grande variété de fonctions biologiques. En outre, Rbf1 favorise la condensation de la chromatine (Longworth *et al.*, 2008). pRb et Rbf1 remplissent donc leurs différentes fonctions biologiques principalement par une action nucléaire en modulant la transcription.

1. pRb : un régulateur de l'expression génique

a) Les facteurs de transcription de la famille E2F chez les mammifères

Les partenaires les mieux caractérisés de pRb appartiennent à la famille des facteurs de transcription E2F. Les facteurs E2F possèdent un domaine conservé de liaison à l'ADN caractéristique de la famille et se lient à des groupes chevauchant de gènes cibles. Chez les mammifères, cette famille comprend huit membres (E2F1 à

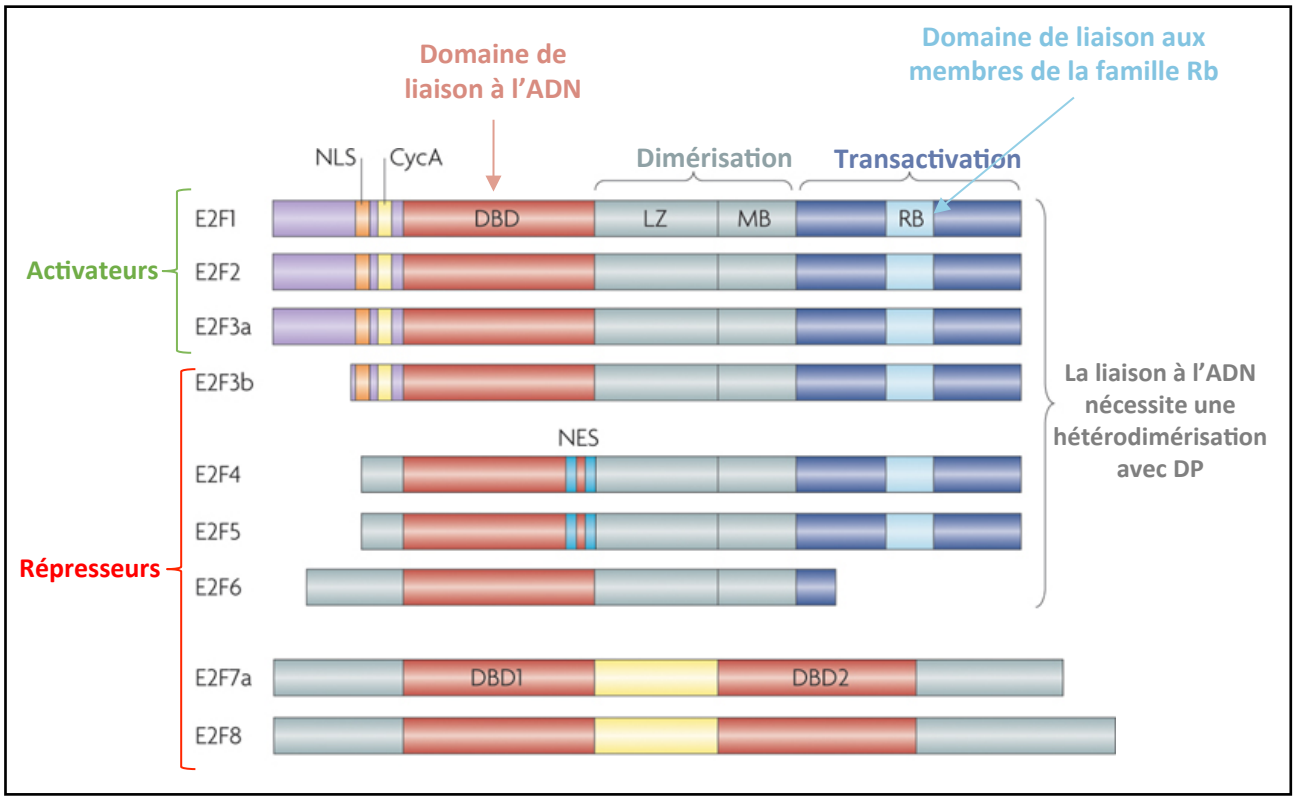


Figure n°48 : Famille des facteurs de transcription E2F chez les mammifères
Cette famille est définie par un domaine conservé de liaison à l'ADN (en rouge). Traditionnellement, la famille E2F est divisée en deux catégories : les E2Fs activateurs (E2F1 à E2F3a) et les E2Fs répresseurs (E2F3b à E2F8). Les protéines E2F1 à E2F6 se lient à l'ADN sous la forme d'un hétérodimère avec une protéine de la famille DP. La dimérisation est permise par le domaine « leucine zipper » (LZ) et le domaine « marked box » (MB). Certaines protéines de la famille E2F peuvent interagir avec une protéine de la famille Rb par l'intermédiaire d'un motif (en bleu clair) enchassé dans le domaine de transactivation (bleu foncé) : E2F1 à E2F3 interagissent avec pRb alors que E2F4 et E2F5 sont susceptibles d'interagir avec pRb, 107 et p130. Les protéines E2F1 à E2F3 possèdent en N-terminal une séquence de localisation nucléaire (en orange) et un domaine de liaison à la cycline A (en jaune). E2F4 et E2F5 possèdent une séquence d'export nucléaire bipartite (en bleu). E2F6 à E2F8 sont des E2Fs atypiques incapables de lier les protéines de la famille Rb.
Adapté de Chen *et al.,* 2009

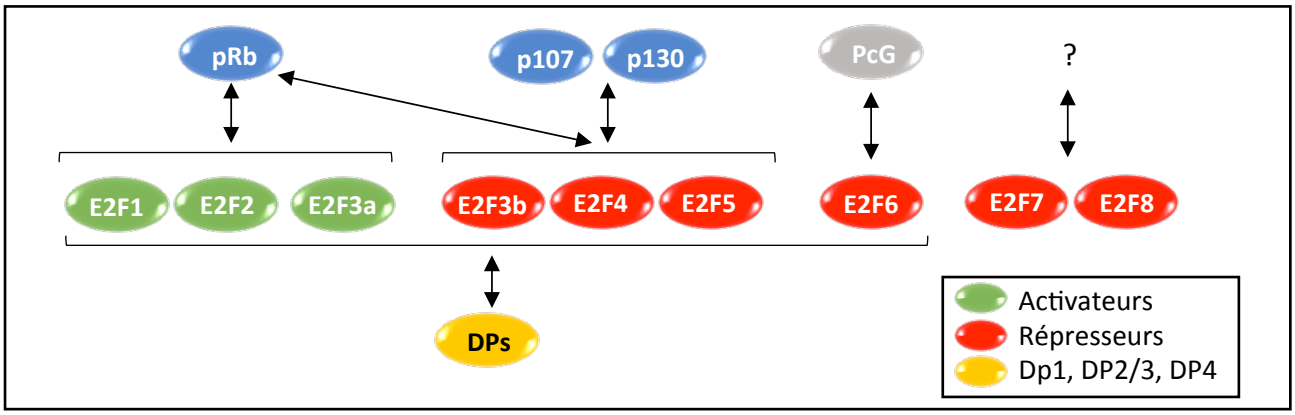


Figure n°49 : Interaction entre les protéines à poche et les facteurs E2Fs chez les mammifères
Les facteurs de transcription de la famille E2F sont subdivisés en deux groupes. Le premier groupe est composé des E2Fs activateurs (E2F1, E2F2 et E2F3a). Ces E2Fs activateurs interagissent physiquement avec pRb. Le second groupe comprend les E2Fs répresseurs. Parmi ces E2Fs répresseurs E2F3, E2F4 et E2F5 interagissent avec pRb, p107 et p130. E2F6 forme des complexes répresseurs avec les protéines du groupe Polycomb (PcG). Les deux derniers facteurs, E2F7 et E2F8, n'interagissent pas avec les protéines à poche et ne se dimérisent pas avec un facteur DP.
Adapté de Van den Heuvel and Dyson, 2008 et Udayakumar *et al.,* 2010

E2F8) (**Figure 48**) (Attwooll *et al.*, 2004; DeGregori and Johnson, 2006). E2F3a et E2F3b sont des produits différents du locus *e2f3* avec des profils d'expression distincts (Leone *et al.*, 2000). Des études biochimiques ont permis de subdiviser les protéines de cette famille en deux catégories en fonction de leur mode d'action. E2F1, E2F2 et E2F3a semblent fonctionner principalement comme des activateurs transcriptionnels alors que les autres membres de la famille répriment la transcription de leurs gènes cibles. Néanmoins, cette subdivision est largement basée sur des études *in vitro* et ne reflètent pas toujours l'action transcriptionnelle de ces différents facteurs. En effet, E2F1 à E2F3a peuvent, dans certains contextes, réprimer la transcription et inversement, E2F3b à E2F5 peuvent occasionnellement activer la transcription (Chong *et al.*, 2009; van den Heuvel and Dyson, 2008).

Les protéines E2F1 à E2F6 contiennent un domaine de dimérisation conservé, par l'intermédiaire duquel, elles s'associent à une protéine de la famille DP (differentiation-regulated transcription factor polypeptide) pour former un complexe hétérodimèrique qui lie l'ADN de façon séquence spécifique. Chez les mammifères, la famille DP comprend 3 membres.

Les protéines à poche sont capables d'interagir avec E2F1 à E2F5 (**Figure 49**) (Chen *et al.*, 2009). pRb lie E2F1 à E2F3a et inhibe leur activité transcriptionelle. pRb, p107 et p130 sont tous les trois capables de lier E2F3b, E2F4 et E2F5. Cette interaction permet d'augmenter le pouvoir répresseur des facteurs E2Fs. Aucune interaction entre E2F6 à E2F8 et les protéines à poche n'a été décrite. E2F6 fonctionne exclusivement comme un répresseur. Il a été purifié en complexe avec des protéines du groupe Polycomb. E2F7 et E2F8 sont dépourvus de domaine de liaison à DP mais contiennent une répétition en tandem du domaine de liaison à l'ADN caractéristique des E2Fs. Les dimères contenant E2F7 et/ou E2F8 répriment la transcription par un mécanisme peu décrit à l'heure actuelle.

b) Différents mécanismes moléculaires permettent à pRb d'assurer sa fonction de répresseur transcriptionnel

(1) Inhibition de la transcription dépendante des facteurs E2Fs *via* une liaison par pRb

L'analyse de la distribution de pRb au niveau génomique dans des fibroblastes en prolifération ou sénescents révèle que le motif le plus fréquemment représenté dans les régions liées par pRb correspond au motif de liaison des facteurs E2Fs (Chicas *et al.*, 2010). Cela place la régulation de la transcription dépendante des facteurs E2Fs au cœur de la fonction de régulateur transcriptionnel de pRb. Il existe un modèle assez simple pour expliquer comment pRb réprime la transcription dépendante des facteurs E2Fs.

Le domaine d'activation transcriptionnelle des E2Fs activateurs, interagit avec des facteurs généraux de la transcription et des histones acétylases qui sont requis pour l'activation transcriptionnelle (Emili and Ingles, 1995; Hagemeier *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2001). L'interaction entre pRb et les E2Fs activateurs se fait par l'intermédiaire d'une liaison de la poche A/B de pRb avec le domaine transactivateur des E2Fs (Lee *et al.*, 2002; Munger, 2003;

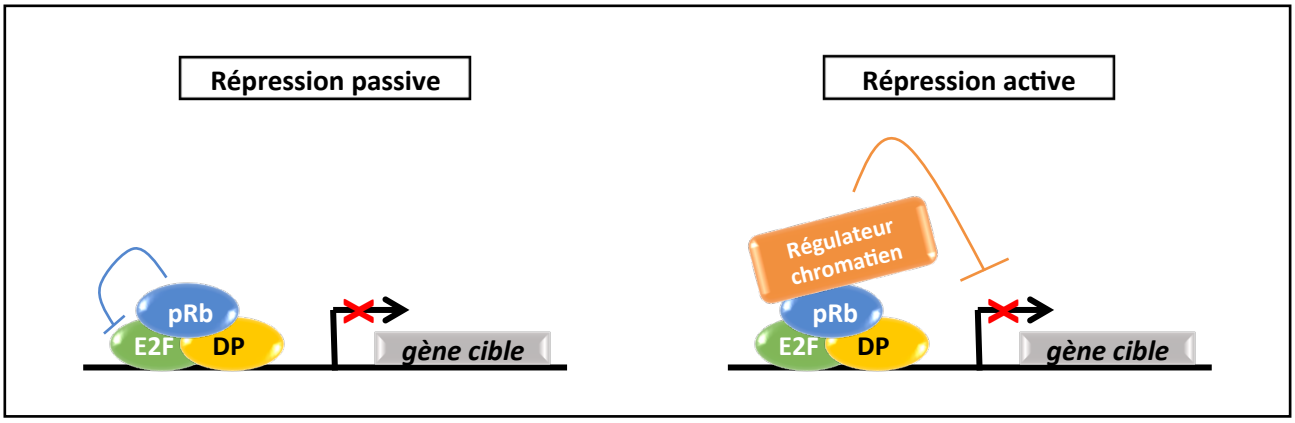


Figure n°50 : Deux mécanismes d'inhibition par pRb de la transcription dépendante des facteurs E2Fs
pRb réprime la transcription des gènes cibles des facteurs E2Fs de deux façons. D'une part, pRb inhibe passivement cette transcription (à gauche). En effet, la liaison de pRb à un facteur E2F masque son domaine transactivateur. D'autre part, pRb recrute au niveau des gènes cibles des facteurs E2Fs des corépresseurs transcriptionnels comme les protéines HDACs ce qui permet une compaction de la chromatine, donc une répression active de la transcription (à droite).

Xiao *et al.*, 2003). Ainsi, par simple liaison, pRb masque le domaine d'activation transcriptionnelle des E2Fs et inhibe leur fonction (**Figure 50**) (Frolov and Dyson, 2004; Pearson and Greenblatt, 1997). C'est par le biais de ce mécanisme d'action que pRb réprime l'expression des gènes requis pour la progression dans le cycle cellulaire.

(2) pRb réprime les gènes cibles des facteurs E2Fs en modifiant la structure chromatinienne

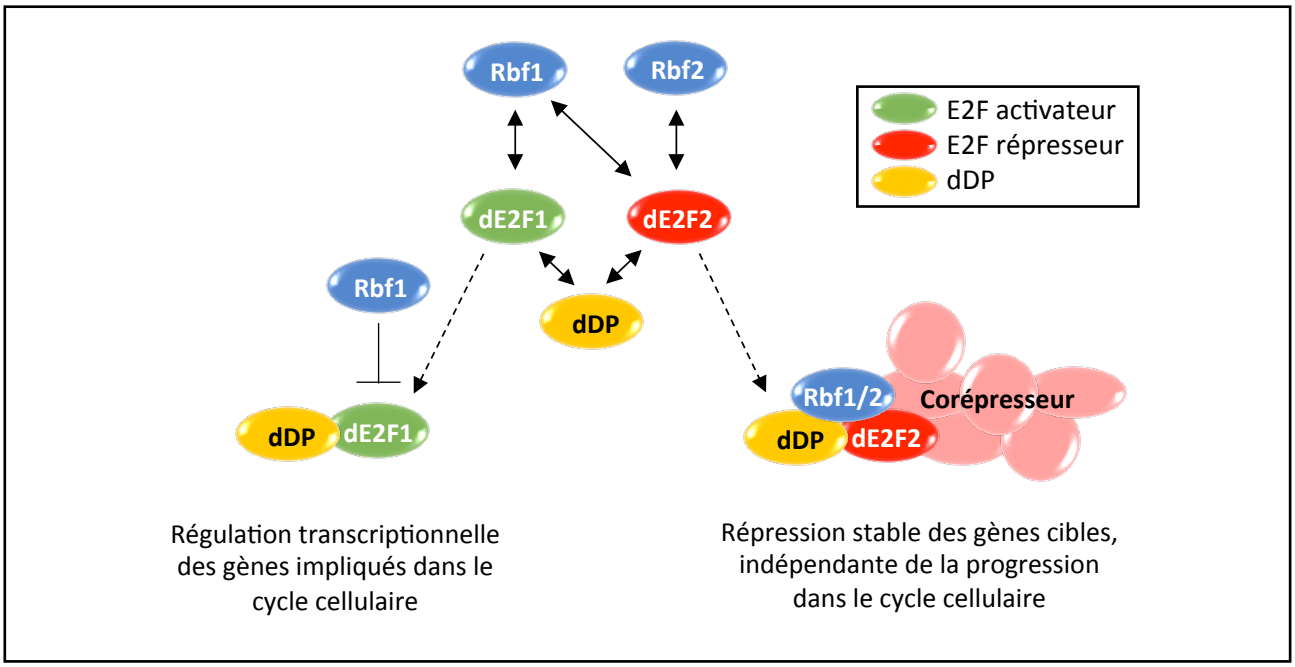
En plus de cette inhibition de la transactivation dépendante des facteurs E2Fs, pRb peut réprimer la transcription de façon active au niveau des gènes cibles des facteurs E2Fs (**Figure 50**). Comme décrit précédemment, pRb possède de nombreux partenaires nucléaires. Un certain nombre d'entre eux, modulent la structure chromatinienne, de façon à réprimer l'expression génique. Le domaine de pRb, qui permet l'interaction avec les facteurs E2Fs, est différent de celui permettant l'interaction avec les complexes qui régulent la structure de la chromatine. pRb en complexe avec les facteurs E2Fs peut donc recruter différents complexes qui répriment la transcription ou modifient la structure de la chromatine de façon telle que l'expression génique est inhibée.

Parmi les régulateurs chromatiniens liés par pRb, on peut citer par exemple les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998), l'histone déméthylase RBP2 (Benevolenskaya *et al.*, 2005) ou encore l'ADN méthyltransférase DNMT1 (Robertson *et al.*, 2000). La liste des partenaires physiques de pRb est longue mais il existe malheureusement peu d'exemples où la signification fonctionnelle de l'interaction entre pRb et un régulateur chromatinien particulier est connue.

c) pRb : un activateur transcriptionnel ?

Bien que pRb soit largement décrit comme un répresseur transcriptionnel, il peut, dans certains cas, agir comme un coactivateur. Par exemple, dans le cas de la différenciation des cellules musculaires, pRb lie le facteur de transcription MyoD et augmente sa capacité à induire l'expression de gènes requis pour la différenciation myogénique ou la fonction musculaire (Gu *et al.*, 1993; Novitch *et al.*, 1999). De même, la liaison de pRb, permet d'activer le facteur CBFA1 pendant l'ostéogenèse (Thomas *et al.*, 2001) ainsi que NF-IL6 et C/EBP pendant l'adipogenèse (Chen *et al.*, 1996c; Chen *et al.*, 1996d).

pRb peut également agir comme un activateur transcriptionnel en coopérant avec E2F1 pour induire l'apoptose en réponse à différents types de stress (Ianari *et al.*, 2009). Ce rôle précis de pRb sera détaillé plus loin dans le paragraphe n°II.C.2.b.



<u>Figure n°51</u> : Interaction entre les protéines à poche et les facteurs E2Fs chez la drosophile

Chez la drosophile, la famille E2F comprend deux membres : dE2F1 qui appartient au sous-groupe des E2Fs activateurs et dE2F2 qui fait parti des E2Fs répresseurs. Ces deux protéines forment un complexe hétérodimérique avec la protéine dDP. Rbf1 interagit avec dE2F1 et inhibe ainsi la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Rbf1 et Rbf2 peuvent tous les deux se lier à dE2F2. En coopération avec des facteurs corépresseurs, les complexes Rbf/dE2F2 répriment la transcription de leurs gènes cibles de façon indépendante de la progression dans le cycle cellulaire.

Adapté de Van den Heuvel and Dyson, 2008

2. Rbf1 : un régulateur de l'expression génique

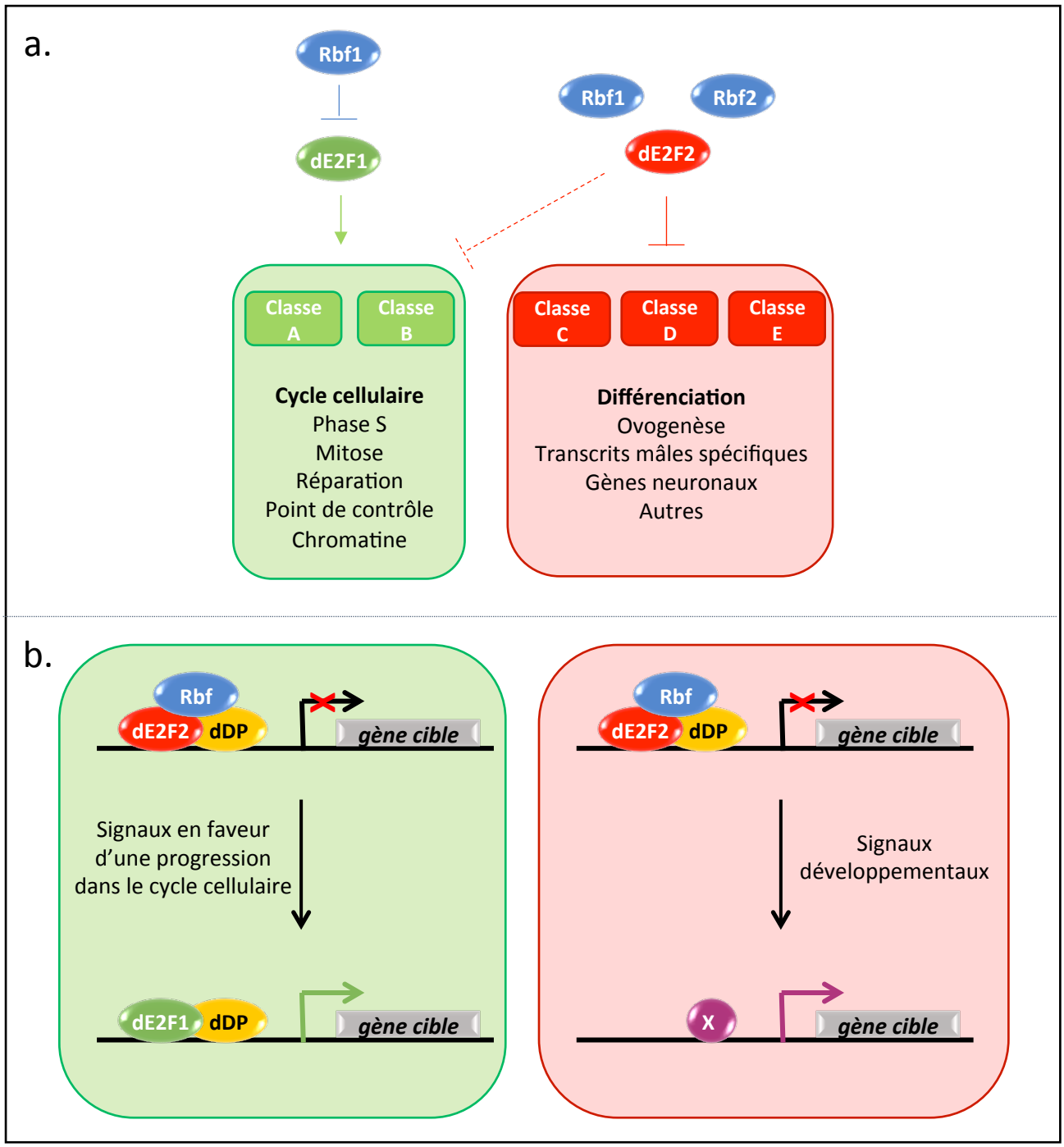
a) Les facteurs de transcription de la famille E2F chez la drosophile

La drosophile possède un seul facteur DP nommé dDP et deux membres de la famille E2F : dE2F1 (Dynlacht *et al.*, 1994; Ohtani and Nevins, 1994) et dE2F2 (Sawado *et al.*, 1998). dE2F1 et dE2F2 se dimérisent avec dDP (**Figure 51**). Les complexes dE2F/dDP sont capables de lier l'ADN de façon séquence spécifique, et de réguler la transcription d'un grand nombre de gènes cibles. dE2F1 est considéré comme l'homologue des E2Fs activateurs alors que dE2F2 appartient au sous-groupe des E2Fs répresseurs (Cayirlioglu *et al.*, 2001; Dynlacht *et al.*, 1994; Frolov *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 1995; Ohtani and Nevins, 1994; Sawado *et al.*, 1998). Rbf1 est capable de lier dE2F1 et dE2F2. Donc comme pRb, Rbf1 peut interagir avec les E2Fs activateurs d'une part, et les E2Fs répresseurs d'autre part (Frolov *et al.*, 2001; Stevaux *et al.*, 2002). Rbf2, quant à lui, interagit uniquement avec dE2F2 (Stevaux *et al.*, 2002) et semble donc fonctionner de façon similaire à p107 et p130.

b) Balance entre l'activateur dE2F1 et le répresseur dE2F2

Un certain nombre de données génétiques et moléculaires suggèrent que dE2F1 et dE2F2 ont des actions antagonistes. dE2F1 contrôle l'expression de ses gènes cibles par l'intermédiaire de séquences consensus situées au niveau des promoteurs de ces gènes. dE2F1, lorsqu'il est en complexe avec dDP, lie l'ADN et active la transcription de ses gènes cibles. Ces gènes sont principalement des gènes requis pour la réplication de l'ADN ou la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, dE2F1 contrôle la prolifération en régulant notamment la transition G1/S. Au sein d'embryons mutants pour *de2f1*, le niveau de transcription des gènes cibles de dE2F1 est diminué. De plus, le taux de synthèse d'ADN est réduit et la prolifération cellulaire est fortement altérée. De façon intéressante, les embryons doubles mutants pour *de2f1* et *de2f2* ont un taux de synthèse d'ADN et un profil de prolifération relativement normaux (Frolov *et al.*, 2001). Ceci suggère que les défauts observés dans les embryons mutants pour *de2f1* sont principalement dus à une activité non contrôlée de dE2F2. La perte de fonction de *ddp* abolit l'activité transcriptionnelle de dE2F1 et de dE2F2. De même, les mouches mutantes pour *ddp* se développent jusqu'au stade larvaire avec un profil de prolifération quasi-normal (Duronio *et al.*, 1998; Royzman *et al.*, 1997). De plus, au cours de l'ovogenèse, les défauts d'endoréplication observés dans les cellules folliculaires surexprimant *de2f1* sont aggravés par la perte de fonction de *de2f2* (Weng *et al.*, 2003). En outre, dE2F1 et dE2F2 sont tous les deux capables de lier les promoteurs des gènes *pcna* et *DNApol*α au niveau des sites consensus des facteurs E2Fs mais ils ont une action opposée *in vitro* sur le niveau d'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle de ces deux promoteurs (Frolov *et al.*, 2001; Sawado *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une balance entre dE2F1 et dE2F2 pour le contrôle de la transcription des gènes important pour la régulation du cycle cellulaire.

Des analyses des modifications du profil d'expression génique en réponse à la perte de fonction de *de2f1* ou de *de2f2* ont fourni une vision plus précise du programme transcriptionnel des facteurs dE2Fs (Cayirlioglu *et*



<u>Figure n°52</u> : Classification des gènes cibles des facteurs dE2Fs

(a) Les gènes cibles des facteurs dE2Fs sont classés en 5 catégories. L'importance d'une activation transcriptionnelle par dE2F1 pour l'expression de ces gènes décroit des catégories A à E. A l'inverse, l'importance d'une répression par dE2F2 croit entre ces différentes catégories. Ces catégories contiennent des gènes ayant des fonctions différentes. dE2F1 est requis pour activer l'expression des gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire alors que dE2F2 est requis pour réprimer une grande variété de gènes impliqués dans les processus de différenciation.

(b) Le mécanisme d'activation de l'expression des gènes des groupes A et B (en vert, à gauche) diffère de celui des groupes C à E (en rouge, à droite). En effet, les gènes des groupes A et B sont activés par dE2F1 en réponse à la présence d'une forte activité cycline/cdk. Les gènes des groupe C à E sont insensibles à la progression dans le cycle cellulaire. L'activation de leur expression nécessite des facteurs de transcription (X) spécifiquement présents dans certains tissus et/ou régulés par des signaux développementaux.

Adapté de Dimova *et al.*, 2003

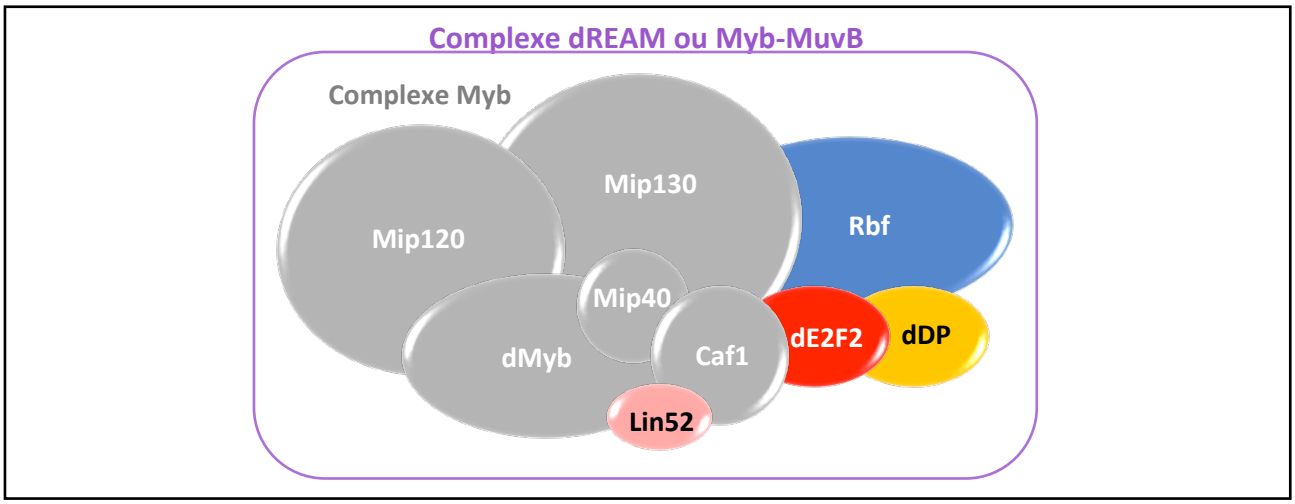
al., 2003; Dimova *et al.*, 2003; Georlette *et al.*, 2007; Stevaux *et al.*, 2005). Les résultats indiquent qu'une grande variété de régulation par les facteurs dE2Fs existe et que l'importance de l'activation par dE2F1 et de la répression par dE2F2 varie d'une cible à l'autre. La réalité est donc bien plus complexe que ne le laissaient présager les premières études réalisées. Globalement, on peut classer les gènes cibles des facteurs dE2Fs en deux catégories (**Figure 52**) (Dimova *et al.*, 2003; Stevaux *et al.*, 2005). La première catégorie comprend des gènes dont la fonction est requise pour la progression dans le cycle cellulaire. Ce sont des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la structure de la chromatine ou qui sont nécessaires à la mitose. Ces gènes sont fortement exprimés dans les cellules en division. L'expression de ces gènes dépend principalement d'une activation transcriptionnelle par l'hétérodimère dE2F1/dDP et d'une répression par Rbf1. La seconde catégorie contient les cibles des facteurs dE2Fs qui sont réprimés dans les cellules en prolifération. Ces gènes sont réprimés par les complexes dE2F2/Rbf1 et dE2F2/Rbf2. Ces gènes sont exprimés de façon sexe ou tissue spécifique et leur expression ne dépend pas (ou très faiblement) d'une activation par dE2F1. Ce sont principalement des gènes impliqués dans la gamétogenèse ou la différenciation cellulaire. De façon plus précise, on distingue cinq catégories de gènes cibles des facteurs dE2Fs notés de A à E (**Figure 52**) (Dimova *et al.*, 2003). L'implication de dE2F1 dans l'activation transcriptionnelle de ces différents gènes décroit entre les catégories A à E. A l'inverse, l'importance de la répression assurée par dE2F2 croit entre ces différentes catégories.

De façon intéressante, dE2F1 se lie à quatre fois moins de régions génomiques que dE2F2. De plus la majorité des sites liés par dE2F1 le sont également par dE2F2 mais l'inverse n'est pas vrai (Korenjak *et al.*, 2014). Ceci suggère que dE2F2 joue un rôle indépendant de dE2F1 dans le contrôle de la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes.

c) Complexité du programme transcriptionnel de dE2F2

Il a été mis en évidence par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, réalisées à partir de cellules d'ovaires de drosophile, que dE2F2 est présent au niveau des promoteurs d'un grand nombre de gènes. Mais de façon intrigante, seulement une faible proportion de ces gènes voit leur niveau d'expression augmenté dans un contexte mutant pour *de2f2* (Stevaux *et al.*, 2005). Il n'y a donc pas de corrélation directe entre la présence de dE2F2 au niveau du promoteur d'un gène et l'importance de son activité de répresseur transcriptionnel pour le niveau d'expression de ce gène.

De plus, dE2F2 régule des groupes de gènes différents entre les différents types cellulaires. En effet, seulement 10% des gènes régulés par dE2F2 ont, à la fois dans les cellules de l'ovaire et dans les cellules embryonnaires en culture, un niveau de transcription augmenté après déplétion de *de2f2* (Dimova *et al.*, 2003; Georlette *et al.*, 2007; Stevaux *et al.*, 2005). Donc, l'importance fonctionnelle de dE2F2 varie pour un promoteur donné en fonction des différents types cellulaires. Ainsi dE2F2 est présent au niveau du promoteur d'un gène X dans différents types cellulaires mais la perte de fonction de *de2f2* a une conséquence sur le niveau d'expression



<u>Figure n°53</u> : Composition du complexe dREAM

Le complexe dREAM (également appelé Myb-MuvB) contient dE2F2, son cofacteur dDP, une des protéines à poche de drosophile (Rbf1 ou Rbf2), la protéine Lin52 ainsi que les membres du complexe Myb. Ce complexe Myb comprend la protéine dMyb, les protéines Mips (Mip130, Mip120 et Mip40) ainsi que Caf1.

de ce gène uniquement dans certains types cellulaires. Cet état des choses peut s'expliquer par le fait que la régulation de la transcription d'un gène cible donné résulte de l'intégration de l'activité de multiples facteurs chromatiniens. On peut également envisager le fait que la plupart des complexes présents sur l'ADN contenant dE2F2 soient non fonctionnels. En fait, la plasticité développementale et tissulaire de la répression transcriptionnelle assurée par dE2F2 peut en partie s'expliquer par le fait qu'il appartient à un large complexe multi-protéique impliqué dans la régulation transcriptionnelle à savoir le complexe dREAM.

d) Implication du complexe dREAM dans la régulation transcriptionnelle assurée par dE2F2 et Rbf1

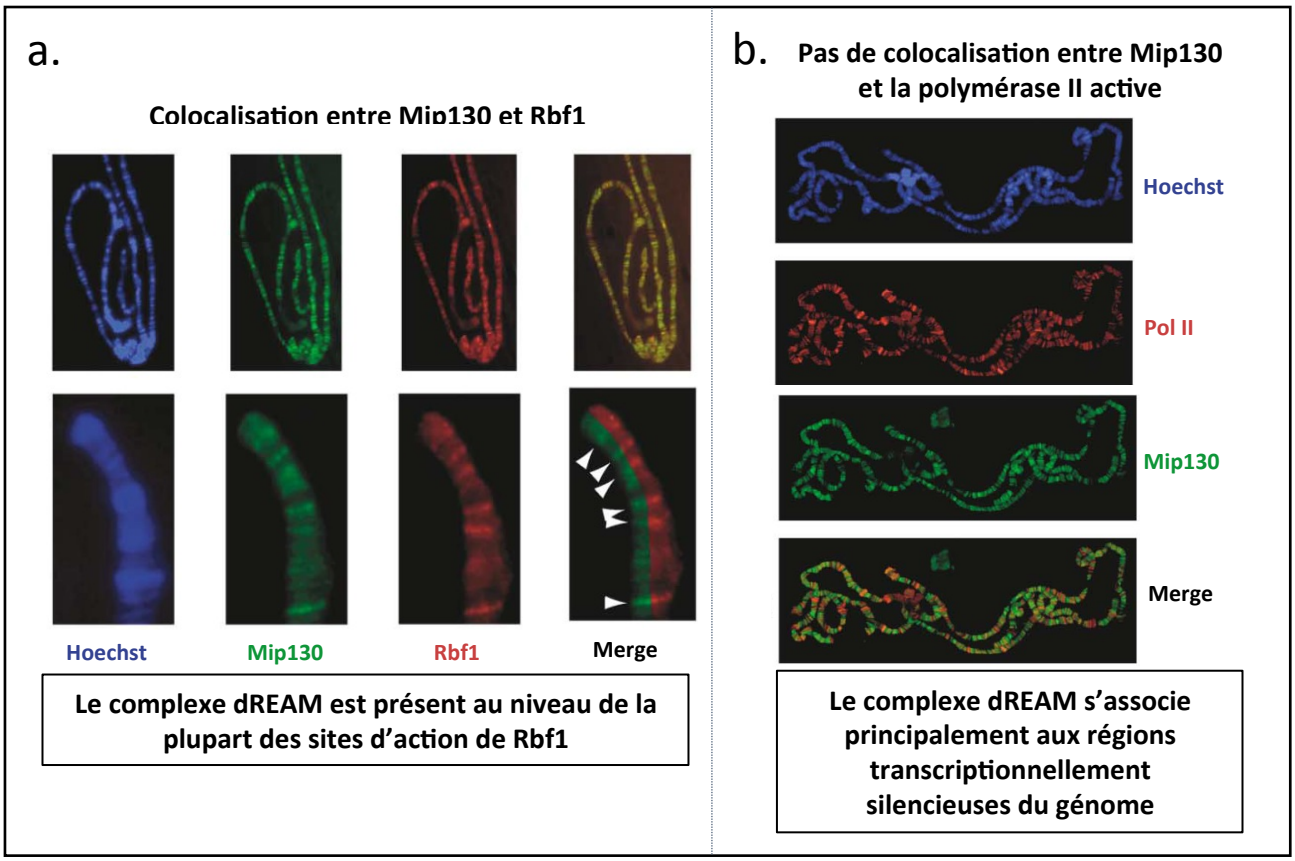
(1) Identification du complexe dREAM

Le complexe dREAM (drosophila Rbf, E2F and Myb-interacting protein), un grand complexe multi-protéique (environ 700kDa) contenant dE2F2, a été identifié par plusieurs équipes à partir d'extraits de cellules embryonnaires de drosophile (Korenjak *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2004). Ce complexe contient 9 protéines différentes (**Figure 53**) : Mip130 (Myb-interacting protein 130), Mip120 (Myb-interacting protein 120), Mip40 (Myb-interacting protein 40), Caf1 (Chromatin assembly factor 1 subunit), dMyb (drosophila myeloblastosis), Lin-52 ainsi que dE2F2, dDP et Rbf1 ou Rbf2. Aucune interaction n'a été mise en évidence entre Rbf1 et Rbf2 ce qui suggère que le complexe dREAM contient l'une ou l'autre de ces deux protéines.

Mip 130, Mip120, Mip40, Caf1 et dMyb ont été précédemment décrits comme appartenant à un complexe impliqué dans la réplication de l'ADN au sein des cellules folliculaires appelé complexe Myb (Beall *et al.*, 2002). Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez *C. elegans*, les homologues de *lin-52*, *mip130*, *mip120*, *caf1*, *de2f2*, *dd*p et *rbf1* appartiennent à la classe B des gènes de la famille synMuv (synthetic multivulva) (Lipsick, 2004). Les gènes synMuv assurent l'anatomie correcte du nématode en réprimant la voie de développement vulvaire dans certaines cellules précurseurs. La perte de fonction de ces gènes conduit à la présence de plusieurs vulves du fait de l'expression ectopique de gènes impliqués dans le développement vulvaire (Ceol *et al.*, 2006). Les gènes synMuv sont classés en trois catégories : A, B et C. Il est nécessaire d'inactiver au moins deux gènes appartenant à deux classes différentes pour que le phénotype de vulves surnuméraires soit présent. Certaines des protéines codées par les gènes de la classe B appartiennent à un complexe appelé DRM qui est similaire au complexe dREAM (Harrison *et al.*, 2006), si ce n'est qu'il ne contient pas d'homologue de dMyb. Ceci explique que le complexe dREAM est aussi fréquemment appelé MMB pour Myb-MuvB (Lewis *et al.*, 2004).

(2) Implication du complexe dREAM dans la régulation de l'expression génique

Le complexe dREAM se lie au niveau de milliers de sites sur le génome de la drosophile (Georlette *et al.*, 2007). Les premières études réalisées indiquent que le complexe dREAM se lie à la chromatine



<u>Figure n°54</u> : Association du complexe dREAM aux régions transcriptionnellement silencieuses du génome.

Immunomarquages sur des chromosomes polythènes de drosophile.

(a) Il existe une colocalisation importante (tête de flèche) entre Mip130 (en vert) et Rbf1 (en rouge) ce qui suggère que le complexe dREAM est présent au niveau de la plupart des sites d'action de Rbf1.

(b) Un immunomarquage de l'ARN polymérase II, sous sa forme phosphorylée, permet de visualiser les régions transcriptionnellement actives du génome. Il n'existe pas de colocalisation entre Mip130 (en vert) et l'ARN polymérase II phosphorylée (en rouge) ce qui suggère que le complexe dREAM s'associe principalement aux régions transcriptionnellement silencieuses du génome.

Adapté de Korenjak *et al*., 2004

transcriptionnellement inactive (**Figure 54**). En effet, des expériences d'immunomarquages réalisées sur des chromosomes polythènes révèlent qu'il n'y a pas de colocalisation entre Mip130 et l'ARN polymérase II sous sa forme phosphorylée qui permet de détecter les régions transcriptionnellement actives du génome (Korenjak *et al.*, 2004). De plus, l'expression d'ARN interférent dirigé contre *mip130*, *mip120*, *mip40* ou *caf1* dans des cellules de drosophile en culture conduit à une augmentation du niveau d'ARNm de 4 gènes cibles de dE2F2 à savoir *vasa*, *pyrexia*, *PAS kinase* et *arp53D* (Korenjak *et al.*, 2004). Cela suggère que le complexe dREAM participe à la répression transcriptionnelle des gènes cibles des facteurs dE2Fs.

Toutefois l'expression d'un ARNi dirigé contre *dmyb* n'entraine pas de dérépression de ces quatre gènes bien que des expériences de ChIP aient démontré la présence de dMyb au niveau des promoteurs de ces gènes (Korenjak *et al.*, 2004). Diverses études ont permis de mettre en évidence que dMyb peut agir comme un activateur transcriptionnel (Hou *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2002). Ceci a conduit à l'hypothèse que dMyb est un membre silencieux du complexe dREAM concernant la répression transcriptionnelle mais que dans un tissu donné et en réponse à des signaux développementaux appropriés, dMyb permettrait la dérépression ou l'activation des gènes cibles du complexe dREAM (Beall *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2004). Ce rôle opposé de dMyb et de certaines protéines du complexe dREAM, comme les Mips, est confirmé par des données génétiques. En effet, la perte de fonction de *mip130*, *mip120* ou *mip40* supprime la létalité associée à la perte de fonction de *dmyb* (Beall *et al.*, 2004; Beall *et al.*, 2007).

Diverses études ont finalement permis de mettre en évidence que le complexe dREAM est présent au niveau de la plupart des promoteurs des gènes régulés par les facteurs dE2Fs et que les différents composants de ce complexe sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des différents gènes cibles (Georlette *et al.*, 2007; Korenjak *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2004; Taylor-Harding *et al.*, 2004).

Bien que les premières études décrivaient le complexe dREAM exclusivement comme un répresseur transcriptionnel, il a, par la suite, été mis en évidence que ce complexe peut également agir comme un activateur transcriptionnel. En effet, la perte de fonction des différents composants du complexe peut conduire à une augmentation ou à une diminution du niveau de transcrit des différents gènes cibles des facteurs dE2Fs. De plus, une élégante étude réalisée en cellules de drosophile a permis de révéler la complexité de la régulation transcriptionnelle assurée par le complexe dREAM (Georlette *et al.*, 2007). En effet, tous les membres du complexe dREAM ne sont pas impliqués dans la régulation de la transcription d'un gène cible donné : la perte de fonction de l'un des membres peut ne pas altérer le niveau de transcription du gène considéré alors que la déplétion d'un autre membre du complexe va considérablement faire varier ce niveau de transcription. En outre, parmi les membres impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'un gène d'intérêt, certains membres assurent des rôles opposés : la perte de fonction d'un membre du complexe conduit à une augmentation du niveau d'ARNm du gène cible donné alors que la perte de fonction d'un autre membre du complexe va au contraire induire une réduction de ce niveau d'ARNm. Ainsi les différents membres du complexe assurent des fonctions différentes concernant la transcription d'un gène cible donné : les sous-unités du complexe dREAM

peuvent ne pas être impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ce gène cible et dans le cas où elles sont impliquées elles peuvent assurer un rôle positif ou négatif. En outre, il est important de noter que l'importance fonctionnelle et le rôle positif ou négatif de chaque membre du complexe varie d'un gène cible à l'autre. Ainsi le taux d'expression d'un gène cible particulier dans un tissu donné et à un moment précis du développement est la conséquence de l'intégration de l'effet propre de tous les membres du complexe dREAM. Cette étude indique également qu'il n'y a pas de gènes régulés négativement par dE2F2 et dMyb. Par contre, de nombreux gènes sont régulés négativement par dE2F2 et positivement par dMyb. Ces deux protéines semblent donc globalement avoir un rôle opposé au sein du complexe : la plupart du temps dE2F2 favorise la répression transcriptionnelle alors que dMyb stimule l'activation de la transcription des gènes cibles du complexe dREAM.

Des données transcriptomiques indiquent que Lin-52 semble agir avec dMyb pour s'opposer à l'action répressive des autres membres du complexe dREAM (Lewis *et al.*, 2012). En effet, dans 76% des cas l'activation transcriptionnelle assurée par dMyb requière Lin-52. Le rôle antagoniste de Lin-52 et des autres membres du complexe dREAM a été confirmé par des expériences génétiques. Par exemple, la perte de fonction de *lin-52* est létale au stade larvaire mais un sauvetage de cette létalité est observé dans un contexte mutant pour *mip40* (Lewis *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que Lin-52 et dMyb s'opposent à l'action répressive des autres membres du complexe dREAM au niveau de locus génomique spécifique et permettent d'outrepasser cette répression dans certains contextes développementaux. Un exemple de ce genre de régulation pour lequel cette balance entre activation dépendante de dMyb et répression dépendante de dE2F2 joue un rôle crucial a été récemment identifié. C'est le cas des neurones olfactifs qui n'expriment qu'un seul type de récepteur olfactif. De façon intéressante, dMyb est requis pour l'expression du récepteur du dioxyde de carbone dans les neurones spécialisés alors que dE2F2 et les autres membres répresseurs du complexe répriment l'expression de ce récepteur dans les neurones inappropriés (Sim *et al.*, 2012).

(3) Quel composant du complexe dREAM est responsable du recrutement du complexe au niveau d'un gène cible donné ?

Au sein du complexe dREAM, cinq protéines sont capables de lier directement l'ADN : dMyb, dE2F2, dDP et Mip120 lient l'ADN de façon séquence spécifique alors que Mip130 possède un domaine capable de lier les régions riches en AT. Les autres membres du complexe ne sont pas connus pour lier directement l'ADN mais peuvent influencer le recrutement du complexe au niveau de la chromatine par l'intermédiaire d'interaction avec les histones. De façon intéressante, dMyb et dE2F2 semblent agir de façon mutuellement exclusive pour recruter le complexe dREAM sur la chromatine (Georlette *et al.*, 2007). En effet, il existe un sous-groupe de gènes cibles du complexe dREAM pour lequel la répression transcriptionnelle dépend de dE2F2 mais n'implique pas dMyb. 97% de ces gènes contiennent un site consensus de fixation pour les facteurs dE2Fs et la déplétion de *de2f2* conduit à une réduction du recrutement de Mip120 et Mip130. A l'inverse, il existe une autre catégorie de gènes

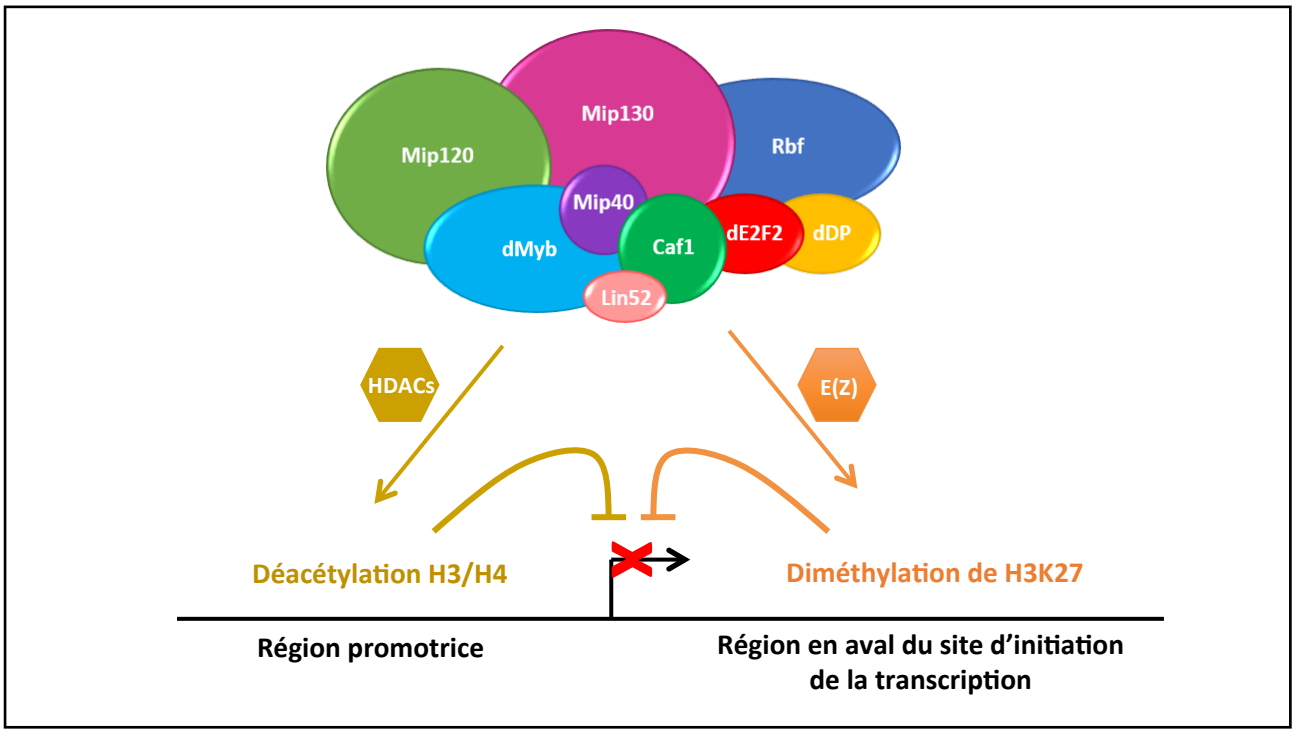


Figure n°55 : Mécanisme de répression transcriptionnelle par le complexe dREAM

Le complexe dREAM réprime la transcription de ses gènes cibles par deux mécanismes distincts. D'une part, en recrutant des histones déacétylases (HDACs), le complexe dREAM favorise la déacétylation des histones H3 et H4 au niveau de la région promotrice du gène d'intérêt. D'autre part, le complexe dREAM induit la diméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 de façon dépendante de la protéine E(Z) au niveau de la région située en aval du site d'initiation de la transcription. Ces deux actions distinctes du complexe dREAM coopèrent pour assurer une répression efficace de l'expression des gènes cibles du complexe.

Adapté de Lee *et al.,* 2010

dont la transcription est réprimée par dMyb mais pas par dE2F2. 87% de ces gènes contiennent un site consensus de fixation pour Myb et la déplétion de *dmyb* conduit à une réduction du recrutement de Mip120 et Mip130.

(4) Comment le complexe dREAM régule-t-il la transcription ?

Les différents composants du complexe dREAM n'ont pas d'activité enzymatique connue. Différentes études ont donc été menées pour essayer de comprendre comment le complexe dREAM régule la transcription. Etant donné que ce complexe a d'abord été décrit comme un complexe répresseur, les études se sont principalement focalisées sur les mécanismes sous-jacents à la répression transcriptionnelle permise par ce complexe. Le complexe dREAM peut lier la queue de l'histone H4 sous sa forme non acétylée *in vitro*. Cette interaction est abolie en cas d'acétylation de l'histone H4 (Korenjak *et al.*, 2004). Cela a conduit l'équipe d'Alexander Brehm à proposer l'hypothèse suivante : le complexe dREAM pourrait interagir *in vivo* avec les nucléosomes déacétylés et cette liaison protègerait la chromatine afin qu'elle ne soit pas la cible de modifications activatrices. Ainsi le complexe dREAM permettrait une répression transcriptionnelle.

Par ailleurs, une interaction physique entre l'histone déacétylase Rpd3 et le complexe dREAM a été mise en évidence (Taylor-Harding *et al.*, 2004) ce qui a conduit à penser qu'une déacétylation des histones pouvait au moins en partie être responsable de la répression transcriptionnelle induite par le complexe dREAM. Toutefois, des données indiquaient qu'en dépit de cette interaction, Rpd3 ne serait pas requis pour la répression transcriptionnelle dépendante de dE2F2 et des protéines Rbfs (Georlette *et al.*, 2007; Korenjak *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010b; Lewis *et al.*, 2004; Taylor-Harding *et al.*, 2004).

Une étude réalisée par l'équipe de Dessislava Dimova a ensuite permis de détailler un peu plus le mécanisme d'action du complexe dREAM. Cette étude indique que deux mécanismes participent à la répression transcriptionnelle assurée par le complexe dREAM (**Figure 55**). D'une part, le complexe dREAM favorise la déacétylation des histones au niveau de la région promotrice du gène cible. Cette déacétylation implique plusieurs histones déacétylases qui semblent agir de façon redondante (Lee *et al.*, 2010b). Cette redondance fonctionnelle explique que la déplétion de *rpd3* ne conduit pas à une dérépression des gènes cibles du complexe dREAM. D'autre part, le complexe dREAM induit une diméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 au niveau des nucléosomes situés en aval du site d'initiation de la transcription. Cette diméthylation est dépendante de la protéine E(Z) (enhancer of zeste) appartenant au groupe Polycomb (Lee *et al.*, 2010b).

Récemment, le profil de liaison des protéines du complexe dREAM a été comparé à celui d'autres protéines de liaison à la chromatine (Korenjak *et al.*, 2014). Ainsi, il a été mis en évidence un chevauchement entre les sites de liaison de dREAM et les sites de liaisons des protéines CP-190 (Centrosomal protein 190kD) et Beaf-32 (Boundary element-associated factor of 32kD) (Bohla *et al.*, 2014; Korenjak *et al.*, 2014). Ces deux protéines sont des protéines de liaison aux éléments isolateurs (« insulators »). Les isolateurs sont des séquences d'ADN qui n'ont pas d'effet propre sur l'activité des promoteurs mais qui protègent les promoteurs de l'influence

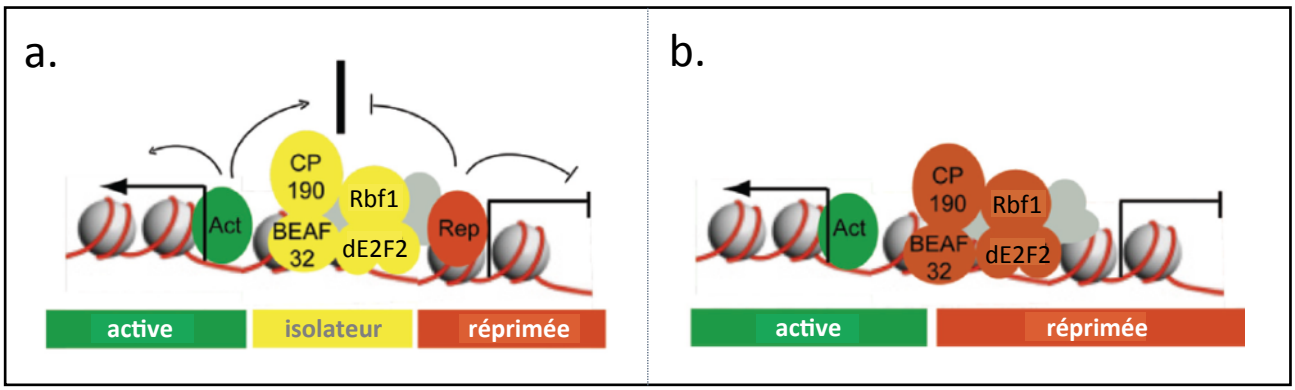


Figure n°56 : Modèle du rôle du complexe dREAM et des protéines de liaison aux isolateurs au niveau d'un couple de DPG.

(a) Le complexe dREAM et les protéines CP-190 et Beaf-32 comme élément frontière : ces protéines pourraient établir une frontière entre deux domaines chromatiniens régulés indépendamment l'un de l'autre et de façon opposée. Ces protéines éviteraient donc la propagation de l'activation transcriptionnelle assurée par un activateur (Act) vers la région adjacente réprimée (en rouge) et inversement le complexe dREAM associé à CP-190 et Beaf-32 au niveau de l'élément isolateur (en jaune) empêche le répresseur (Rep) d'inhiber la transcription de la région adjacente qui est normalement active (en vert).

(b) Le complexe dREAM et les protéines CP-190 et Beaf-32 comme répresseur transcriptionnel : la perte du complexe répresseur dREAM/CP-190/Beaf-32 conduirait à une activation transcriptionnelle du gène normalement réprimé du fait d'une action de l'activateur adjacent ou de la libération d'un site de liaison pour un autre activateur.

Adapté de Korenjak *et al.*, 2014

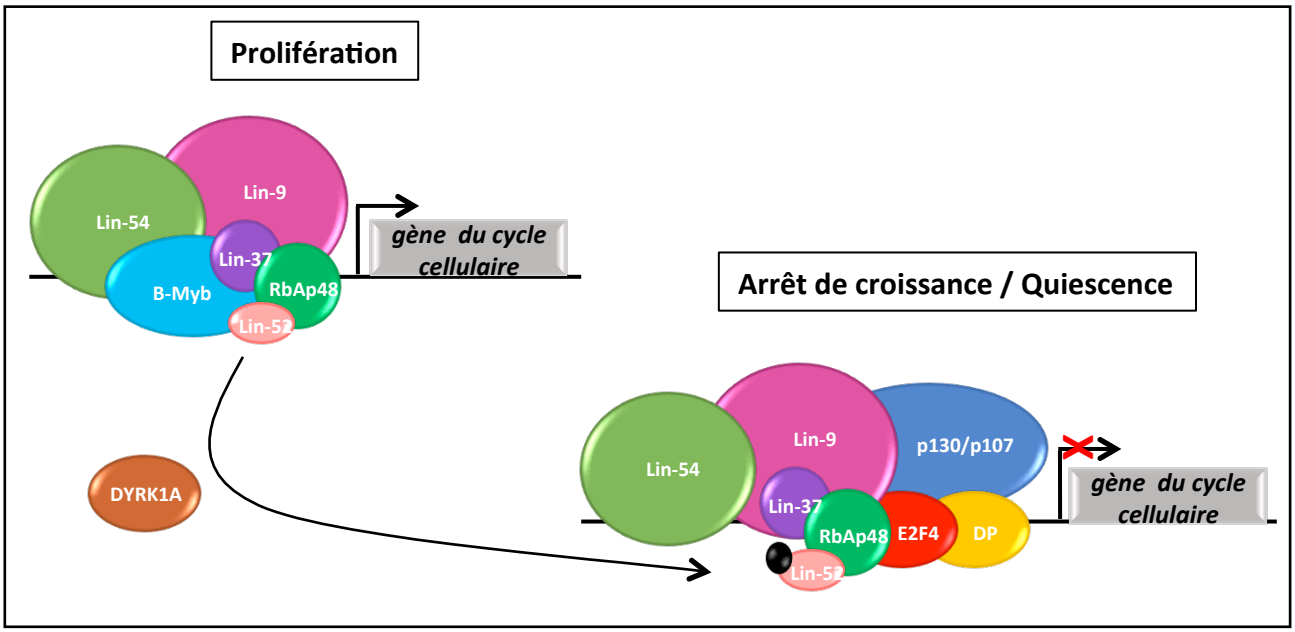
d'éléments stimulateurs (« enhancers ») ou d'éléments répresseurs (« silencers »). En effet, quand il est placé entre le promoteur et l'enhancer, l'isolateur bloque la communication entre ces deux éléments. L'isolateur peut également agir comme une barrière physique en évitant la propagation de l'effet silencer sur un promoteur voisin. Ainsi les isolateurs constituent des bornes délimitant la zone d'influence des éléments silencers et enhancers. Les protéines de liaison aux isolateurs sont requises pour limiter cette zone d'influence (Van Bortle and Corces, 2012). Des expériences de ChIP-ReChIP ont permis de mettre en évidence que le complexe dREAM, CP-190 et Beaf-32 s'associent simultanément à une région génomique donnée (Korenjak *et al.*, 2014). De plus, une interaction physique a été mise en évidence entre dE2F2 et CP-190 et dE2F2 est requis pour le recrutement de CP-190 au niveau de la chromatine. En outre, des analyses génétiques ont permis de mettre en évidence que ces différentes protéines coopèrent *in vivo* pour assurer leur fonction (Korenjak *et al.*, 2014).

Deux gènes voisins peuvent être arrangés de trois façons différentes selon leur sens respectif de transcription. Chez la drosophile, 32% des gènes sont transcrits dans des directions opposées et leur site d'initiation de la transcription sont séparés de moins de 1000 paires de bases (Yang and Yu, 2009). On parle de gènes appariés divergents (DPG pour « divergently paired genes »). Plus de 70% des gènes réprimés par le complexe dREAM font partis d'un couple de DPG (Korenjak *et al.*, 2014). Les deux gènes de ces couples sont régulés de façon opposée, l'un est fortement transcrit alors que l'expression de l'autre est stablement réprimée. De façon intéressante, il a été mis en évidence que le complexe dREAM et CP-190 coopèrent au niveau des DPG pour établir une frontière entre le gène stablement réprimé et le gène fortement transcrit. La perte de fonction de *de2f2* ou de *mip130* conduit à une augmentation du taux de transcription du gène normalement réprimé alors que le second gène du couple voit son niveau de transcription réduit (Korenjak *et al.*, 2014). Il y a donc une régulation inverse de la transcription des gènes d'un couple de DPG. Toutefois, le mécanisme précis de la régulation transcriptionnelle, pour un couple de DPG, assurée par le complexe dREAM, en collaboration avec CP-190, reste à déterminer. Plusieurs modèles ont été envisagés pour expliquer le rôle du complexe dREAM dans la régulation de la transcription des DPG qui sont différentiellement exprimés (**Figure 56**). Tout d'abord, dREAM, CP-190 et Beaf-32 pourraient servir de frontière au niveau des DPG en séparant un domaine chromatinien actif d'un domaine réprimé. On peut également envisager que dREAM, CP-190 et Beaf-32 soient impliqués dans l'inhibition de la transcription du gène stablement réprimé. En absence de dREAM, le site serait accessible à un facteur de transcription. Après inactivation de dREAM ou de CP-190/Beaf-32, il y aurait une redistribution de la machinerie générale de transcription et/ou d'activateurs spécifiques depuis le gène transcrit du couple vers le gène normalement réprimé. Enfin on ne peut pas exclure la possibilité que dREAM agisse directement sur les deux gènes du couple de DPG en servant de répresseur pour l'un et d'activateur pour l'autre.

Au-delà d'un éventuel remodelage de la chromatine ou d'une action dépendante de séquences isolateurs, il a été proposé que le complexe dREAM assure une régulation épigénétique. Au sein des disques imaginaux d'aile, dMyb est requis pour l'expression du gène *polo* qui code pour un régulateur de l'assemblage des pôles du fuseau mitotique. A l'inverse, l'expression ectopique de *de2f2* est suffisante pour inhiber l'expression de *polo*. De façon inattendue, on observe une variégation de l'expression d'un gène rapporteur

Membre du complexe dREAM chez la drosophile	Membre du complexe DRM chez le nématode	Membre du complexe DREAM chez l'Homme
Rbf1 Rbf2	Lin-35	p107 p130
dE2F2	dEFL-1	E2F4 E2F5
dDP	DPL-1	DP1 DP2
Caf1	Lin-53	RbAp48
dMyb		B-Myb
Mip130	Lin-9	Lin-9
Mip120	Lin-54	Lin-54
Mip40	Lin-37	Lin-37
Lin-52	Lin-52	Lin-52

<u>Figure n°57</u> : Complexes dREAM/DRM/DREAM chez la drosophile, le nématode et l'Homme
Les membres du complexe dREAM chez la drosophile et leurs homologues chez le nématode et l'Homme sont listés dans le tableau ci-dessus.
Adapté de Van den Heuvel and Dyson, 2008



<u>Figure n°58</u> : Rôle du complexe DREAM dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères
Dans les cellules en prolifération (à gauche), le complexe DREAM contenant B-Myb participe à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles des facteurs E2Fs impliqués dans le cycle cellulaire. La kinase DYRK1A est capable de phosphoryler Lin-52, un des membres du complexe DREAM. Cette phosphorylation conduit à un changement de la composition du complexe DREAM. Ce dernier ne contient plus B-Myb mais contient E2F4/DP et p107 ou p130. Sous cette forme le complexe assure la répression des gènes cibles des facteurs E2Fs impliqués dans le cycle cellulaire et permet ainsi un arrêt de la prolifération et une entrée en quiescence.
Adapté de Decaprio and Duensing, 2014 et Fischer *et al.,* 2014

GFP-polo dans le cas d'un contexte double mutant pour *dmyb* et *mip130* ou *dmyb* et *de2f2*. En effet, des groupes adjacents de cellules ont alternativement un niveau élevé ou fortement réduit de GFP-Polo. Ces faibles ou forts niveaux d'expression sont hérités à travers les cycles de division cellulaire (Wen *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que le complexe dREAM aurait un rôle épigénétique dans la régulation de l'expression des gènes.

(5) Présence d'un complexe DREAM dans les cellules humaines

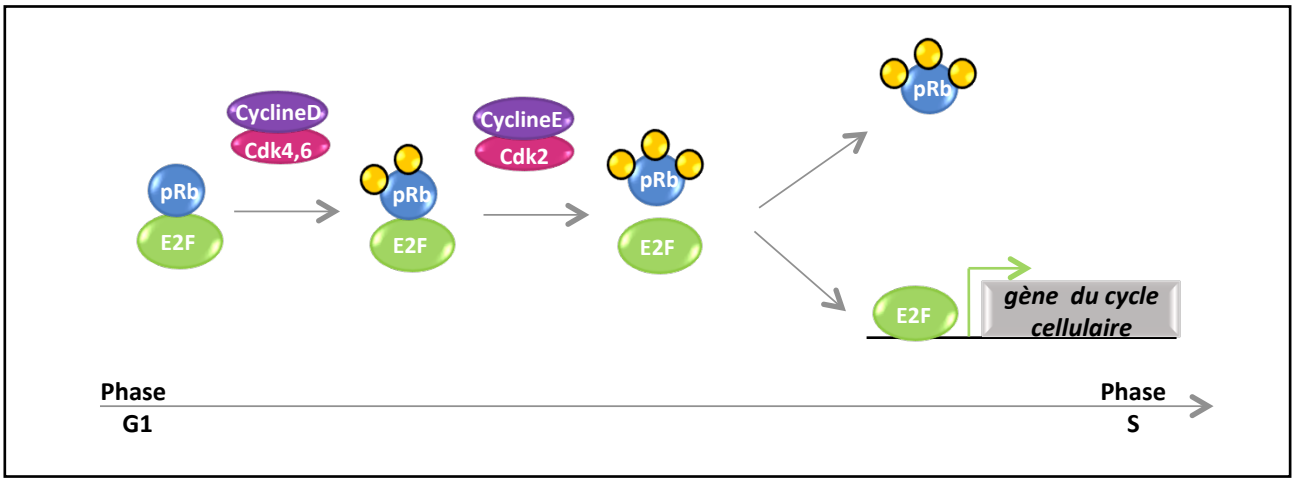
Un complexe similaire au complexe dREAM a été identifié dans les cellules humaines, le complexe DREAM (**Figure 57**) (Litovchick *et al.*, 2007; Pilkinton *et al.*, 2007; Schmit *et al.*, 2007). Toutefois, ce complexe ne contient pas la protéine pRb. Néanmoins, pRb peut interagir avec le complexe dans certaines conditions et favoriser le recrutement du complexe DREAM au niveau de certains promoteurs (Gordon and Du, 2011). La protéine p130 est le principal représentant de la famille Rb au sein du complexe, bien que p107 puisse en faire partie. De même, le complexe contient majoritairement E2F4, même si E2F5 peut faire partie du complexe. De plus, contrairement à ce qui est observé chez la drosophile, la composition du complexe varie en fonction de l'état prolifératif des cellules. Le cœur du complexe comprend les protéines RbAp48 (homologue de Caf1), Lin-9 (homologue de Mip130), Lin-54 (homologue de Mip120), Lin-37 (homologue de Mip40) et Lin-52 (homologue de Lin-52). Ce cœur du complexe s'associe soit à B-Myb soit à p130 et E2F4/DP en fonction des conditions de prolifération.

Dans des cellules non prolifératives, le complexe DREAM comprend p130 et E2F4/DP, par contre B-Myb n'appartient pas au complexe dans ces conditions. Il a été mis en évidence que la phosphorylation de Lin-52 par la kinase DYRK1A (dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) est requise pour que le complexe se lie à p130 et E2F4/DP dans des conditions de quiescence (Litovchick *et al.*, 2011). Sous cette forme le complexe DREAM réprime l'expression des gènes cibles des facteurs E2Fs impliqués dans le cycle cellulaire dans les cellules quiescentes et sénescentes (Litovchick *et al.*, 2011; Litovchick *et al.*, 2007; Schmit *et al.*, 2007; Tschop *et al.*, 2011). Dans des cellules en prolifération, au cours de la phase S du cycle cellulaire, p130 et E2F4/DP se dissocient du complexe. Le complexe peut alors se lier à B-Myb et Fox-M1 et ainsi favoriser la mitose et la division cellulaire (Litovchick *et al.*, 2007; Sadasivam *et al.*, 2012; Schmit *et al.*, 2007) (**Figure 58**).

Depuis son identification, plusieurs études ont attribué au complexe DREAM un rôle de suppresseur de tumeur dans les carcinomes cervicaux associés au papillomavirus humain (DeCaprio, 2014; Fischer *et al.*, 2014; Nor Rashid *et al.*, 2011). Des études visant à utiliser le complexe DREAM comme cible thérapeutiques sont actuellement en cours (Boichuk *et al.*, 2013; DeCaprio and Duensing, 2014).

e) Effet de l'ubiquitination sur l'activité transcriptionnelle de Rbf1

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le pouvoir répresseur de Rbf1 est lié à sa capacité d'une part d'inhiber l'activité de dE2F1 et d'autre part de coopérer avec dE2F2 au sein du complexe dREAM. Il existe, comme on pouvait s'y attendre, un fort enrichissement du motif de liaison des facteurs dE2Fs au niveau des régions proximales des promoteurs des gènes liés par Rbf1 (Acharya *et al.*, 2012). De façon intéressante, un nombre croissant d'étude indique que l'ubiquitination de Rbf1 joue un rôle important dans la régulation de son activité transcriptionnelle. Comme décrit précédemment, Rbf1 possède en C-terminal un domaine IE qui contribue à son instabilité en favorisant sa dégradation par le protéasome (Acharya *et al.*, 2010; Ullah *et al.*, 2007). Plus précisément, ce domaine stimule l'ubiquitination de Rbf1 *in vivo* (Raj *et al.*, 2012b). De façon inattendue, la délétion du domaine IE réduit fortement l'activité de répresseur transcriptionnel de Rbf1 bien qu'elle conduise à une stabilisation de la protéine Rbf1 (Acharya *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que la capacité de régulateur transcriptionnel de Rbf1 est directement liée au processus qui permet sa dégradation. Cette relation paradoxale a été mise en évidence, chez les mammifères, pour d'autres régulateurs transcriptionnels comme c-Jun, c-Fos, Myc et E2F1 (Salghetti *et al.*, 2001; Salghetti *et al.*, 1999; Salghetti *et al.*, 2000). Tous possèdent un signal de dégradation dans une région proche du domaine contrôlant la transcription. Une hypothèse envisagée est que l'ubiquitination jouerait un rôle direct dans la régulation de l'activité transcriptionnelle, par exemple en permettant le recrutement d'un cofacteur. Des données obtenues récemment soutiennent l'idée que la présence d'ubiquitine modulerait l'activité de répresseur transcriptionnel de Rbf1 (Zhang *et al.*, 2014). L'inhibition du protéasome par le MG132 conduit à une augmentation du taux de Rbf1 ubiquitiné. Cette augmentation est corrélée à un accroissement du pouvoir répresseur de Rbf1 sur un rapporteur *pcna* (Raj *et al.*, 2012b). Le MG132 ayant des effets pléiotropes, Raj *et al.* ont utilisé une protéine de fusion Ubiquitine-Rbf1 afin d'étudier directement l'effet de l'ubiquitination sur la fonction de Rbf1. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence que la présence d'ubiquitine augmente significativement l'activité de répresseur de Rbf1. Toutefois, cet effet de la présence d'ubiquitine sur le pouvoir répresseur de Rbf1 est dépendant du promoteur considéré (Raj *et al.*, 2012b). En effet, les gènes régulés par Rbf1 de façon dépendante de dEF2F1 seraient sensibles à la présence d'ubiquitine alors que ceux régulés de façon indépendante de dE2F1 ne le seraient pas. De façon cohérente avec le rôle attribué à l'ubiquitine dans le contrôle de l'activité de régulateur transcriptionnel de Rbf1, une interaction entre l'enzyme E3 ubiquitine ligase Ebi et Rbf1 a été mise en évidence (Lim *et al.*, 2013). De plus, l'expression d'un ARNi dirigé contre *ebi* dans des cellules de drosophile en culture conduit à une dérépression des gènes cibles de dE2F1 (Lim *et al.*, 2013). Bien que cela ne soit pas démontré, on peut supposer qu'Ebi soit l'enzyme responsable de l'ubiquitination de Rbf1 ce qui fournirait un mécanisme moléculaire pour expliquer le rôle d'Ebi dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de dE2F1. A la vue de ces données, on peut donc envisager l'existence d'un code de modifications post-traductionnelles de Rbf1 qui permettrait une répression gène spécifique au cours du développement.



<u>Figure n°59</u> : Régulation de la transition G1/S par pRb et les facteurs E2Fs

Au début de la phase G1 du cycle cellulaire, pRb est hypophosphorylé. Sous cette forme, il lie les facteurs E2Fs activateurs et inhibe leurs activités transcriptionnelles. Au cours de la phase G1, du fait de l'action séquentielle de différents couples cycline/cdk, pRb devient hyperphosphorylé. Ces phosphorylations conduisent à la dissociation du complexe pRb/E2Fs activateurs. Ainsi les E2Fs activateurs peuvent induire la transcription des gènes nécessaires à l'entrée en phase S.

C. pRb et Rbf1 assurent un grand nombre de fonctions biologiques

pRb et Rbf1 sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires. Ils sont notamment tous les deux impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la croissance. Ainsi pRb et Rbf1 contrôlent l'homéostasie tissulaire. Je vais présenter ici brièvement le rôle le mieux caractérisé de pRb et Rbf1 c'est-à-dire celui de contrôle de la prolifération cellulaire. Puis, je décrirais de façon plus détaillée leur rôle dans le contrôle de l'apoptose, car c'est à cet aspect de leur fonction cellulaire que je me suis plus particulièrement intéressée au cours de mes travaux de thèse.

1. pRb et Rbf1 régulent la prolifération cellulaire

a) Rôle de pRb dans la transition G1/S : mécanisme moléculaire

La fonction la mieux décrite de pRb est son rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette fonction sont bien décrits (**Figure 59**). Dans les cellules quiescentes, et au début de la phase G1 du cycle cellulaire, pRb et les facteurs E2Fs forment des complexes répresseurs qui empêchent la transcription des gènes requis pour l'entrée en phase S. Cette répression est levée à la transition G1/S du cycle cellulaire du fait de l'action combinée des différents couples cycline/cdk. En effet, au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, en réponse à des signaux mitogènes, la cycline D s'accumule. Cette cycline s'associe avec les kinases cdk4/6 pour former un complexe capable de phosphoryler pRb (Harbour *et al.*, 1999). Cette phosphorylation initiale conduit à la dissociation du complexe pRb/E2F1. E2F1 peut alors transactiver le promoteur de la *cycline E* (Ohtsubo *et al.*, 1995). A la fin de la phase G1, la cycline E qui s'est accumulée forme un complexe avec cdk2. Les complexes cdk2/cycline E phosphorylent des sites additionnels de pRb ce qui permet de bloquer complètement l'interaction entre pRb et E2F1 (Harbour *et al.*, 1999). E2F1 peut alors activer la transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des facteurs nécessaires à l'entrée en phase S.

Ainsi, au cours du cycle cellulaire, quand les cellules progressent de la phase G1 à la phase S, la phosphorylation séquentielle de pRb par les différents complexes cycline/cdk permet la libération de E2F1 et l'activation des gènes requis pour l'entrée en phase S (Classon and Harlow, 2002; Longworth and Dyson, 2010; Sherr, 2000). La protéine pRb reste sous sa forme hyperphosphorylée jusqu'à la mitose où elle sera déphosphorylée par l'enzyme PP1 (Protein phosphatase 1) pour permettre l'entrée dans la phase G1 suivante (Kolupaeva and Janssens, 2012).

b) Rôle de Rbf1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire

La capacité de membres des familles Rb/E2F de contrôler la prolifération cellulaire est conservée chez la drosophile. En effet, la perte de fonction de *de2f1* réduit sévèrement la réplication de l'ADN et la prolifération

cellulaire au stade embryonnaire (Duronio *et al.*, 1995; Royzman *et al.*, 1997). De même, les clones cellulaires mutants pour *de2f1* échouent à proliférer (Brook *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1998). Ces données indiquent que dE2F1 est essentiel pour la prolifération cellulaire normale *in vivo*. De façon cohérente avec ces données dE2F1 régule positivement l'expression de gènes nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire (Duronio *et al.*, 1995; Neufeld *et al.*, 1998; Ohtani and Nevins, 1994). A l'inverse, l'expression ectopique de *de2f1* et *ddp* dans les cellules post-mitotiques au sein du disque imaginal d'œil induit une entrée anormale des cellules en phase S. Ces phases S ectopiques sont supprimées dans le cas de la co-expression de *rbf1* avec *de2f1/ddp* (Du *et al.*, 1996a) ce qui suggère un rôle d'inhibiteur de la prolifération pour Rbf1.

La capacité de Rbf1 d'inhiber la prolifération cellulaire a été confirmée par d'autres études. En effet, les cellules épidermales de l'embryon de drosophile s'arrêtent normalement en G1 à l'issue du 16ème cycle de division mitotique. Toutefois, les embryons dépourvus de *rbf1* échouent à maintenir cet arrêt en G1 (Du and Dyson 1999). Par conséquent, Rbf1 est requis pour une sortie correcte du cycle cellulaire au cours du développement embryonnaire. Au sein des disques imaginaux d'œil, il existe une redondance fonctionnelle entre *rbf1* et *dacapo* concernant l'arrêt de prolifération des photorécepteurs. Le gène *dacapo* code pour un inhibiteur des complexes cycline/cdk, c'est l'homologue de drosophile des protéines p21/p27 de mammifères. Ni la perte de fonction de *rbf1*, ni celle de *dacapo* n'altère la sortie du cycle cellulaire des photorécepteurs au cours du développement du disque imaginal d'œil. Par contre, suite à la perte de fonction conjointe de ces deux gènes, les photorécepteurs sont incapables d'arrêter de proliférer (Firth and Baker, 2005). Bien que la protéine Rbf1 soit un régulateur important du cycle cellulaire, elle agit dans certains contextes développementaux de façon redondante avec Dacapo pour empêcher la prolifération des cellules différenciées ou en cours de différenciation (Buttitta *et al.*, 2007; Firth and Baker, 2005).

Comme pRb, l'activité de Rbf1 vis-à-vis du cycle cellulaire est contrôlée par phosphorylation. Rbf1 possède 7 sites de phosphorylations qui sont des cibles potentiels pour les complexes cycline D/Cdk4,6 et cycline E/cdc2 (Du *et al.*, 1996a; Xin *et al.*, 2002). Des expériences génétiques indiquent que la cycline E peut inhiber l'activité de Rbf1 (Du *et al.*, 1996a). Par ailleurs, il a été mis en évidence dans des cellules de drosophile en culture que les complexes cycline D/Cdk4,6 et cycline E/cdc2 inhibent l'activité de Rbf1 ce qui permet de restaurer la transactivation par dE2F1 (Xin *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que la phosphorylation de Rbf1, par ces complexes, inhibe son pouvoir répresseur vis-à-vis de dE2F1, par contre, cela n'inhibe pas sa capacité à coopérer avec dE2F2, notamment pour la répression transcriptionnelle des gènes de différenciation (Frolov *et al.*, 2003). En outre, au sein du complexe dREAM, Rbf1 peut être présent sous une forme hyperphosphorylé (Lewis *et al.*, 2004).

c) *Rôle de pRb dans la prolifération cellulaire : explication de son rôle de suppresseur de tumeurs ?*

De façon simpliste, on considère souvent que l'inhibition du cycle cellulaire par pRb explique, à elle seule, la fonction de suppresseur de tumeurs de cette protéine. Comme pRb, les protéines p107 et p130 inhibent le cycle cellulaire en réprimant la transcription dépendante des facteurs E2Fs, mais seul *rb* est fréquemment retrouvé muté dans les cancers (Knudsen and Knudsen, 2008). Ceci suggère que certaines cellules cancéreuses conservent la capacité d'inhiber les gènes cibles des facteurs E2Fs requis pour la progression dans le cycle cellulaire. Ces données laissent penser que la régulation négative du cycle cellulaire n'est pas le seul moyen pour pRb d'agir comme suppresseur de tumeur.

2. Rôle complexe de pRb et Rbf1 vis-à-vis de l'apoptose

En plus de son rôle bien décrit dans le contrôle du cycle cellulaire, pRb joue un rôle dans le contrôle de l'apoptose. De façon surprenante, les premières études réalisées attribuaient une fonction anti-apoptotique à pRb, ce qui semble contradictoire avec son rôle de suppresseur de tumeur. Par la suite, un rôle pro-apoptotique de pRb a également été démontré. Comme nous le verrons dans ce qui suit, ce rôle double vis-à-vis de l'apoptose est conservé chez la drosophile. Les protéines pRb et Rbf1 assurent donc un rôle complexe dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose. Je vais, dans un premier temps, présenter les fonctions anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de pRb. Puis dans un second temps, je m'attacherais à décrire celles attribuées à Rbf1.

a) *pRb : un facteur anti-apoptotique ?*

(1) Description des phénotypes des embryons de souris *rb*$^{-/-}$

pRb a longtemps été considéré uniquement comme un facteur anti-apoptotique. Cela est en partie dû à l'interprétation des phénotypes observés dans les embryons de souris KO pour *rb*. En effet, chez la souris, la perte de fonction de *rb* est létale au stade embryonnaire et les embryons déficients pour *rb* présentent un niveau élevé d'apoptose dans le système nerveux, le foie, le cristallin, la lignée érythroïde et les muscles squelettiques (Clarke *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992). Il a été mis en évidence que la perte de fonction d'*e2f1* ou de *p53* supprime l'apoptose observée au sein des embryons *rb*$^{-/-}$ dans le système nerveux central et le cristallin (Macleod *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que la perte de fonction d'*apaf1,* un gène pro-apoptotique cible d'E2F1 et de p53, supprime l'apoptose du système nerveux des embryons *rb*$^{-/-}$ (Guo *et al.*, 2001). De même, cette mort cellulaire est abolie dans le cas de la perte de fonction de la *caspase 3* (Simpson *et al.*, 2001). Ces données indiquent que la machinerie d'apoptose est impliquée dans la mort cellulaire observée suite à la perte de fonction de *rb*. Ce phénotype d'apoptose des embryons *rb*$^{-/-}$ a conduit à penser que pRb protégeait les cellules de la mort cellulaire et assurait donc une fonction anti-apoptotique.

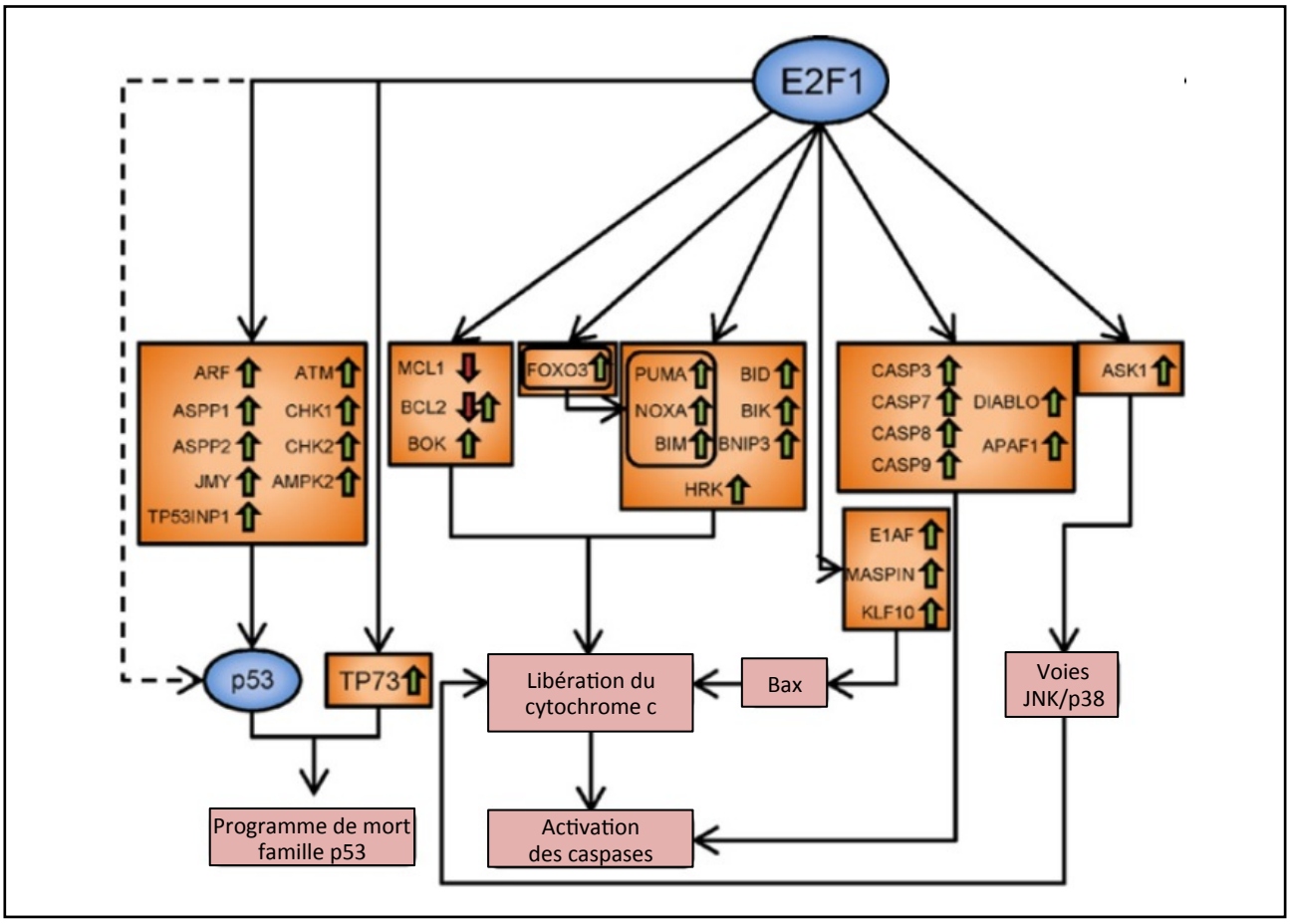
Toutefois, il a par la suite été démontré que la majorité de l'apoptose observée dans le système nerveux central et la lignée érythroïde des embryons KO pour *rb* était en réalité la conséquence d'une malformation des annexes embryonnaires (de Bruin *et al.*, 2003; Dyson, 2003; Wenzel *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003). En effet, les embryons $rb^{-/-}$ qui se développent en présence d'annexes embryonnaires de génotypes sauvages montrent une réduction importante du nombre de cellules apoptotiques, si on les compare à des embryons identiques mais ayant des annexes embryonnaires $rb^{-/-}$. Ces données indiquent qu'une partie, au moins, de la mort cellulaire observée au sein des embryons $rb^{-/-}$ est un effet non-autonome cellulaire de la perte de fonction de *rb* dans les annexes embryonnaires. Plus précisément, il a été mis en évidence que la perte de fonction de *rb* conduit à une surprolifération des cellules du placenta ce qui altère l'architecture normale et la vascularisation de ce tissu et conduit *in fine* à une hypoxie des tissus embryonnaires (de Bruin *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003). Néanmoins, les embryons $rb^{-/-}$, qui se développent en présence d'annexes sauvages, présentent toujours un niveau élevé d'apoptose dans les cellules du cristallin et des muscles squelettiques, donc dans des cellules en cours de différenciation. Il est important de noter que cette apoptose s'accompagne d'un excès de prolifération cellulaire. Il a été envisagé que la perte de fonction de *rb* conduise à une prolifération anormale des cellules en cours de différenciation du fait d'une activité anarchique des facteurs E2Fs et que cette prolifération ectopique soit elle-même responsable de la mort des cellules (Chau and Wang, 2003). Au sein de ces cellules, la présence de signaux contradictoires (prolifération *versus* différenciation) serait à l'origine de la mort par apoptose.

Une étude réalisée en 2004 soutient cette idée. La délétion de *rb,* dans des myoblastes en cours de différenciation, conduit à une augmentation du taux d'apoptose alors que, la délétion de ce gène au sein des fibres musculaires, donc au sein de cellules ayant achevé leur processus de différenciation n'induit pas de mort cellulaire (Huh *et al.*, 2004c). Ces données suggèrent que pRb joue un rôle crucial dans les étapes précoces du processus de différenciation cellulaire sans doute en participant à l'arrêt du cycle cellulaire. De même, la perte de fonction de *rb* au sein de différents tissus différenciés, tel que le tissu neuronal, les poumons, la peau et l'intestin, n'induit pas d'apoptose (MacPherson *et al.*, 2004; Mason-Richie *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

Dans les exemples présentés ici, l'apoptose observée suite à la perte de fonction de *rb* serait due à une incapacité des cellules d'arrêter de proliférer au moment de leur entrée dans le processus de différenciation. La capacité de pRb d'inhiber l'apoptose serait donc intimement liée à sa capacité à réguler la prolifération cellulaire. Par conséquent, la fonction anti-apoptotique de pRb ne serait pas directe.

(2) E2F1 : un facteur pro-apoptotique

Le fait que pRb soit principalement considéré comme un facteur anti-apoptotique tient également du fait que pRb est décrit comme un inhibiteur du facteur E2F1 qui est lui-même largement décrit comme une protéine pro-apoptotique dans plusieurs contextes cellulaires. En effet, la protéine E2F1 joue un rôle crucial dans



<u>Figure n°60</u> : E2F1 induit l'apoptose par de multiples voies

E2F1 stimule le programme de mort de la famille p53 en influençant directement et indirectement la stabilité de p53 *via* une activation transcriptionnelle de *TP73*. E2F1 active une grande diversité de gènes pro-apoptotiques qui, à leur tour, déclenchent la libération du cytochrome c et l'activation des caspases. Les rectangles oranges contiennent des gènes cibles de E2F1. Les flèches vertes correspondent à une régulation transcriptionnelle positive alors que les flèches rouges indiquent une répression. Les lignes pointillées correspondent à des interactions protéine/protéine.

Adapté de Engelmann and Pützer, 2010

le contrôle de l'apoptose. Il est important de noter que la majorité de ces fonctions pro-apoptotiques sont propres à E2F1 et ne sont pas partagées avec les autres membres de la famille E2F.

La surexpression de *e2f1* conduit à de l'apoptose à la fois *in vivo* et *in vitro* (Holmberg *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1997; Pierce *et al.*, 1999; Shan and Lee, 1994). De plus, la surexpression de *e2f1* sensibilise différents types cellulaires à l'apoptose induite par irradiation ou en réponse à des traitements endommageant l'ADN (Meng *et al.*, 1999; Pruschy *et al.*, 1999). A l'inverse, les souris $e2f1^{-/-}$ présentent des défauts d'apoptose notamment au niveau des thymocytes et sont plus résistantes à divers stimuli apoptotiques (Field *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1996).

Quels sont les mécanismes moléculaires sous-jacents au rôle pro-apoptotique d'E2F1 ?

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette fonction pro-apoptotique du facteur E2F1 ont été assez bien caractérisés. Par soucis de concision, j'ai choisi de donner ici une vue globale de ces mécanismes en ne les décrivant que de façon très succincte.

- **E2F1 induit des voies de mort p53-dépendantes et p53-indépendantes**

E2F1 peut induire la mort cellulaire par un mécanisme dépendant de la protéine p53 (Stanelle and Putzer, 2006) (**Figure 60**). En réponse à certains stimuli de mort cellulaire, E2F1 induit la transcription de $p14^{ARF}$ ce qui conduit indirectement à une stabilisation de la protéine p53 et donc à son accumulation (Bates *et al.*, 1998; Hiebert *et al.*, 1995). Ainsi accumulée, p53 peut transactiver ses gènes cibles et déclencher l'apoptose. Par ailleurs, en réponse aux dommages de l'ADN, E2F1 active transcriptionnellement différentes kinases (ATM, CHK1, CHK2, p38) capables de phosphoryler et de stabiliser p53 (Berkovich and Ginsberg, 2003; Hershko *et al.*, 2006; Powers *et al.*, 2004; Rogoff *et al.*, 2004). E2F1 peut également induire l'activation transcriptionnelle de certains cofacteurs de p53. En outre, E2F1 est capable de lier physiquement p53 ce qui favorise sa rétention dans le noyau, sa liaison à l'ADN et ses fonctions transactivatrices et apoptotiques (Fogal *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2002). Enfin, E2F1 peut directement activer le promoteur de *p53* (Bug and Dobbelstein, 2011). Toutefois, la fonction pro-apoptotique d'E2F1 ne dépend pas exclusivement de p53 (Ginsberg, 2002) étant donné qu'E2F1 est capable d'induire l'apoptose dans des cellules déficientes pour *p53* (Hsieh *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1997).

- **E2F1 induit une voie de mort mitochondriale**

E2F1 peut déclencher l'apoptose par l'intermédiaire d'une voie de mort mitochondriale (**Figure 60**). En effet, en régulant positivement l'expression de différents gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, E2F1 favorise la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Cao *et al.*, 2004;

Hershko and Ginsberg, 2004; Real *et al.*, 2006; Stanelle *et al.*, 2002). A l'inverse, E2F1 réprime la transcription de certains gènes anti-apoptotiques de cette famille (Croxton *et al.*, 2002), ce qui, là encore, est en faveur d'une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et donc d'une libération du cytochrome c. De plus en plus de données démontrent un rôle important des facteurs E2Fs dans la régulation des fonctions mitochondriales et suggèrent des liens étroits entre la viabilité cellulaire et les fonctions mitochondriales assurées par les facteurs E2Fs (Benevolenskaya and Frolov, 2015).

- **E2F1 inhibe des voies de survie et induit des voies non canoniques de mort cellulaire**

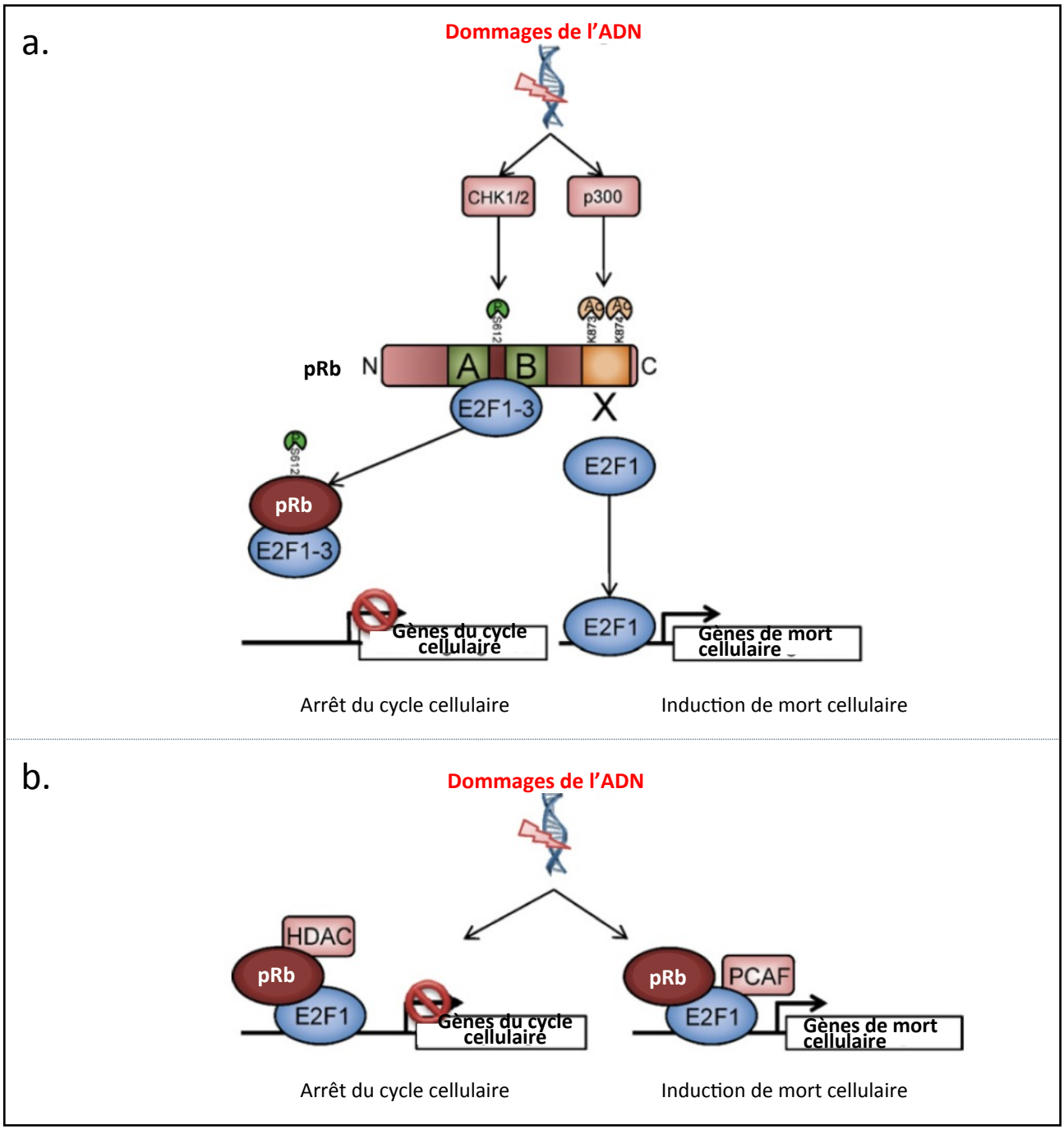
Un autre moyen pour E2F1 d'induire l'apoptose est d'inhiber les voies de signalisation anti-apoptotiques. Par exemple, E2F1 peut inhiber la signalisation anti-apoptotique NF-KB et s'opposer à la protection conférée par les protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique (Engelmann and Putzer, 2010; Miyake *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 1999; Racek *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2002). En outre, en dehors de l'apoptose, E2F1 est capable d'induire des voies non canoniques de mort cellulaire. Par exemple, il a été envisagé des liens entre E2F1 et l'anoïkis, une forme de mort cellulaire déclenchée par la perte de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire (Engelmann and Putzer, 2010).

Du fait de ces différentes fonctions pro-apoptotiques du facteur E2F1, on considère souvent pRb comme une protéine anti-apoptotique à cause de sa capacité à inhiber E2F1. En réalité, le rôle propre de pRb dans ces différentes situations d'apoptose n'a pas toujours été clairement étudié et quand il l'a été, il est beaucoup plus nuancé et ambiguë qu'on ne pourrait le penser. Comme nous le verrons plus loin, le rôle de pRb dans l'apoptose dépendante de E2F1 induite par les dommages à l'ADN illustre bien cette complexité.

(3) Action anti-apoptotique de pRb

Finalement, il existe assez peu d'exemples dans la littérature où pRb a une action anti-apoptotique directe. On en recense néanmoins quelques-uns. La protéine pRb peut notamment supprimer l'apoptose en interagissant physiquement avec différentes protéines pro-apoptotiques et en inhibant leur action (Chau and Wang, 2003). Par exemple, en réponse à des stress génotoxiques ou inflammatoires la kinase Abl est activée pour déclencher l'apoptose. pRb est capable de lier Abl et inhibe son activité de tyrosine kinase. De façon intéressante, la perte de fonction d'*abl* réduit l'apoptose observée dans le système nerveux central et le foie des embryons $rb^{-/-}$ (Borges *et al.*, 2007). Ceci suggère qu'une partie au moins de l'apoptose observée dans ces embryons est due à une activité pro-apoptotique non contrôlée d'Abl. De même, pRb peut interagir avec la kinase JNK et cette interaction inhiberait la capacité de JNK de déclencher l'apoptose en réponse à un stress (Shim *et al.*, 2000).

Comme nous l'avons vu, pRb peut assurer différentes fonctions anti-apoptotiques. En effet, la capacité de pRb d'inhiber l'apoptose peut dépendre de son aptitude à bloquer la progression dans le cycle cellulaire, c'est



<u>Figure n°61</u> : Rôle controversé de pRb dans l'apoptose dépendante d'E2F1 induite par dommages à l'ADN

Le rôle de pRb dans l'apoptose induite par dommage à l'ADN est controversé. Selon les études pRb agit comme un facteur anti-apoptotique ou pro-apoptotique.

(a) pRb agit indirectement comme un inhibiteur de l'activité pro-apoptotique du facteur E2F1. En réponse aux dommages à l'ADN, pRb est phosphorylé sur la sérine 612 entre les domaines A et B ce qui conduit à une association stable de pRb avec les E2Fs activateurs. Ceci permet une répression de leur gène cible et donc un arrêt du cycle cellulaire. Mais en réponse aux dommages de l'ADN, la domaine de liaison à E2F1 situé en C-terminal de pRb est acétylé ce qui provoque la libération d'E2F1. Une fois libre, E2F1 peut transactiver ses gènes cibles pro-apoptotiques.

(b) pRb stimule directement l'apoptose dépendante de E2F1 quand les cellules sont exposées à un stress. pRb et E2F1 participent à l'activation transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques (à droite). Mais pRb conserve sa capacité de répresseur transcriptionnel pour les gènes cibles impliqués dans le cycle cellulaire (à gauche).

Adapté de Engelmann and Pützer, 2010

notamment le cas au cours du processus de différenciation cellulaire. pRb possède également un rôle plus direct dans l'inhibition de la mort cellulaire notamment en inhibant le programme transcriptionnel pro-apoptotique dépendant du facteur E2F1. La complexité du rôle de pRb dans le contrôle de l'apoptose ne s'arrête pas là. En effet, pRb peut également avoir une fonction pro-apoptotique comme je vais vous le présenter dans le paragraphe suivant.

b) pRb assure des fonctions pro-apoptotiques

(1) Un rôle controversé de pRb dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN

En réponse à un stress génotoxique E2F1 est phosphorylé sur les sérines 31 et 364 par les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 (Lin *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2003; Urist *et al.*, 2004). Il est également acétylé par l'enzyme P/CAF (Ianari *et al.*, 2004). Ces différentes modifications post-traductionnelles vont permettre de stabiliser E2F1 et d'activer sa fonction pro-apoptotique. En effet, l'acétylation d'E2F1 favorise son recrutement au niveau des promoteurs des gènes cibles pro-apoptotiques (Pediconi *et al.*, 2003) et donc l'induction d'apoptose. Les études divergent concernant le rôle de pRb dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. En effet, certaines études suggèrent que pRb agit comme un facteur anti-apoptotique dans la réponse au stress génotoxique alors que d'autres envisagent une action pro-apoptotique pour cette protéine (**Figure 61**).

Comme décrit précédemment, pRb interagit avec les E2Fs activateurs *via* une liaison de la poche A/B avec un motif contenu au sein du domaine transactivateur des E2Fs (Helin *et al.*, 1992). Cette liaison inhibe l'activation transcriptionnelle induite par les E2Fs. pRb possède un second domaine d'interaction avec E2F situé en C-terminal (dans le domaine RBC) et spécifique de E2F1 (Dick and Dyson, 2003; Julian *et al.*, 2008). En absence de stress, ce second site de liaison permet d'inhiber l'activité pro-apoptotique d'E2F1 en inhibant la transcription des gènes cibles d'E2F1 impliqués dans le programme de mort cellulaire (Cecchini and Dick, 2011; Dick and Dyson, 2003; Julian *et al.*, 2008). En réponse aux dommages de l'ADN, le domaine RBC de pRb est acétylé, ce qui altère l'interaction de pRb avec E2F1, mais n'affecte pas l'interaction de pRb avec les autres facteurs E2Fs (Markham *et al.*, 2006). Ainsi E2F1 peut transactiver ses gènes cibles pro-apoptotiques et, de façon concomitante, les autres gènes cibles des facteurs E2Fs (notamment ceux impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire) continuent d'être correctement réprimés par les différents complexes pRb/E2F (Julian *et al.*, 2008).

A l'inverse, d'autres études fournissent des données moléculaires indiquant un rôle pro-apoptotique de pRb, en coopération avec E2F1 pour la mort cellulaire induite par les dommages à l'ADN. En effet, en réponse à un stress génotoxique, pRb, en complexe avec E2F1 et l'histone acétyltransférase P/CAF, active l'expression de différents gènes pro-apoptotiques tels que la *caspase 7* et *p73* (Carnevale *et al.*, 2012; Ianari *et al.*, 2009). La perte de fonction de *rb* réduit le niveau de transcription de ces gènes et inhibe l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN à la fois *in vivo* et *in vitro* (Ianari *et al.*, 2009). Il est important de noter que pRb conserve

dans ces conditions son pouvoir de répresseur transcriptionnel concernant les gènes cibles du cycle cellulaire en formant un complexe avec E2F1 et HDAC (Ianari *et al.*, 2009).

pRb semble donc avoir un rôle double dans la réponse aux dommages à l'ADN, il peut, selon l'étude considérée, agir comme un répresseur d'E2F1 ou comme un activateur de cette même protéine. Le rôle de pRb pourrait fortement dépendre du contexte cellulaire et tissulaire dans lequel la cellule se trouve au moment où elle subit un stress génotoxique. Il est possible que les modifications post-traductionnelles de pRb et/ou d'E2F1 jouent un rôle crucial pour déterminer si pRb assure une fonction pro- ou anti-apoptotique (Munro *et al.*, 2012).

(2) pRb et voie de mort mitochondriale

Récemment, il a été mis en évidence que pRb potentialise l'apoptose induite par le TNFα et ce même en présence d'une inhibition de la traduction (Hilgendorf *et al.*, 2013). Ces données suggèrent un rôle pro-apoptotique non transcriptionnel de pRb. Or une portion de pRb est cytosolique et plus particulièrement mitochondriale (Ferecatu *et al.*, 2009). De façon intéressante, il a été mis en évidence que pRb interagit avec Bax *in vivo* (Antonucci *et al.*, 2014; Hilgendorf *et al.*, 2013) et des expériences réalisées *in vitro* suggèrent que cette interaction favorise un changement de conformation de Bax à l'origine de son activation (Hilgendorf *et al.*, 2013). De plus, une forme de pRb dépourvue de sa séquence de localisation nucléaire mais possédant une séquence d'adressage mitochondrial est suffisante pour induire efficacement l'apoptose en réponse à différents stimuli (Attardi and Sage, 2013; Hilgendorf *et al.*, 2013). Ces données suggèrent un rôle pro-apoptotique de pRb, directement au niveau de la mitochondrie, plus précisément dans l'induction d'une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, en réponse à différents types de stress. En outre, pRb coopère avec E2F1 pour activer la transcription de gènes impliqués dans l'induction d'une voie de mort mitochondriale (Bertin-Ciftci *et al.*, 2013). Les actions nucléaires et mitochondriales de pRb pourraient donc s'additionner pour induire un fort niveau d'apoptose en réponse à un stress cellulaire.

(3) pRb assure une fonction pro-apoptotique en accord avec son rôle de suppresseur de tumeurs

Cet effet pro-apoptotique de pRb, qui est plus en accord avec sa fonction de suppresseur de tumeur, a été démontré entre autre dans des cellules tumorales humaines (Araki *et al.*, 2008; Bowen *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1999; Knudsen *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2005; Zhao and Day, 2001). Il est important de noter que cette fonction pro-apoptotique de pRb semble dépendre de l'état prolifératif des cellules. En effet, pRb assure sa fonction pro-apoptotique dans des cellules en prolifération, que ce soit dans des lignées cellulaires tumorales humaines ou *in vivo* au sein de l'épithélium intestinal de souris. Dans ce contexte particulier, l'apoptose

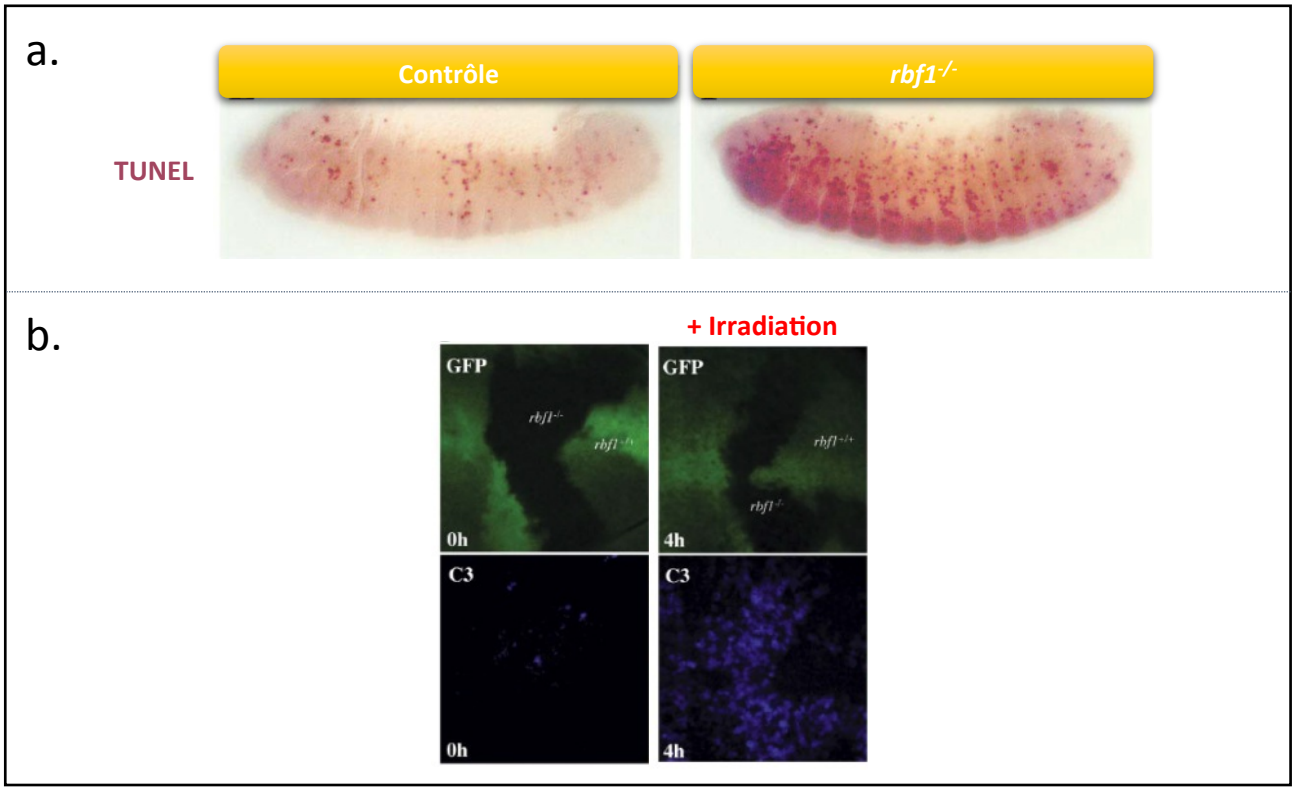


Figure n°62 : La perte de fonction de *rbf1* induit de l'apoptose et sensibilise à la mort cellulaire

(a) Les cellules apoptotiques sont détectées par un marquage TUNEL (en rouge). On observe un nombre important de cellules apoptotiques au sein des embryons *rbf1*$^{-/-}$ si on les compare aux embryons contrôles. Ces données indiquent que la perte de fonction de *rbf1* induit de l'apoptose au stade embryonnaire.
Issu de Du and Dyson, 1999

(b) Des clones mitotiques *rbf1*$^{-/-}$ ont été générés au sein des disques imaginaux d'ailes. Ces clones sont facilement identifiables car ils n'expriment pas *gfp*. Avant irradiation (à gauche), on détecte certaines cellules caspase 3 positives (C3) au sein des clones *rbf1*$^{-/-}$. Ceci est cohérent avec l'idée que la perte de fonction de *rbf1* induit de la mort cellulaire. En réponse à l'irradiation, on observe une augmentation importante du nombre de cellules caspase 3 positives dans tout le disque imaginal. Cette augmentation est encore plus forte au sein des clones *rbf1*$^{-/-}$. Ainsi, l'absence de *rbf1* sensibilise les cellules en prolifération, du disque imaginal d'aile, à l'apoptose induite par irradiation.
Issu de Moon *et al.,* 2005

dépendante de pRb induite par un stress génotoxique est observée dans les cellules de l'épithélium intestinale qui prolifèrent mais pas dans les cellules voisines qui ne prolifèrent pas (Ianari *et al.*, 2009).

Ainsi, le rôle de pRb dans l'apoptose est particulièrement complexe et semble dépendre de l'état de prolifération et de différenciation des cellules. On ne connait pas encore aujourd'hui précisément les modifications post-traductionnelles qui orientent pRb vers une action anti-apoptotique ou au contraire vers une fonction pro-apoptotique. De plus, les protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose par pRb ne sont pas clairement identifiées. Des études sont donc nécessaires pour clarifier les mécanismes d'action de pRb dans les processus apoptotiques.

c) Rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'apoptose

(1) Rbf1 : un facteur anti-apoptotique ?

Comme pRb, Rbf1 a longtemps été considéré uniquement comme un facteur anti-apoptotique. Cela vient du fait que l'inactivation de *rbf1* conduit à de l'apoptose dans différents contextes cellulaires (Collins and Moon, 2013; Du and Dyson, 1999; Krivy *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2005; Tanaka-Matakatsu *et al.*, 2009). Cette mort cellulaire est notamment observée au cours de l'embryogenèse (**Figure 62**) et dans les disques imaginaux d'aile et d'œil au stade larvaire. L'idée que Rbf1 assure une fonction anti-apoptotique est renforcée par le fait que la perte de fonction de *rbf1* sensibilise à l'apoptose induite par irradiation au sein des disques imaginaux d'aile et d'œil (Moon *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2005) (**Figure 62**). De façon intéressante, au cours de l'embryogenèse, l'apoptose observée en réponse à la perte de fonction de *rbf1* est associée à la présence de phase S ectopique (Du and Dyson, 1999). Ces données suggèrent que l'apoptose induite par la perte de fonction de *rbf1* pourrait être due à une dérégulation du cycle cellulaire. Ainsi, comme pour pRb, la fonction anti-apoptotique de Rbf1 serait au moins en partie indirecte.

Un autre parallèle peut être fait entre la fonction anti-apoptotique de pRb et celle de Rbf1. En effet, comme décrit précédemment, une partie du pouvoir anti-apoptotique de pRb est due à sa capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle du facteur pro-apoptotique E2F1. De même chez la drosophile, Rbf1 assure la protection des cellules en inhibant l'activité transcriptionnelle de dE2F1 qui est, lui aussi, décrit comme un facteur pro-apoptotique. En effet la surexpression de *de2f1* et de son cofacteur *ddp* dans les disques imaginaux en développement induit de l'apoptose (Asano *et al.*, 1996; Du *et al.*, 1996b; Neufeld *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les gènes pro-apoptotiques *rpr, hid, dcp-1* et *dark* sont des cibles transcriptionnelles de dE2F1 (Asano *et al.*, 1996; Moon *et al.*, 2005; Zhou and Steller, 2003). De plus, dE2F1 favorise la mort cellulaire induite par irradiation dans le disque imaginal d'aile. A l'inverse dE2F2 inhibe cette mort cellulaire (Wichmann *et al.*, 2010). Ainsi les deux facteurs dE2Fs semblent avoir une fonction opposée dans le contrôle de l'apoptose.

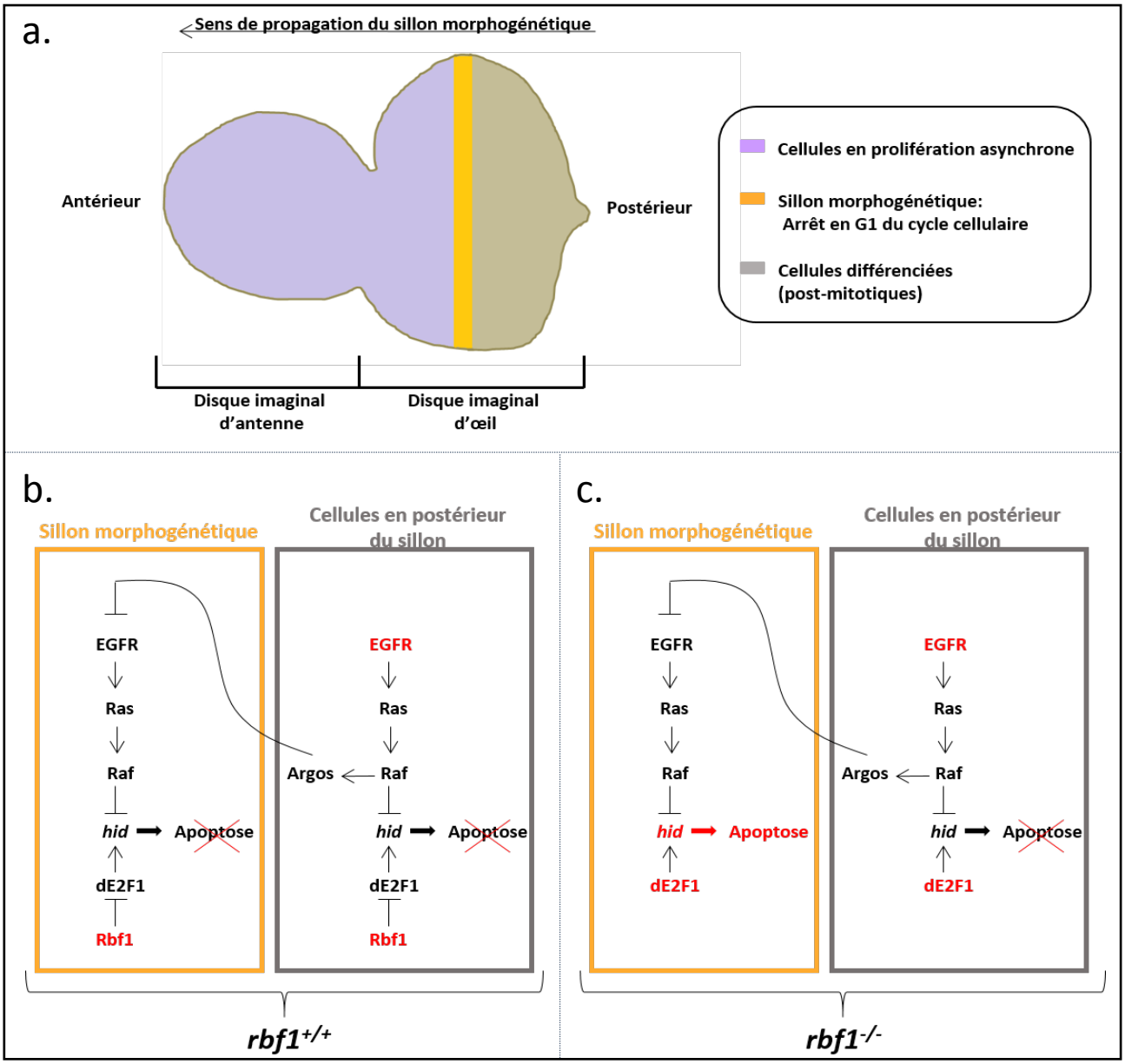


Figure n°63 : Rôle anti-apoptotique de Rbf1 dans les cellules du sillon morphogénétique du disque imaginal d'œil

(a) Au cours du 3ème stade larvaire, on observe la progression d'un sillon morphogénétique de la partie postérieure vers la partie antérieure du disque imaginal d'œil. Les cellules, situées en antérieur au sillon (violet), prolifèrent de façon asynchrone. Dans le sillon (orange), les cellules subissent un arrêt en G1 du cycle cellulaire. En postérieur du sillon (beige), les cellules se différencient.

(b) Les cellules en postérieur du sillon morphogénétique (beige) possèdent une double protection vis-à-vis de l'apoptose. D'une part, Rbf1 empêche dE2F1 d'activer la transcription du facteur pro-apoptotique *hid*. D'autre part, la voie EGFR inhibe hid à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Dans les cellules du sillon (orange), la voie EGFR est inactive. En effet, l'activation de la voie EGFR dans les cellules postérieures stimule la production d'Argos. Argos est un facteur diffusible capable d'inhiber l'activation de la voie EGFR dans les cellules adjacentes, à savoir les cellules du sillon morphogénétique. La voie EGFR étant inhibée dans les cellules du sillon, ces dernières possèdent une unique protection vis-à-vis de l'apoptose, à savoir l'inhibition de la transcription de *hid* par Rbf1.

(c) En absence de Rbf1, les cellules du sillon sont donc dépourvues de protection vis-à-vis de l'apoptose, ce qui explique la mort cellulaire massive observée dans un contexte *rbf1*$^{-/-}$. Dans les cellules de la région postérieure du disque imaginal d'œil, la voie EGFR inhibe l'apoptose ce qui permet la survie de ces cellules en dépit de l'absence de Rbf1. Donc, en fonction du contexte cellulaire, l'inactivation de *rbf1* n'a pas les mêmes conséquences.

Adapté de Moon *et al.,* 2006

Toutefois, les effets des protéines Rbf1 et dE2F1 sont fortement dépendants du contexte environnemental de la cellule considérée. Bien que *rbf1* soit exprimé dans tout le disque imaginal d'œil, son inactivation induit de l'apoptose, uniquement dans une région précise de ce disque appelée sillon morphogénétique (Du, 2000). Dans cette zone, les cellules sont arrêtées dans la phase G1 du cycle cellulaire mais l'apoptose observée dans un contexte *rbf1*$^{-/-}$ ne semble pas être due à une entrée inappropriée en phase S (Moon *et al.*, 2006). Il a été mis en évidence que les cellules du sillon morphogénétique sont plus sensibles à l'apoptose induite par l'inactivation de *rbf1* car, dans ces cellules, la voie EGFR est inhibée. Or cette voie régule négativement le gène pro-apoptotique *hid* à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, ce qui favorise la survie des cellules (**Figure 63**). De même, l'activité de dE2F1 vis-à-vis de l'apoptose dépend fortement du contexte cellulaire. En réponse à l'irradiation, dE2F1 favorise l'apoptose des cellules en prolifération dans les régions du disque imaginal d'aile qui permettront la formation des interveines au niveau de l'aile adulte. Cette action pro-apoptotique de dE2F1 est inhibée par Rbf1 (Moon *et al.*, 2005). A l'inverse dE2F1 protège les cellules de la frontière dorso-ventrale de l'apoptose induite par irradiation. Dans ces cellules arrêtées en phase G1 ou G2, Rbf1 coopère avec dE2F1 pour réprimer la transcription de *hid*, ils assurent donc ensemble une fonction anti-apoptotique.

(2) Rbf1 assure une fonction pro-apoptotique dans les cellules en prolifération

Contrairement à ces différentes données qui soulignent un rôle anti-apoptotique de Rbf1, une fonction pro-apoptotique de Rbf1 a été suggérée par plusieurs études (Datar *et al.*, 2000; Neufeld *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2003; Xin *et al.*, 2002) puis démontrée au laboratoire par Cécile Milet au cours de sa thèse (Milet *et al.*, 2010). En effet, la surexpression de *rbf1* dans les cellules en prolifération du disque imaginal d'aile induit de l'apoptose, ce qui se manifeste au stade adulte par une perte de tissus (**Figure 64**). Cette mort cellulaire est dépendante des caspases et peut être inhibée par la surexpression de *de2f1* et de son cofacteur *ddp*. A l'inverse, la surexpression de *rbf1* dans des cellules post-mitotiques, tels que les neurones de l'œil n'induit pas de mort cellulaire. Au contraire, il a été mis en évidence que dans ces cellules post-mitotiques, la surexpression de *rbf1* protège de la mort induite par la surexpression de gènes pro-apoptotiques comme *debcl* ou *dmp53*. Ces données suggèrent que le statut de prolifération de la cellule influence le rôle de Rbf1 vis-à-vis de l'apoptose. Cela fournit un excellent modèle d'étude pour tenter de caractériser les événements moléculaires impliqués dans la fonction pro-apoptotique de Rbf1 dans des cellules en prolifération. Cette fonction pro-apoptotique de Rbf1 dans des cellules en prolifération a été récemment confirmée par l'équipe de Sandhya Payankaulam (Elenbaas *et al.*, 2015).

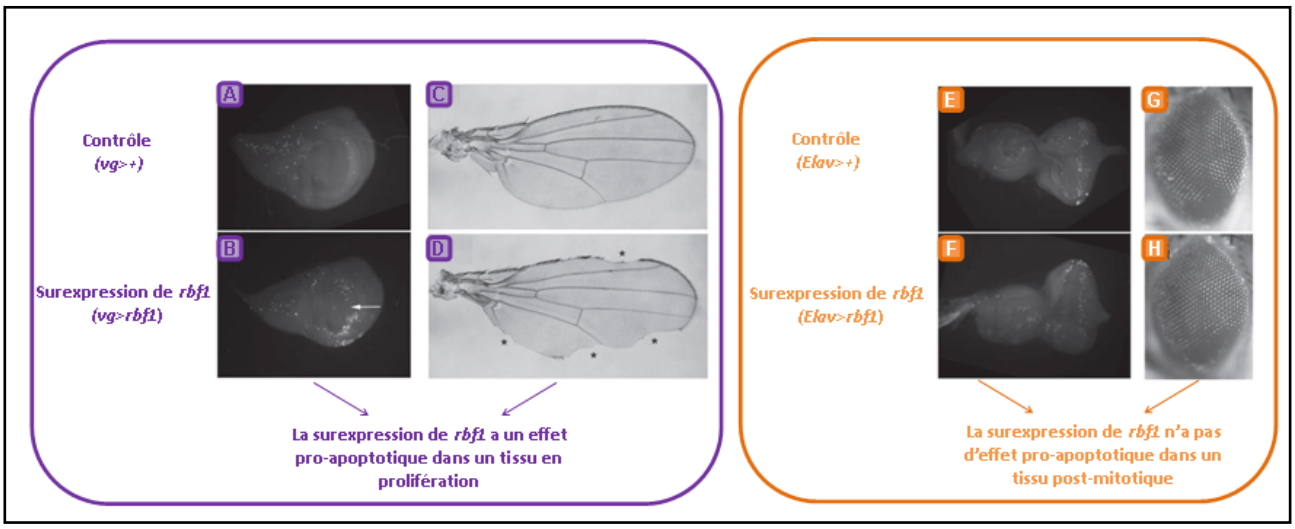


Figure n°64 : La surexpression de *rbf1* a un effet pro-apoptotique dans un tissu en prolifération

(a) rbf1 peut être surexprimé, au cours du développement, dans la région du disque imaginal d'aile qui donnera naissance, chez l'adulte, à la marge de l'aile (grâce à l'inducteur *vestigial-gal4* (*vg-gal4*)). Dans ces conditions, la surexpression de *rbf1* induit l'augmentation du marquage TUNEL, spécifique de l'apoptose, au sein du disque imaginal d'aile par rapport à un disque contrôle (comparaison A et B). Cette apoptose au stade larvaire se traduit, au stade adulte, par une perte de tissu au niveau de la marge de l'aile. En effet, on note la présence d'encoches (*, D). Ces encoches ne sont jamais observées dans une aile contrôle (C). La surexpression de *rbf1* a donc un effet pro-apoptotique, dans les cellules en prolifération du disque imaginal d'aile.

(b) rbf1 peut être surexprimé dans les cellules post-mitotiques du disque imaginal d'œil (grâce à l'inducteur *Elav-gal4*). Dans ces conditions, la surexpression de *rbf1* ne modifie pas le profil observé avec le marqueur spécifique de l'apoptose (comparaison E et F). De façon cohérente, chez l'adulte, les yeux contrôles ou surexprimant *rbf1* sont indistinguables (comparaison G et H). La surexpression de *rbf1* n'est donc pas pro-apoptotique dans les cellules post-mitotiques du disque imaginal d'œil.

Issu de Milet *et al.,* 2010

(3) Implication du complexe dREAM dans le contrôle de l'apoptose par Rbf1

De façon intéressante, le complexe dREAM semble être impliqué dans la fonction de régulateur de l'apoptose des protéines Rbf1 et dE2F2. La déplétion de *lin52*, un des composants du complexe dREAM, au sein du disque imaginal d'œil conduit à de l'apoptose au stade larvaire et à un phénotype d'œil rugueux au stade adulte ce qui suggère un rôle anti-apoptotique de *lin52* (Bhaskar *et al.*, 2014). Plus précisément, cette étude a démontré que Lin52 coopère avec Rbf1 et dE2F2 pour favoriser le recrutement du complexe dREAM au niveau du promoteur du gène *hid* permettant ainsi la répression transcriptionnelle de ce gène pro-apoptotique. Par conséquent le complexe dREAM en inhibant la transcription de *hid* protège les cellules de l'apoptose au sein du disque imaginal d'œil en développement et participe donc à la fonction anti-apoptotique de Rbf1.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dMyb et dE2F2 assurent des fonctions opposées au niveau de la régulation de la transcription des gènes cibles du complexe dREAM. Mais, de façon surprenante, dMyb et dE2F2 coopèrent pour assurer la mort développementale de certains précurseurs neuronaux au niveau de la marge postérieure de l'aile (Rovani *et al.*, 2012). Cette donnée est la première étude indiquant une fonction pro-apoptotique de dE2F2. Grim est l'effecteur majeur de cette mort cellulaire mais la transcription de ce gène pro-apoptotique ne semble pas être régulée par le complexe dREAM.

Enfin, des données indiquent que Rbf1, avec le complexe dREAM, lie le promoteur du gène *nanos* et réprime son expression dans des cellules de drosophile en culture (Miles *et al.*, 2014). Nanos étant un facteur anti-apoptotique, sa répression par le complexe dREAM pourrait être impliquée dans la fonction pro-apoptotique de la protéine Rbf1 mais cela reste à démontrer *in vivo*.

III. Situation du sujet

La protéine pRb joue un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre le développement de tumeurs. Cette fonction de suppresseur de tumeurs dépend notamment de sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire en régulant négativement la transcription dépendante des facteurs E2Fs. Bien que pRb ait été d'abord décrit comme une protéine anti-apoptotique, de nombreuses études s'accordent aujourd'hui sur le fait que pRb puisse favoriser ou induire la mort des cellules dans certains contextes cellulaires. Cette fonction pro-apoptotique, qui est en accord avec son rôle de suppresseur de tumeurs, est encore aujourd'hui peu caractérisée. On ne connait pas précisément les partenaires de pRb impliqués dans le contrôle de l'apoptose, ni les gènes cibles importants pour cette fonction. En outre, les événements moléculaires et cellulaires de la voie de mort induite par pRb ne sont pas clairement définis.

L'équipe dirigé par Isabelle Guénal s'intéresse depuis plusieurs années au rôle de Rbf1, l'homologue de drosophile de pRb, dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire et a notamment mis en évidence un rôle pro-apoptotique de Rbf1 dans les cellules en prolifération. En effet, la surexpression de *rbf1* sous contrôle de l'inducteur *vestigial-Gal4* induit de l'apoptose au stade larvaire, ce qui se manifeste au stade adulte par une perte de tissu (formation d'encoche à la marge de l'aile). Cette apoptose dépend des caspases étant donné qu'elle est supprimée par l'expression ectopique de *p35*. De plus, la perte de fonction de *de2f1* aggrave ce phénotype de mort cellulaire induit par *rbf1* alors que la surexpression conjointe de *rbf1* et de *de2f1/ddp* conduit à une réduction importante du nombre de cellules apoptotiques. Ces données génétiques indiquent que dE2F1 s'oppose à l'activité pro-apoptotique de Rbf1 et suggère une implication de la fonction de régulateur transcriptionnel de Rbf1 dans sa fonction pro-apopototique.

Une première partie de mon travail de thèse a donc consisté à définir l'importance de la fonction de régulateur transcriptionnel de Rbf1 dans sa capacité à induire la mort cellulaire, notamment en recherchant les gènes cibles importants pour le déclenchement de l'apoptose, et les partenaires nucléaires de Rbf1 impliqués dans la régulation de l'expression de ces gènes. Les résultats obtenus ont donné lieu à la publication d'un article qui démontre l'implication des membres de la famille Bcl-2 et de la protéine How dans la mort cellulaire induite par Rbf1. La poursuite de ces travaux a permis la mise en évidence d'une voie mitochondriale de mort dépendante de Debcl en aval de Rbf1. Ce travail a permis l'écriture d'un second article actuellement en révision.

Le laboratoire s'intéresse également au mécanisme de prolifération induite par l'apoptose. Comme nous l'avons vu dans cette introduction, la présence de cellules apoptotiques peut avoir des conséquences tissulaires importantes et, entre autre, induire la prolifération des cellules voisines. Les données de la littérature indiquent un rôle de la signalisation JNK dans cette prolifération en réponse à l'apoptose. Toutefois, ce mécanisme d'AiP ne survient pas systématiquement suite à l'induction de mort cellulaire. Une autre partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude des conséquences tissulaires de l'apoptose induite par Rbf1. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence l'existence d'un mécanisme d'AiP suite à la mort cellulaire induite par Rbf1 au sein du

disque imaginal d'aile et caractériser les membres de la voie JNK impliqués dans cette prolifération en réponse à l'apoptose. Les résultats de cette troisième partie font l'objet d'un manuscrit qui vient d'être soumis.

La partie présentant les résultats de mes travaux de thèse sera donc divisée en trois sections correspondant à ces trois articles dont je suis première auteur. En outre, au cours de ma thèse, j'ai participé à d'autres études réalisées au laboratoire et permettant de mieux définir, d'une part, le rôle de Rbf1 dans l'homéostasie tissulaire et d'autre part, la fonction pro-apoptotique de Debcl *in vivo* chez la drosophile. Les articles correspondant à ces travaux sont présentés dans la partie Annexe de ce manuscrit.

Résultats

I. <u>Manuscrit n°1</u> : L'activité pro-apoptotique de Rbf1 implique une régulation négative des ARNm de *diap1* et *buffy* dépendante de dE2F2.

Comme je l'ai exposé dans mon introduction, pRb peut assurer une fonction pro-apoptotique dans certains contextes cellulaires (notamment dans des cellules en prolifération) (Attardi and Sage, 2013; Hilgendorf *et al.*, 2013; Ianari *et al.*, 2009), mais les bases moléculaires de cette fonction sont assez peu décrites et restent mal comprises. Rbf1, l'homologue de drosophile de pRb, possède également la capacité d'induire la mort des cellules dans un tissu prolifératif (Elenbaas *et al.*, 2015; Milet *et al.*, 2010) et la drosophile offre la possibilité de réaliser facilement des tests génétiques pour identifier les partenaires de Rbf1 dans cette fonction pro-apoptotique. Rbf1 étant un régulateur transcriptionnel, l'hypothèse la plus simple pour expliquer sa fonction d'inducteur de mort est qu'il dérégule l'expression de certains gènes cibles. Une première partie de mon travail de thèse a donc consisté à rechercher les gènes cibles de Rbf1 impliqués dans l'induction d'apoptose et à identifier les protéines nucléaires qui participent avec Rbf1 à la régulation transcriptionnelle de ces gènes.

Nous avons choisi de caractériser l'effet pro-apoptotique de Rbf1 au cours du développement en surexprimant *rbf1* à l'aide du système UAS-Gal4 dans un tissu en prolifération, à savoir le disque imaginal d'aile. Cette structure larvaire est couramment utilisée pour étudier les processus apoptotiques car elle présente peu d'apoptose développementale. De plus, ce disque imaginal larvaire donne naissance après la métamorphose à l'aile adulte qui est un appendice facilement observable et non essentiel à la survie de l'organisme.

Ce travail a permis la publication d'un article dans « Cell Death and Disease ». Dans cet article, nous montrons que l'apoptose, induite par Rbf1 dans des cellules en prolifération, dépend du facteur dE2F2 mais n'implique pas l'activité transcriptionnelle de dE2F1. De plus, nous avons pu mettre en évidence qu'en réponse à la surexpression de *rbf1*, on peut observer une diminution du niveau d'ARNm de deux gènes anti-apoptotiques majeurs chez la drosophile : *buffy* (un gène anti-apoptotique de la famille Bcl-2) et *diap1* (un inhibiteur de caspases). Cette diminution est dépendante du facteur dE2F2. Des expériences de génétiques nous ont permis de confirmer que Buffy et Diap1 s'opposent à la mort induite par Rbf1.

De façon intéressante, la diminution du niveau de transcrit de *diap1* ne correspond pas à une répression transcriptionnelle mais à une déstabilisation des ARNm. En effet, en réponse à l'expression de *rbf1*, on n'observe pas de diminution de l'expression d'un gène rapporteur *diap1-LacZ* alors qu'on observe par RT-qPCR ou immunofluorescente respectivement une baisse du taux d'ARNm *diap1* et de protéines Diap1. Nous avons pu mettre en évidence qu'en réponse à Rbf1, le niveau d'expression du gène *how* était augmenté de façon dépendante de dE2F2. Ce gène code pour une protéine de liaison aux ARNs (*cf*. paragraphe I.B.2.c de l'introduction). La liaison de How(L) (isoforme longue de How) sur la région 3'UTR de l'ARNm de *diap1* induit sa dégradation (Reuveny *et al.*, 2009). Ainsi, indirectement en régulant positivement l'expression de *how*, Rbf1 induit une diminution du niveau de *diap1*.

Par la suite, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine nous ont permis de montrer que Rbf1 et dE2F2 lient les régions promotrices de *buffy* et de *how* pour induire respectivement une répression transcriptionnelle et une augmentation du niveau de transcription. Nous avons pu confirmer que la régulation transcriptionnelle de *buffy* par Rbf1 survenait de façon endogène au cours du développement de la drosophile.

En effet, l'expression d'un ARNi dirigé contre *rbf1* conduit à une augmentation du taux d'ARNm de *buffy* dans le disque imaginal d'aile.

Enfin, des expériences de génétique et de biologie moléculaire suggèrent que les activités opposées de Rbf1/dE2F2 respectivement répresseurs et activateurs de la transcription des gènes *buffy* et *how*, s'expliquent en partie par l'implication du complexe chromatinien dREAM.

Nos résultats soulignent donc l'importance de l'activité transcriptionnelle de Rbf1, en coopération avec dE2F2 et le complexe dREAM, pour sa fonction pro-apoptotique.

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2014) 5, e1405; doi:10.1038/cddis.2014.372
© 2014 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/14
www.nature.com/cddis

The pro-apoptotic activity of *Drosophila* Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of *diap1* and *buffy* mRNA

A Clavier[1], A Baillet[1], A Rincheval-Arnold[1], A Coléno-Costes[2,3,4], C Lasbleiz[1,5], B Mignotte[1] and I Guénal*[,1]

The retinoblastoma gene, *rb*, ensures at least its tumor suppressor function by inhibiting cell proliferation. Its role in apoptosis is more complex and less described than its role in cell cycle regulation. Rbf1, the *Drosophila* homolog of Rb, has been found to be pro-apoptotic in proliferative tissue. However, the way it induces apoptosis at the molecular level is still unknown. To decipher this mechanism, we induced *rbf1* expression in wing proliferative tissue. We found that Rbf1-induced apoptosis depends on dE2F2/dDP heterodimer, whereas dE2F1 transcriptional activity is not required. Furthermore, we highlight that Rbf1 and dE2F2 downregulate two major anti-apoptotic genes in *Drosophila*: *buffy*, an anti-apoptotic member of Bcl-2 family and *diap1*, a gene encoding a caspase inhibitor. On the one hand, Rbf1/dE2F2 repress *buffy* at the transcriptional level, which contributes to cell death. On the other hand, Rbf1 and dE2F2 upregulate *how* expression. How is a RNA binding protein involved in *diap1* mRNA degradation. By this way, Rbf1 downregulates *diap1* at a post-transcriptional level. Moreover, we show that the dREAM complex has a part in these transcriptional regulations. Taken together, these data show that Rbf1, in cooperation with dE2F2 and some members of the dREAM complex, can downregulate the anti-apoptotic genes *buffy* and *diap1*, and thus promote cell death in a proliferative tissue.
Cell Death and Disease (2014) **5,** e1405; doi:10.1038/cddis.2014.372; published online 4 September 2014

The retinoblastoma gene (*rb*) is the first tumor suppressor identified in human cells. Its product, pRb, inhibits cell proliferation by controlling the G1/S transition.[1] The best characterized partners of pRB in cell cycle regulation belong to the E2F family of transcription factors.[2] In contrast to its tumor suppressor role, pRb is surprisingly often described as an anti-apoptotic protein.[3–10] However, a growing number of studies show a pro-apoptotic role for pRb.[11–14] *Drosophila*, which presents a lesser genetic complexity than mammals, offers the possibility to decipher the roles of Rb and E2F family proteins in apoptosis *in vivo*. Indeed, the *Drosophila* genome contains two *E2F* genes[15–17] (*de2f1* and *de2f2*), one *DP* gene[15] (*dDp*) that encodes an E2F cofactor and two *Rb* genes[18,19] (*rbf1* and *rbf2*). dE2F1 acts mostly as a transcriptional activator,[20] whereas dE2F2 represses transcription.[21] As pRb protein in mammals, Rbf1 can bind both activator and repressor E2F members.[21] Furthermore, it fulfills the same function as pRb in the cell cycle. Rbf1 is thus considered as a pRb homolog. *rbf1* loss-of-function is lethal at early larval stage[20,22] that attests its essential role. Homozygous *rbf1*-mutant embryos have many apoptotic cells[22] and it is admitted that Rbf1 protects cells by inhibiting the transcriptional activity of dE2F1 that is considered as a pro-apoptotic factor. Indeed, *de2f1* and *dDp* co-expression induces apoptosis in the eye imaginal discs[23] and the pro-apoptotic genes *reaper* and *dark* are dE2F1-transcriptional targets.[24,25] In contrast to these data, we have previously shown that *rbf1* can also have a pro-apoptotic function. Indeed, *rbf1* overexpression in proliferating cells of wing imaginal discs leads to apoptosis and loss of tissue in adult wings.[26] This cell death is caspase dependent and can be inhibited by *de2f1* expression. However, the precise mechanism underlying *rbf1*-induced apoptosis is still unknown. Rbf1 being mainly described as a transcriptional regulator, one may wonder whether this activity is involved in its pro-apoptotic effect. Recent reports have clarified the role of Rbf1 in transcription. Rbf1 binding to chromatin requires dE2F/dDP complexes.[27] This binding is mainly observed near transcription start sites (TSS). When associated with dE2F2, Rbf1 belongs to a transcription regulator complex named dREAM[28–30] (*drosophila* RBF, E2F and Myb-interacting proteins). This complex maintains the transcriptional repression of certain E2F target genes in the proliferating tissues by at least two distinct mechanisms: histone deacetylation of nucleosomes near TSSs and dimethylation of histone H3 Lys27 at nucleosomes located downstream of TSSs.[31] Although the first reports described the dREAM complex as

[1]Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-le-Bretonneux, France; [2]Laboratoire de Biologie du Développement—Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR7622, Paris, France and [3]CNRS, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement—Institut de Biologie Paris Seine, Paris, France
*Corresponding author: I Guénal, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la Source de la Bièvre 78180 Montigny-le-Bretonneux, France. Tel: +33 0 1 70 42 94 36; Fax: +33 0 1 70 42 95 03; E-mail: isabelle.guenal@uvsq.fr
[4]Present address: IGH—CNRS, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier, France.
[5]Present address: UMR Inserm U710-UM2-EPHE, Université Montpellier 2, place Eugene Bataillon-CC105, 34095 Montpellier, France.
Abbreviations: ChIP, chromatin immunoprecipitation; dIAP1, *Drosophila* inhibitor of apoptosis; dREAM, *drosophila* RBF, E2F and Myb-interacting proteins; en, engrailed; how, held out wings; *rb*, retinoblastoma gene; TSS, transcription start sites; vg, vestigial
Received 07.3.14; revised 23.7.14; accepted 28.7.14; Edited by E Baehrecke

an exclusive transcriptional repressor, the recent ones showed that this complex is also required to maintain the expression of some genes, highlighting that it can also participate in transcriptional activation.[32] Several screens have identified Rbf1 target genes.[27,32,33] However, how the regulation of these genes is related to the different functions of Rbf1 remains to be explained. Notably, the targets of Rbf1 in apoptosis are not known.

Here we show that Rbf1-induced apoptosis results from transcriptional regulation of at least two genes by Rbf1 and dE2F2. First, Rbf1 and dE2F2 repress the expression of *buffy*, the anti-apoptotic member of the Bcl-2 family in *Drosophila*. Second, Rbf1 and dE2F2 activate the expression of *how* (held out wings), which encodes an RNA-binding protein that destabilizes *diap1* (*Drosophila* inhibitor of apoptosis).

Result

dE2F2 and dDP cooperate with Rbf1 to induce apoptosis. As previously described, overexpression of *rbf1* in the dorsal region of wing imaginal discs using the UAS-Gal4 system with the 'vestigial' (vg) Gal4 driver induced notches along the wing margin. The number of notches correlated with the amount of apoptosis in wing imaginal discs of third instar larvae.[26] To determine the relative importance of the two dE2F factors in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. For each gene studied, we verified that the alteration of this gene expression level by itself (overexpression, RNAi or mutant) did not induce any wing phenotype, nor apoptosis at larval stage. Wing phenotypes were classified into four categories according to the number of notches: wild type (no notch), weak, intermediate and strong (Figure 1a). Notches were counted in the wings of flies overexpressing *rbf1* in a heterozygous *dE2F2*-mutant background (*vg-Gal4>UAS-Rbf1*; $dE2F2^{76Q1}/+$) and in flies simultaneously overexpressing *rbf1* and *de2f2* (*vg-Gal4>UAS-rbf1*; *UAS-dE2F2*) (Figure 1b). When *rbf1* was overexpressed in $dE2F2^{76Q1}$ heterozygous context, a significant shift of the distribution toward weaker phenotypes was observed as compared with overexpression of *rbf1* alone (Figure 1b). On the contrary, when *rbf1* and *dE2F2* were co-overexpressed, the distribution significantly shifted toward stronger phenotypes. Thus, these results show that dE2F2 is necessary for Rbf1-induced notched wing phenotype. Previous data have shown that *de2f1* heterozygous loss-of-function mutant context enhances *rbf1*-induced

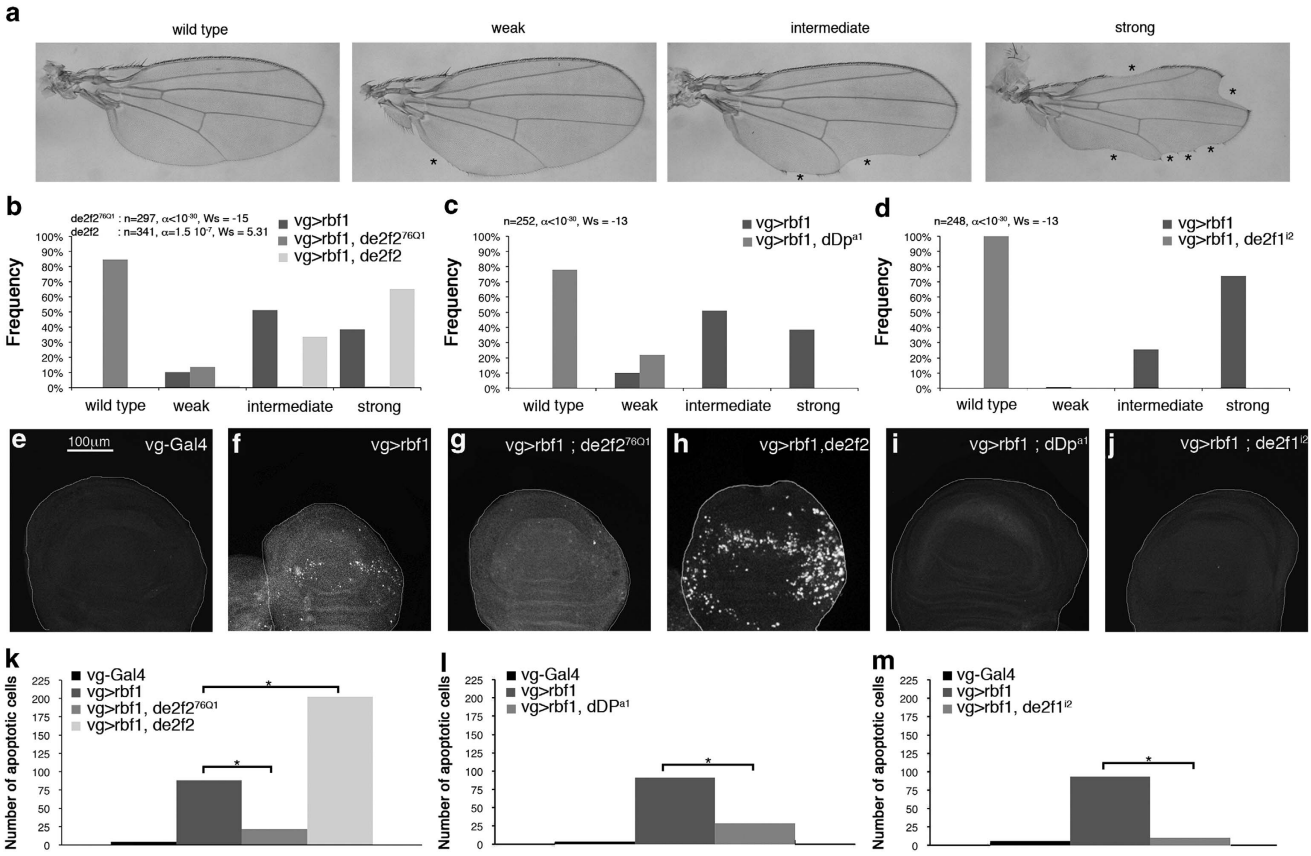


Figure 1 Rbf1-induced apoptosis involves dE2F2 and dDP. (**a**) Wing phenotypes were grouped in four categories (wild type, weak, intermediate and strong) according to the number of notches observed on the wing margin (asterisks). (**b–d**) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *vg-Gal4>UAS-rbf1; de2f2*^{76Q1} and *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *UAS-de2f2* (**b**), in *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; dDp*^{a1} (**c**), and in *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; de2f1*^{i2} (**d**). Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests. Each experiment was independently performed three times; as the results were similar, only one experiment is presented here. (**e–j**) Apoptotic cells were visualized by TUNEL staining (white dots) of wing imaginal discs of the genotype indicated at the top of the image. All the pictures are at the same scale, scale bar: 100 μm. (**k–m**) Quantification of TUNEL-positive cells in the wing pouch. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$)

notched wing phenotype, showing that *de2f1* antagonizes *rbf1*-induced phenotypes.[26] These results suggest that dE2F1 and dE2F2 have antagonistic roles in *rbf1*-induced notched wing phenotype. dDP is the cofactor shared by dE2F1 and dE2F2. In the absence of dDP, both dE2F1 and dE2F2 transcriptional activity is abolished.[34] In dDP^{a1} heterozygote context, the *rbf1*-induced notched wing phenotypes significantly shifted toward weaker phenotypes (Figure 1c) as observed in dE2F2-mutant context. This result indicates that the reduction of the net transcriptional activity of dE2F factors due to *dDp*-mutant context rescues *rbf1*-induced loss of tissue. Thus, dE2F's net transcriptional activity promotes *rbf1*-induced notched wing phenotype.

We used $de2f1^{i2}$ mutant to determine whether dE2F1 inhibitory role in *rbf1*-induced loss of tissue involved its transactivation domain. This dE2F1 mutant lacks both the transactivation domain and its ability to bind Rbf1.[20] However, it retains the DNA binding domain. By this way, it is able to bind dE2F consensus site and could exclude some complexes, such as dE2F2/Rbf1, from these genomic sites.[35] When *rbf1* was overexpressed in a $de2f1^{i2}$ heterozygous context, the distribution of the phenotypes shifted toward weaker phenotypes as compared with the overexpression of *rbf1* alone (Figure 1d). Thus, $dE2F1^{i2}$ suppresses *rbf1*-induced loss of tissue and the transcriptional activation mediated by dE2F1 does not seem to be required to inhibit *rbf1*-induced loss of tissue.

To verify that the variation of the phenotypic distribution between these different genetic contexts correspond to a variation of the amount of apoptosis in larvae, we performed TUNEL staining of third instar larval wing imaginal discs. Few apoptotic cells were detected in *vg-Gal4/+* control (Figure 1e). On the contrary, many cells were TUNEL labeled in *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/+* wing discs (Figure 1f). When *rbf1* was overexpressed in a $de2f2^{76Q1}$, dDp^{a1} or $de2f1^{i2}$ context (Figures 1g–j), we observed a significant decrease of TUNEL-labeled cells as compared with the overexpression of *rbf1* alone (Figures 1k–m). On the contrary, when *rbf1* and *de2f2* were co-overexpressed, the number of apoptotic cells was significantly increased (Figures 1h and k).

These data show that dE2F1 might inhibit Rbf1-induced apoptosis independently of its transactivation activity, whereas dE2F2 and dDP cooperate with Rbf1 to induce apoptosis in the wing imaginal disc, a proliferating tissue.

Rbf1 and dE2F2 induce a reduction of *buffy* and *diap1* mRNA levels. dE2F2 is a well-known transcriptional repressor. To explain its role in *rbf1*-induced apoptosis, we hypothesized that an Rbf1/dE2F2 complex could repress anti-apoptotic genes, leading to cell death. We focused on the two best-described anti-apoptotic factors in *Drosophila*, *diap1* and *buffy*, which encode a caspase inhibitor and a member of the Bcl-2 family, respectively. When *rbf1* was overexpressed under *vg* control, *buffy* mRNA were significantly decreased as compared with the control *vg-Gal4/+* (Figure 2a). In contrast, when *rbf1* was inactivated by RNAi (*vg-Gal4>UAS-RNAi-rbf1*), *buffy* mRNA was significantly increased as compared with the control (Figure 2b). The same result was obtained in *dDP* heterozygous loss-of-function context (data not shown). In $dE2F2^{76Q1}$ heterozygous larvae, the amount of *buffy* mRNA was similar to the one of the control *vg-Gal4/+*. When *rbf1* was overexpressed in a $dE2F2^{76Q1}$ heterozygous context, the amount of *buffy* mRNA was similar to the one of the *vg-Gal4/+* control (Figure 2a), indicating that *dE2F2* is necessary for *rbf1*-induced *buffy* mRNA decrease. These data suggest that Rbf1 represses *buffy* in wing imaginal discs in a *de2f2*-dependent manner. Similarly, *rbf1* overexpression induced a decrease of *diap1* mRNA level dependent of dE2F2 (Figure 2c). We did not observe any modification of *diap1* mRNA levels when *rbf1* was inactivated by RNAi (data not shown).

To verify whether the amount of *buffy* and *diap1* mRNA correlated with *rbf1*-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. When *rbf1* was overexpressed in a $buffy^{H37}$ heterozygous context, distribution of the wing phenotypes shifted toward stronger phenotypes as compared with the overexpression of *rbf1* alone (Figure 2d). On the contrary, when *rbf1* and *buffy* were co-overexpressed, distribution of the wing phenotypes shifted toward weaker phenotypes. The variation of the phenotypic distribution between these different genetic contexts correlated with a variation of the amount of apoptosis in wing imaginal discs (Figure 2f). These results suggest that the decrease of *buffy* mRNA is a part of the cell death mechanism induced by Rbf1.

When *rbf1* was overexpressed and *diap1* was simultaneously inactivated by RNAi, we observed an increase of notches in the wings (Figure 2e) as well as an increase in the amount of apoptosis in wing imaginal discs (Figure 2g) as compared with the overexpression of *rbf1* alone. On the contrary, we detected a phenotypic rescue when *rbf1* and *diap1* were co-overexpressed. This suggests that *diap1* mRNA level reduction contributes to Rbf1-induced apoptosis.

Rbf1 and dE2F2 increase *how* mRNA leading to *diap1* mRNA destabilization. Our data suggest that Rbf1 and dE2F2 could directly repress the transcription of *diap1* and *buffy*. A putative E2F binding site is present in *buffy* 5′UTR but absent in *diap1* (data not shown). To confirm that *diap1* mRNA reduction was due to transcriptional regulation, we used a *diap1-LacZ* reporter transgene in *en-Gal4/+* control wing imaginal discs and *en-Gal4; UAS-rbf1* wing imaginal discs. In posterior compartment, *rbf1* overexpression slightly alter the β-Gal staining aspect as compared with the *en-gal4/+* control (Figures 3a and b), probably due to the presence of apoptotic cells, but we could not observe a real staining decrease. Nevertheless, Diap1 protein had decreased in the posterior compartment upon *rbf1* overexpression (Figure 3d). These data suggest that *rbf1* overexpression would induce a post-transcriptional reduction of *diap1* mRNA.

Interestingly, it has been reported that *diap1* is a target of How, an RNA-binding protein that belongs to the STAR family.[36] Two How isoforms have been described. The short isoform, How(S), is involved in mRNA stability and splicing.[37] The long isoform, How(L), binds the 3′UTR of target mRNAs, leading to their destabilization and their rapid degradation. *diap1* is a target of How(L).[36] We used how^{stru} loss-of-function mutant to determine the implication of How in Rbf1-induced apoptosis. When *rbf1* was overexpressed in a how^{stru} heterozygous context, distribution of the phenotypes significantly shifted toward weaker phenotypes as compared with the expression of *rbf1* alone. Consistently, the number of

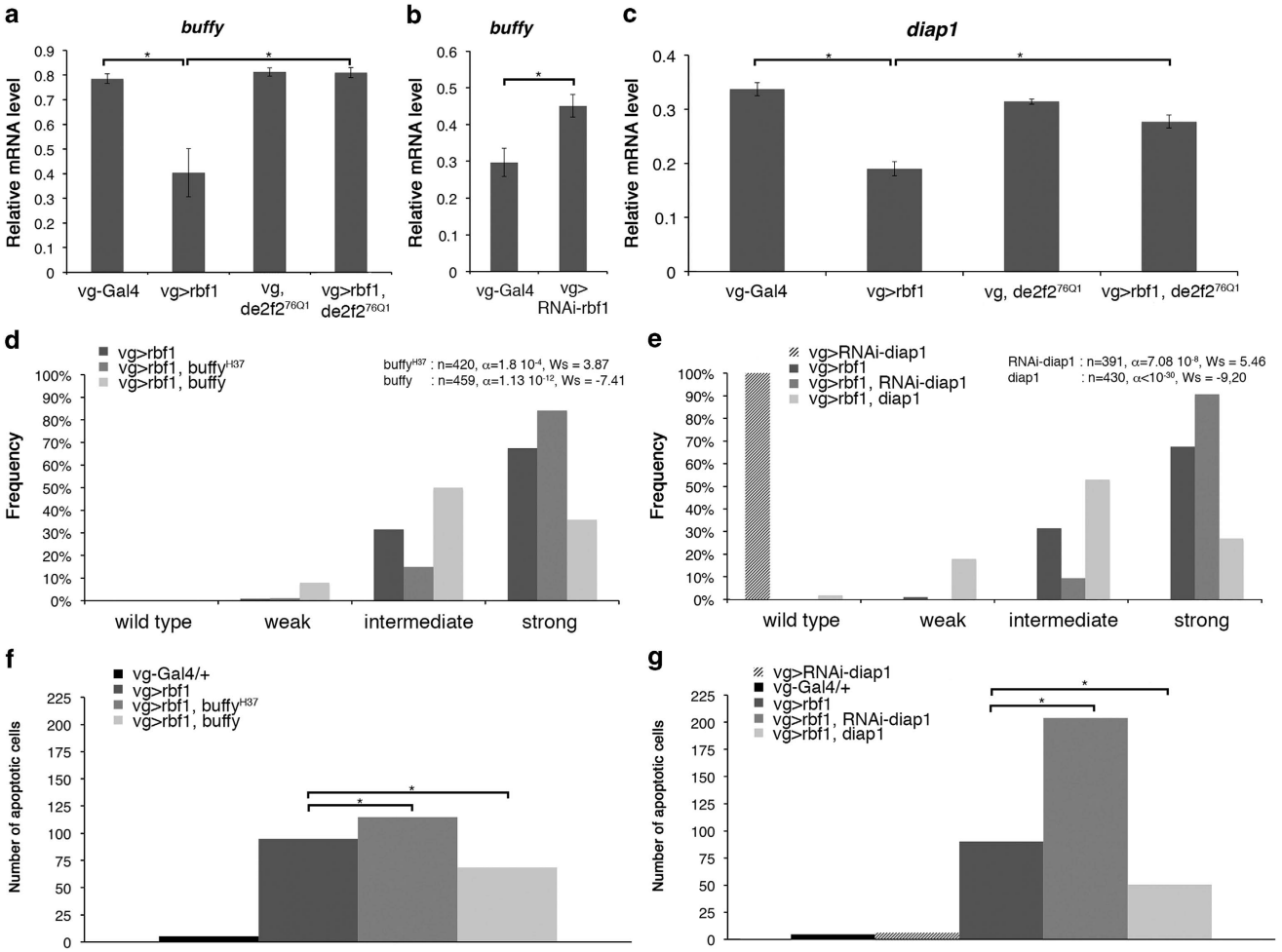


Figure 2 rbf1 overexpression induces downregulation of buffy and diap1 mRNA. (**a**–**c**) Quantification of *buffy* (**a**, **b**) and *diap1* (**c**) mRNA by RT-qPCR in wing imaginal discs. Data are normalized against *rp49* and correspond to the mean of three independent experiments. Error bars are the S.E.M. Asterisks indicate statistical significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0{,}05$). (**d**, **e**) Distribution of notches in wings of *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *vg-Gal4>UAS-rbf1; buffy^{H37}* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-buffy* flies (**d**), *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-RNAi-diap1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-diap1* flies (**e**). Wing phenotypes were grouped in four categories according to the number of notches (wild type, weak, intermediate, strong). Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests. Each experiment was independently performed three times; as the results were similar, only one experiment is presented here. (**f**, **g**) Quantification of TUNEL-positive cells in the wing pouch. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$)

apoptotic cells decreased in wing imaginal discs of the same genotype (Figures 3e and f). Thus, How is, necessary for Rbf1-induced apoptosis. To confirm that How is involved in *diap1* regulation, we performed RT-qPCR. In *how^{stru}* heterozygotes, *diap1* mRNA were slightly but significantly decreased indicating that How is required to maintain a basal level of *diap1* mRNA (Figure 3g). When *rbf1* was overexpressed in a *how^{stru}* heterozygous context, *diap1* mRNA increased as compared with the *rbf1* overexpression alone and even exceeded the level observed in *vg-Gal4/+* control. Therefore, these data suggest that Rbf1-induced apoptosis leads to *diap1* mRNA destabilization by How.

To confirm whether *diap1* downregulation by How in Rbf1-induced apoptosis involved *diap1* 3′UTR, we performed a genetic interaction test using a *UAS-diap1^{UY1835}* transgenic line. This line bears a *P* element in the 5′UTR sequence of the *diap1* gene, which allows overexpressing *diap1* with its 3′UTR sequence.[38] Contrary to the phenotypic rescue observed when *rbf1* was co-overexpressed with *diap1* devoid of its 3′UTR sequence (Figure 2e), *rbf1*co-overexpression with *diap1^{UY1835}* did not lead to a rescue of notch phenotypes (Figure 3h). Interestingly, *diap1^{UY1835}* allowed an effective increase in the Diap1 protein level as attested by Diap1 immunostaining (Figure 3j); however, this protein level was significantly lower when *rbf1* was overexpressed (Figure 3k). This suggests that Diap1 cannot accumulate in an *rbf1*-overexpressing context. When *rbf1* and *diap1^{UY1835}* were co-overexpressed in a *how^{stru}* heterozygous context, the Diap1 protein accumulated (Figure 3l) and consistently, we observed a significant rescue as compared with the expression of *rbf1* in a *how^{stru}* mutant context (Figure 3h, Wilcoxon test: $n=308$, $\alpha<10^{-30}$, $Ws=-8.95$). The variation of the phenotypic distribution between these different genetic contexts correlated with a variation of the amount of apoptosis in wing imaginal discs (Figure 3m). Thus, the *how^{stru}* heterozygote context prevents *diap1* repression by

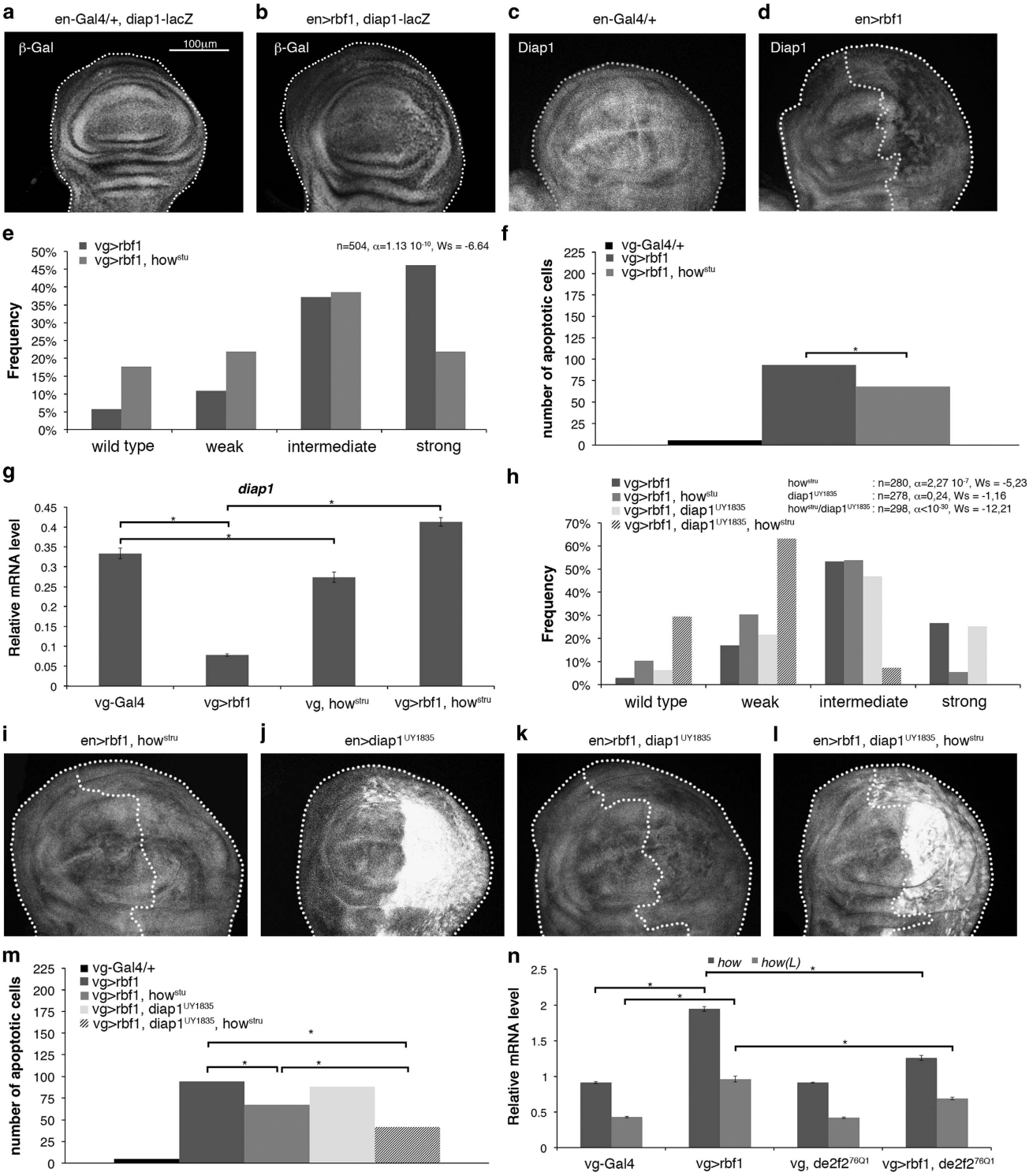


Figure 3 Rbf1 and dE2F2 increases *how* mRNA leading to *diap1* mRNA destabilization. (**a**) *diap1*-lacZ transgene was used to report *diap1* transcription in *en-gal4/+* and *en-gal4>UAS-rbf1* genetic contexts. β-Gal immunostaining (white) of the discs are shown in (**a**, **b**). Diap1 immunostaining (white) are shown in (**c**, **d**) and (**i–l**). The genotypes are indicated at the top of the image. Posterior compartment of the wing disc (on the right) is delimitated by dotted line when *rbf1* is overexpressed. All the pictures presented in Figure 3 are at the same scale, scale bar: 100 µm. Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; how^stru* flies (**e**), *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *vg-Gal4>UAS-rbf1; how^stru*, *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-diap1^UY1835* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-diap1^UY1835; how^stru* flies (**h**). Wing phenotypes were grouped into four categories according to the number of notches (wild type, weak, intermediate, strong). Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests. Each experiment was independently performed three times; as the results were similar, only one experiment is presented here. Quantification of TUNEL-positive cells (**f** and **m**) in the wing pouch of genotypes studied in (**e**) and (**h**). Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$). Quantification of *diap1* (**g**), *how* and *how(L)* (**n**) mRNAs in wing imaginal discs by RT-qPCR. Data are normalized against *rp49* and correspond to the mean of three independent experiments. Error bars are the S.E.M. Asterisks indicate statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$)

Rbf1. These results indicate that *diap1* downregulation by Rbf1 requires both the *diap1* 3′UTR sequence and How. We next asked whether *rbf1* overexpression could affect the expression of *how(L)*. Indeed, *how(L)* mRNA increased on *rbf1* overexpression (Figure 3n). Surprisingly, this raise depended on dE2F2 as it was reduced in a $de2f2^{76Q1}$ heterozygous context. This could be explained by an indirect effect of dE2F2, or by an unusual transcriptional activity of dE2F2. Thus, these data suggest that Rbf1 and dE2F2 increase of *how(L)* mRNA leads to destabilization of *diap1* mRNA that induces apoptosis.

Rbf1 and dE2F2 binds *buffy* and *how* genomic regions near the TSSs. As the 5′ UTR of *buffy* contains dE2F2 binding sites, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments to determine whether Rbf1 and dE2F2 directly bound this region. We used *pcna*, a well-characterized target of Rbf1/dE2F complexes, as a positive control and *slp1*, a nontarget gene of Rbf1,[39] as a negative control. No significant enrichment was observed of the negative control *slp1* after Rbf1 or dE2F2 immunoprecipitation (IP). In contrast, we detected a significant enrichment of the positive control *pcna* promoter region on Rbf1 or dE2F2 IP as compared with the mock IP (Figures 4a and b). The b*uffy* 5′UTR was significantly enriched after Rbf1 and dE2F2 IPs as compared with the negative controls both in *rbf1*-overexpressing wing discs and control discs (Figures 4a and b). Therefore, Rbf1 and dE2F2 bound *buffy* in the wing imaginal discs. Then, Rbf1 and dE2F2 might directly repress *buffy* transcription.

The *how* promoter also contains a putative dE2F binding site suggesting that Rbf1 and dE2F2 could bind this region. Consistently, we observed that *how* genomic region was significantly enriched after both Rbf1 and dE2F2 IP in *rbf1*-overexpressing wing discs (Figures 4a and b). Nevertheless, these enrichments were not observed with the control discs. Despite the fact that Rbf1/dE2F2 complex is almost exclusively described as a transcriptional repressor, our results suggest that Rbf1 and dE2F2 might directly activate *how* transcription.

Transcriptional control by different members of the dREAM complex depends on the target gene. Rbf1 and dE2F2 belong to a multi-subunit complex named dREAM. This complex positively regulates some target genes, whereas it negatively regulates some others. Certain proteins of the complex are activators, whereas others are repressors or not involved. Moreover the role of each protein can change according to the target gene. To determine the function of the dREAM subunits Mip120, Mip130 and Myb in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. When *rbf1* was co-overexpressed with either *RNAi-mip120* or *RNAi-mip130*, the distribution of wing phenotypes shifted toward weaker phenotypes as compared with the expression of *rbf1* alone (Figures 5a and b). Consistently, the number of apoptotic cells decreased in the wing discs of the same genotypes (Figures 5d and e), indicating that Mip120 and Mip130 were necessary for Rbf1-induced apoptosis.

rbf1 and *myb* co-expression induces a shift in the phenotype distribution toward weaker phenotypes (Figure 5c) and a decrease of apoptotic cells (Figure 5f). Therefore, Myb is sufficient to inhibit Rbf1-induced apoptosis. This result is in an agreement with the antagonistic role of Myb as compared with the role of other members of the complex, previously described.[30]

We next assessed the contribution of Mip120, Mip130 and Myb to *buffy* and *how* transcriptional regulation by RT-qPCR. Depletion of Mip120 or Mip130 by *RNAi* induced an increase of *buffy* mRNA as compared with *vg-Gal4/+* control (Figure 5g), indicating that Mip120 and Mip130 are required to repress *buffy* expression in the wing imaginal discs. Moreover, when *rbf1* was co-overexpressed with *RNAi-mip120*, *buffy* mRNA increased as compared with the *rbf1* expression alone. Similar results were observed with *RNAi-mip130*, indicating that these two genes are required for Rbf1 to repress *buffy* expression. Depletion of Myb by RNAi did not affect *buffy* expression, whereas *myb* overexpression increased it (Figure 5h). Furthermore, when *rbf1* and *myb* were co-overexpressed, the amount of *buffy* mRNA was similar to the one of *vg-Gal4/+* control. Thus, Myb and Mip proteins had opposite roles on *buffy*

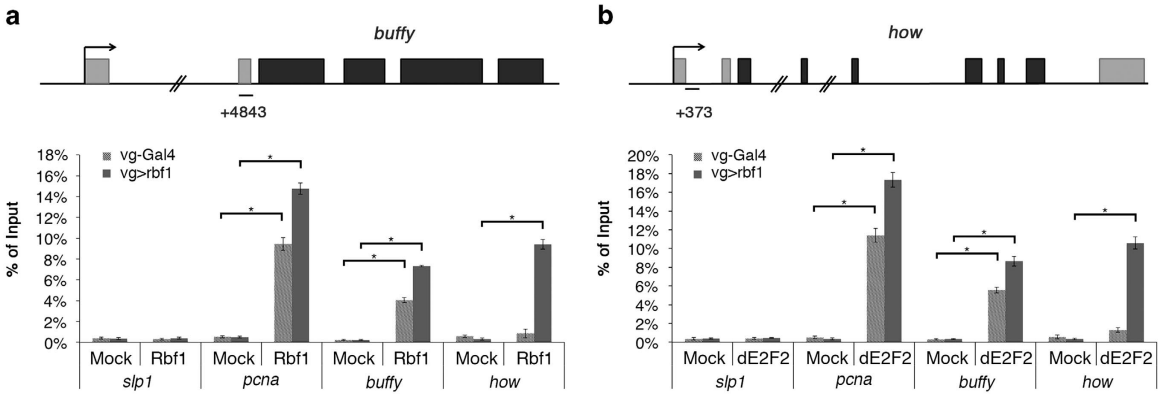


Figure 4 Binding of Rbf1 and dE2F2 on *buffy* and *how* genes. Structure of *buffy* (**a**) and *how* (**b**) genes. qPCR amplicons are indicated. Coordinated of qPCR amplicons relative to TSS are indicated. ChIP-qPCR analysis of *buffy* (**a**) and *how* (**b**) from *vg-gal4 > UAS-Rbf1* or control (*vg-Gal4/+*) wing imaginal discs using mock, anti-Rbf1 or anti-dE2F2 antibodies. The results were expressed as percentages of input. *slp1*, a nontarget gene of Rbf1, was used as a negative control whereas *pcna*, a known dE2Fs target, was used as a positive control. Error bars represent S.E.M obtained from three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P < 0.05$)

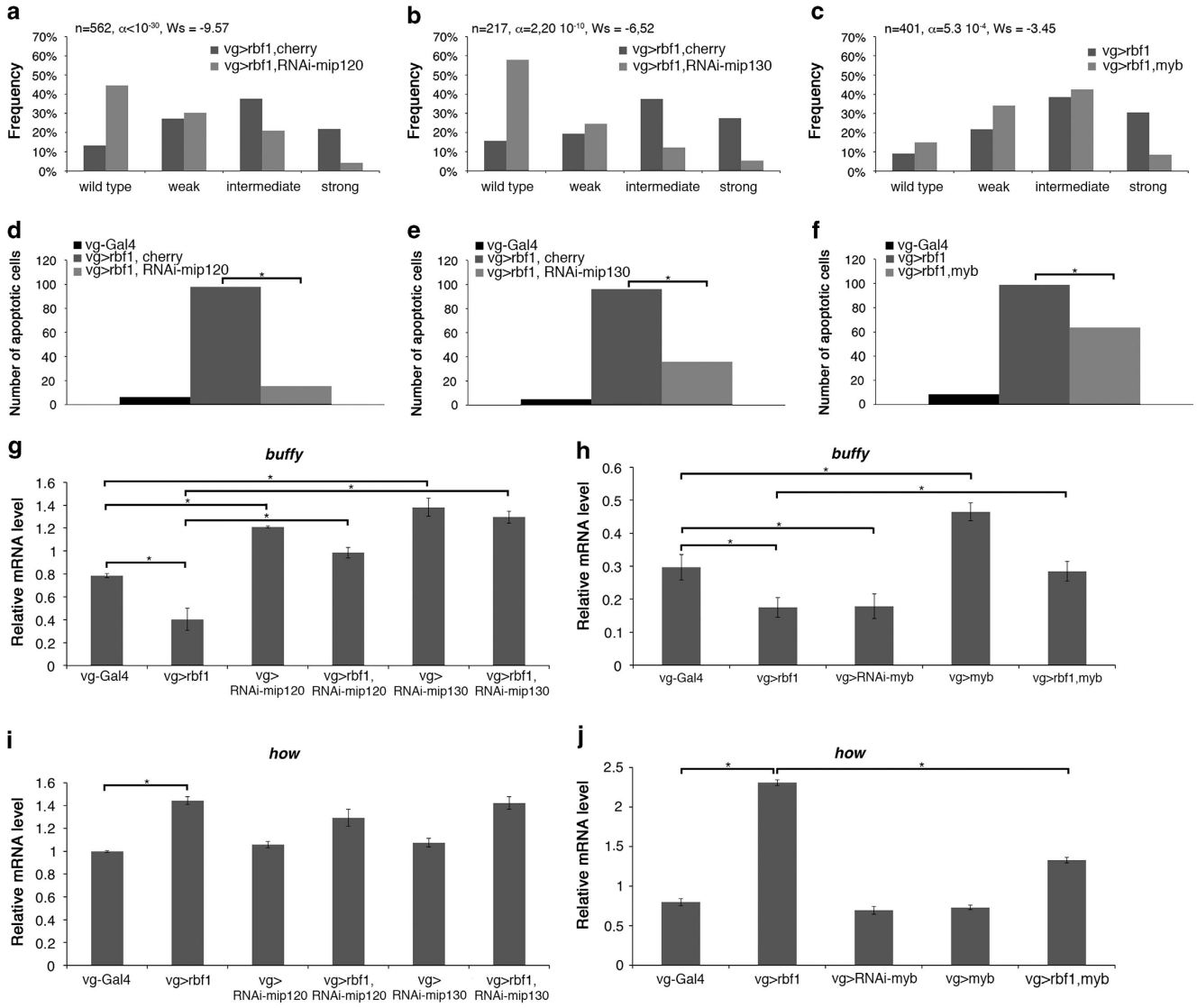


Figure 5 Mip proteins and Myb are differentially involved in Rbf1-induced apoptosis. (**a**–**c**) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-cherry* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-RNAi-mip120* (**a**), in *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-cherry* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-RNAi-mip130* (**b**) and in *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1; UAS-myb* (**c**). Wing phenotypes were grouped in four categories according to the number of notches (wild type, weak, intermediate, strong). Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests. Each experiment was independently performed three times; as the results were similar, only one experiment is presented here. (**d**–**f**) Quantification of TUNEL-positive cells in the wing pouch of genotypes studied in (**a**–**c**). Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$). (**g**–**j**) Quantification of *buffy* (**g**, **h**) and *how* (**i**, **j**) mRNA in wing imaginal discs by RT-qPCR. Data are normalized against *rp49* and correspond to the mean of three independent experiments. Error bars are the S.E.M. Asterisks indicate statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $P<0.05$)

transcriptional regulation: whereas Myb activated *buffy* transcription, Mip factors repressed it.

Inactivation of *Mip120* or *Mip130* by *RNAi* did not affect the basal level of *how* mRNA (Figure 5i). Moreover, when *rbf1* was co-overexpressed with either *RNAi-mip120* or *RNAi-mip130*, the amount of *how* mRNA was similar to the one observed for *rbf1* overexpression alone, suggesting that these Mip factors are not involved in the transcriptional regulation of *how* by Rbf1.

Inactivation or overexpression of *myb* did not alter the basal amount of *how* mRNA (Figure 5j). However, *rbf1* and *myb* co-overexpression decreased the level of *how* mRNA as compared with the *rbf1* overexpression alone. These data suggest that, contrary to dE2F2, Myb antagonizes Rbf1-induced *how* transcriptional activation.

Discussion

E2F transcription factors are the main partners of Rbf1. dE2F1 is widely described for its important role in the control of cell proliferation by Rbf1, whereas the best-described role of dE2F2 is the repression of replication during oogenesis.[35,40] Here, we show that dE2F2 and dDP are required for Rbf1-induced apoptosis suggesting that they are pro-apoptotic factors, contrary to dE2F1, which inhibits this apoptosis. Until now, dE2F1 was mainly described as a pro-apoptotic factor, whereas dE2F2 was most of the time described as an anti-apoptotic factor. Indeed, *de2f1* and *dDp* co-expression induces apoptosis in the eye imaginal discs[23] and dE2F1 promotes irradiation-induced Dp53-independent apoptosis in wing

imaginal discs, whereas dE2F2 inhibits apoptosis in the same model.[41] Recently, Rovani *et al.*[42] showed that the dREAM complex, which includes dE2F2, cooperates with the pro-apoptotic factor Grim to induce cell death in the peripheral nervous system. This result suggests a pro-apoptotic role for dE2F2, which is consistent with our results. Furthermore, the role of dE2F1 in apoptosis might depend on the cellular context. Indeed, dE2F1 is important for DNA damage-induced apoptosis in the wing imaginal discs, but its role varies depending on the position of the cell within the disc.[43] Together, this result and ours indicate that the role of both dE2F1 and dE2F2 in apoptosis control depends on the cellular context. Similarly, depending on the cells or tissues, Rbf1 has a pro- or anti-apoptotic effect. Indeed, RBF expression induces apoptosis in different proliferative tissues, whereas this effect was not observed in differentiated post-mitotic cells.[26]

RNAi-based studies suggested a requirement of *buffy* for cell survival during embryonic development.[44] Another study suggests that Buffy is not involved in developmental cell death but modulates the response to irradiation-induced cell death.[45] Here, we show that *buffy* is involved in apoptosis induced by overexpression of the tumor suppressor gene *rbf1*. Furthermore, our data reveal for the first time that Rbf1 regulates *buffy* transcription. It would thus be interesting to determine whether Rbf1 also regulates *buffy* in response to irradiation.

At least in some cancers, pRb oncosuppressor activity relies on its apoptosis-inducing activity. It has been suggested that RB mutations can affect the sensitivity to mitomycin/anthracycline treatment in breast cancer.[46] Several reports underline the importance of pRb in the apoptotic response of prostate cancer cells to radiotherapy or chemotherapeutic drugs.[11,12,47] How pRb mediates apoptosis in these cases remains unclear. Other data show that DNA damage promotes the formation of a pRB/E2F1 complex involved in the activation of pro-apoptotic genes such as *Caspase 7* and *p73*,[13] and that RB/E2F-1 is a major contributor of *Noxa* induction in response to ABT-737 treatment, a Bcl-2 inhibitor.[48] Thus, pRb/E2F proapoptotic signaling(s) can be activated in response to oncogenic stress, DNA damage or Bcl-2 inhibition. Similarly, our data show that in *Drosophila*, Rbf1/dE2F2 can regulate apoptosis by upregulating *how* (Figure 6). Although this regulation seems non-essential to maintain the *how* mRNA basal level, we cannot exclude that it occurs in response to some stresses and/or therapeutic treatments. Indeed, *Quaking*, the homolog of *how*, has been shown to be a tumor suppressor.[49–51] It would be interesting to study whether a pRb/E2F complex can regulate a mammalian homolog of the dIAP1 gene via Quaking.

Rbf1 and dE2F2 belong to a large complex called dREAM. Inactivation of members of dREAM by RNAi in Kc cells leads to variations of *how* and *buffy* expression,[32] which suggests that these two genes could be direct transcriptional targets of dREAM. Such as described by Georlette *et al.*,[32] we found that the involvement of dREAM complex members are not equivalent: some members can be activators for a specific target, whereas others are repressors or are not involved in transcriptional regulation of this target. Indeed dE2F2, Mip120 and Mip130 are required for Rbf1-induced transcriptional repression of *buffy*, whereas Myb has an opposite effect. Moreover, contrary to dE2F2 and Myb, Mip120 and Mip130 are not involved in *how* regulation.

dE2F2 and Myb have opposite effects on Rbf1-induced *buffy* and *how* transcription. Our results are in agreement with transcriptomic data indicating that there are no genes negatively co-regulated by Myb and dE2F2 but many genes are regulated both positively by Myb and negatively by dE2F2.[32]

Our results confirm a previous report[32] indicating that Rbf1 and the dREAM complex can act both as a transcriptional activator and as a transcriptional repressor (Figure 6). The molecular mechanisms for transcriptional repression have

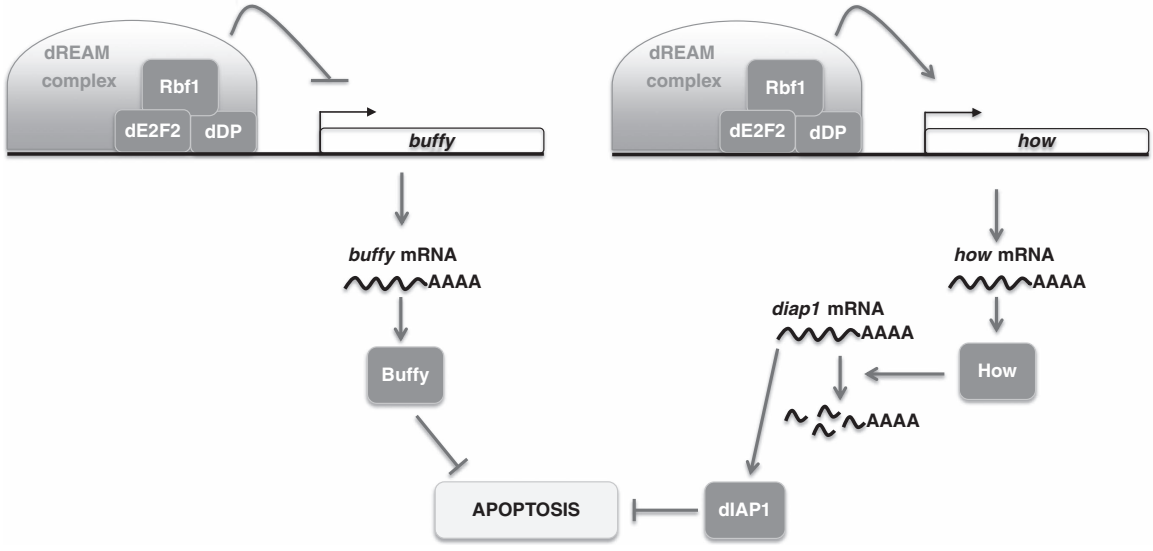


Figure 6 Rbf1-induced apoptosis involved transcriptional regulation of *buffy* and *how* genes. Rbf1 with dE2F2 binds *buffy* genomic site near to TSS and represses its transcription. The decrease of *buffy* mRNA contributes to Rbf1-induced apoptosis. Rbf1 can also bind *how* promoter with dE2F2 but this time it induces a transcriptional upregulation. As a consequence, How level increases allowing *diap1* mRNA degradation which promotes Rbf1-induced cell death. Some members of the dREAM complex are involved in these transcriptional regulations

been deciphered.[31] It would be interesting to determine which epigenetic mechanisms are involved in the transcriptional activation of dREAM complex target genes.

Using an overexpression system, we have identified the *bcl-2* family gene *buffy*, as a transcriptional target of Rbf1. In an *rbf1* loss-of-function mutant, *buffy* transcription increases show that in wild-type cells not committed to apoptosis, Rbf1 is necessary to limit *buffy* expression. Thus, *rbf1* loss of function could render cells more resistant to apoptosis. Identification of *buffy* as an Rbf1/dE2F pathway target gene is consistent with the role of tumor suppressor described for the human counterpart Rb. Transcriptional regulation of *bcl-2* family genes by Rb/E2F complexes has also been characterized in mammals. Indeed, pRb/E2F1 directly regulates *noxa*,[48] *bim*[52] and *puma*.[53] Regulation by Rb of *bcl-2* family gene expression may have a major impact on cell death and can thus contribute to its tumor suppressor action.

Materials and Methods

Fly stocks. Flies were raised at 25 °C on a standard medium. The *UAS-Rbf1* and *vg-Gal4* strains were generous gifts from J Silber. The *en-Gal4* strain was kindly provided by L Théodore. The *UAS-diap1* strain was a generous gift from A-M Pret. In this strain, a transgene containing *diap1* cDNA under the control of a UAS sequence is inserted on the second chromosome and allows the expression of *diap1* without its 3′UTR sequence. The *UAS-diap1*^{UY1835} was a kind gift from S Netter.[38] In this transgenic line, a *P* element is inserted in the 5′UTR sequence of *diap1* gene in the correct orientation to allow the expression of *diap1* with its 3′UTR sequence. The following strains were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington, IN, USA): *dE2F2*^{76Q1} (7436), *UAS-dE2F2* (17314), *dDp*^{a1} (7277), *dE2F1*^{i2} (7274), *buffy*^{H37} (27340), *UAS-buffy* (32059), *diap1-lacZ* (12093), *how*^{stru} (2301), *UAS-RNAi-mip120* (32461), *UAS-RNAi-mip130* (32462), *UAS-RNAi-myb* (35053), *UAS-myb* (32044). The *UAS-RNAi-diap1* strain was from NIG collection (12284R-2). The *UAS-RNAi-rbf1* strain was from VDRC collection (10696).

Test of phenotype suppression in the wing. To test the implication of several genes (*dE2F1*, *dE2F2*, *dDP*, *Buffy*, *Diap1*, *How*, *Mip120*, *Mip130* and *Myb*) in *rbf1*-induced apoptosis, the severity of the notched wing phenotype induced by *UAS-Rbf1* overexpression led by *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic contexts. For each gene, we verified that the alteration of this gene expression level (overexpression, RNAi or mutant) did not induce any wing phenotype. *vg-Gal4 > UAS-Rbf1 Drosophila* females were crossed with males bearing a loss-of-function mutation for the different genes or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing margin. Wilcoxon tests were performed as described previously.[54]

TUNEL staining of imaginal discs. Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/formaldehyde 3.7%, washed three times for 10 min in PBT (1 × PBS, 0.5% Triton). Discs were then dissected and TUNEL staining was performed according to manufacturer's instructions (ApopTag Red *in situ* apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley, Marne-La-Vallée, France) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). White patches in the wing pouch were counted for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's *t*-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha <$ 5%.

Immunochemistry. The following antibodies were used: anti-β-Gal (mouse monoclonal antibody, 1/200, 40-1a, DSHB) and anti-Diap1 (mouse monoclonal antibody, 1/200, generous gift from B Hay). Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS-3.7% formaldehyde, washed three times for 10 min each in PBT (PBS, 0,3% Triton) and incubated with primary antibody overnight at 4 °C in PBT-FCS (PBS, 0,3% Triton, 10% FCS). Incubation with anti-mouse secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) Antibody, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was carried in PBT-FCS for 2 h at room temperature. Larvae were then washed thrice in PBT. Finally, wing discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope.

Chromatin immunoprecipitation. ChIPs were performed as previously described,[55] with minor modification. Briefly, 50 *vg-Gal4 > UAS-rbf1* wing imaginal discs of third instar larvae were dissected on ice in serum-free Schneider medium. They were fixed in 500 μl of formaldehyde (1.8% in PBS) for 10 min at room temperature under gentle agitation. Cross-linking was stopped by adding 50 μl of glycine 1.25 M. Fixed wing discs were washed 3 times with PBS, dried, flash-freezed in liquid nitrogen and stored at − 80 °C. Cell lysis was performed by adding 100 μl of lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, Roche complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) complemented with 1% SDS and sonicated in a Bioruptor sonifier (Diagenode, Seraing, Belgium). Conditions were established to obtain chromatin fragments from 200 to 1000 bp in length (30 s ON 30 s OFF, high power, 10 cycles). Pooled chromatin was centrifuged for 20 min at 14 000 *g* at 4 °C. The supernatant (soluble chromatin) was recovered and 10 μl were kept as input sample. For each IP, 10 μl of protein A-coated paramagnetic beads (Diagenode) were washed once in lysis buffer, 1 μg of antibody was added and beads were incubated for 2 h at 4 °C on a rotating wheel. After washing in lysis buffer, antibody coated beads were resuspended in 300 μl of lysis buffer and 100 μl of chromatin were added. After incubation on a rotating wheel overnight at 4 °C, beads were washed at 4 °C five times for 10 min each in lysis buffer, once in LiCl buffer (Tris-HCl 10 mM pH8.0, LiCl 0.25 M, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) and twice in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Immunoprecipitated as well as input DNAs were purified with the IPure kit following the manufacturer's instructions (Diagenode). Elution was performed twice with 35 μl of water. 5 μl of DNA were used per PCR. Real-time PCR data were normalized against the input sample and depicted as percentage of input (see Supplementary Table S1 for primers). *pcna*, a well characterized target of Rbf1/dE2F complexes, was used as a positive control and *slp1*, a nontarget gene of Rbf1,[39] as a negative control.

Antibodies used for chromatin immunoprecipitation were anti-Rbf1 (rabbit polyclonal, Custom antibody against amino acids 250-845 of Rbf1 protein, Proteogenix, Schiltigheim, France), anti-dE2F2 (rabbit polyclonal, Custom antibody against the whole protein, Proteogenix). Rabbit pre-immune sera were used as negative controls (mocks).

RNAs extraction and RT-qPCR. Fifty wing imaginal discs per genotype were dissected on ice in serum-free Schneider medium. Total RNAs were extracted from each sample using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), by following the manufacturer's instructions. RT was performed on each sample using 4.8 μg of RNA incubated with random primer oligonucleotides (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with Recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR analysis was performed using the ABI Prism 7700 HT apparatus (Applied Biosystems, Life Technologies). Briefly, PCR was performed with the ABsolute blue QPCR SYBR Green ROX mix (Abgene, Thermo Fisher Scientific), using 11 ng of cDNA per RT. The primers used for real-time PCR are presented in Supplementary Table S2. Data were normalized against *rp49*. Three independent RT experiments were performed and the S.E.M was calculated from these three independent samples.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are grateful to S Szuplewski, S Gaumer and F Peronnet for their critical reading of the manuscript. We thank B Hay for a generous gift of dIAP1 antibody. Confocal microscopy was performed on CYMAGES imaging facility. qPCR experiments were done in the UMR 1198 'Biologie du Développement et Reproduction' (INRA, Jouy-en-Josas). This work was supported by the 'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines' (UVSQ) and by grants from the 'Ligue Nationale Contre le Cancer'. Amandine Clavier was the recipient of a doctoral contract from UVSQ. Adrienne Baillet was supported by the UVSQ and the Ecole Pratique des Hautes Etudes.

1. van den Heuvel S, Dyson NJ. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 713–724.
2. Frolov MV, Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2173–2181.

3. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W *et al.* Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5436–5440.
4. Knudsen KE, Booth D, Naderi S, Sever-Chroneos Z, Fribourg AF, Hunton IC *et al.* RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7751–7763.
5. Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML *et al.* Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992; **359**: 328–330.
6. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; **359**: 295–300.
7. Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K *et al.* Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992; **359**: 288–294.
8. Tsai KY, Hu Y, Macleod KF, Crowley D, Yamasaki L, Jacks T. Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 1998; **2**: 293–304.
9. Huh MS, Parker MH, Scime A, Parks R, Rudnicki MA. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J Cell Biol* 2004; **166**: 865–876.
10. Biasoli D, Kahn SA, Cornelio TA, Furtado M, Campanati L, Chneiweiss H *et al.* Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e767.
11. Zhao X, Day ML. RB activation and repression of C-MYC transcription precede apoptosis of human prostate epithelial cells. *Urology* 2001; **57**: 860–865.
12. Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP. Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res* 1998; **58**: 3275–3281.
13. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I *et al.* Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 2009; **15**: 184–194.
14. Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, Ianari A *et al.* The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev* 2013; **27**: 1003–1015.
15. Dynlacht BD, Brook A, Dembski M, Yenush L, Dyson N. DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6359–6363.
16. Ohtani K, Nevins JR. Functional properties of a *Drosophila* homolog of the E2F1 gene. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 1603–1612.
17. Sawado T, Yamaguchi M, Nishimoto Y, Ohno K, Sakaguchi K, Matsukage A. dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 409–415.
18. Du W, Vidal M, Xie JE, Dyson N. RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* 1996; **10**: 1206–1218.
19. Stevaux O, Dimova D, Frolov MV, Taylor-Harding B, Morris E, Dyson N. Distinct mechanisms of E2F regulation by Drosophila RBF1 and RBF2. *Embo J* 2002; **21**: 4927–4937.
20. Du W. Suppression of the rbf null mutants by a de2f1 allele that lacks transactivation domain. *Development* 2000; **127**: 367–379.
21. Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M *et al.* Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 2001; **15**: 2146–2160.
22. Du W, Dyson N. The role of RBF in the introduction of G1 regulation during Drosophila embryogenesis. *Embo J* 1999; **18**: 916–925.
23. Du W, Xie JE, Dyson N. Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the Drosophila eye. *Embo J* 1996; **15**: 3684–3692.
24. Asano M, Nevins JR, Wharton RP. Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* 1996; **10**: 1422–1432.
25. Zhou L, Steller H. Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in Drosophila embryos. *Dev Cell* 2003; **4**: 599–605.
26. Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I. The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010; **9**: 97–103.
27. Korenjak M, Anderssen E, Ramaswamy S, Whetstine JR, Dyson NJ. RBF binding to both canonical E2F targets and noncanonical targets depends on functional dE2F/dDP complexes. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 4375–4387.
28. Korenjak M, Taylor-Harding B, Binne UK, Satterlee JS, Stevaux O, Aasland R *et al.* Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 2004; **119**: 181–193.
29. Taylor-Harding B, Binne UK, Korenjak M, Brehm A, Dyson NJ. p55, the Drosophila ortholog of RbAp46/RbAp48, is required for the repression of dE2F2/RBF-regulated genes. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 9124–9136.
30. Lewis PW, Beall EL, Fleischer TC, Georlette D, Link AJ, Botchan MR. Identification of a Drosophila Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev* 2004; **18**: 2929–2940.
31. Lee H, Ohno K, Voskoboynik Y, Ragusano L, Martinez A, Dimova DK. Drosophila RB proteins repress differentiation-specific genes via two different mechanisms. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 2563–2577.
32. Georlette D, Ahn S, MacAlpine DM, Cheung E, Lewis PW, Beall EL *et al.* Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the Drosophila Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. *Genes Dev* 2007; **21**: 2880–2896.
33. Acharya P, Negre N, Johnston J, Wei Y, White KP, Henry RW *et al.* Evidence for autoregulation and cell signaling pathway regulation from genome-wide binding of the Drosophila retinoblastoma protein. *G3 (Bethesda)* 2012; **2**: 1459–1472.
34. Frolov MV, Moon NS, Dyson NJ. dDP is needed for normal cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3027–3039.
35. Bosco G, Du W, Orr-Weaver TL. DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 289–295.
36. Reuveny A, Elhanany H, Volk T. Enhanced sensitivity of midline glial cells to apoptosis is achieved by HOW(L)-dependent repression of Diap1. *Mech Dev* 2009; **126**: 30–41.
37. Volk T, Israeli D, Nir R, Toledano-Katchalski H. Tissue development and RNA control: 'HOW' is it coordinated? *Trends Genet* 2008; **24**: 94–101.
38. Marchal C, Vinatier G, Sanial M, Plessis A, Pret AM, Limbourg-Bouchon B *et al.* The HIV-1 Vpu protein induces apoptosis in Drosophila via activation of JNK signaling. *PLoS One* 2012; **7**: e34310.
39. Acharya P, Raj N, Buckley MS, Zhang L, Duperon S, Williams G *et al.* Paradoxical instability-activity relationship defines a novel regulatory pathway for retinoblastoma proteins. *Mol Biol Cell* 2010; **21**: 3890–3901.
40. Tower J. Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet* 2004; **38**: 273–304.
41. Wichmann A, Uyetake L, Su TT. E2F1 and E2F2 have opposite effects on radiation-induced p53-independent apoptosis in Drosophila. *Dev Biol* 2010; **346**: 80–89.
42. Rovani MK, Brachmann CB, Ramsay G, Katzen AL. The dREAM/Myb-MuvB complex and Grim are key regulators of the programmed death of neural precursor cells at the Drosophila posterior wing margin. *Dev Biol* 2012; **372**: 88–102.
43. Moon NS, Frolov MV, Kwon EJ, Di Stefano L, Dimova DK, Morris EJ *et al.* Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. *Dev Cell* 2005; **9**: 463–475.
44. Quinn L, Coombe M, Mills K, Daish T, Colussi P, Kumar S *et al.* Buffy, a Drosophila Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *EMBO J* 2003; **22**: 3568–3579.
45. Sevrioukov EA, Burr J, Huang EW, Assi HH, Monserrate JP, Purves DC *et al.* Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. *Genesis* 2007; **45**: 184–193.
46. Berge EO, Knappskog S, Geisler S, Staalesen V, Pacal M, Borresen-Dale AL *et al.* Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. *Mol Cancer* 2010; **9**: 173.
47. Sharma A, Comstock CE, Knudsen ES, Cao KH, Hess-Wilson JK, Morey LM *et al.* Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 6192–6203.
48. Bertin-Ciftci J, Barre B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, Juin P *et al.* pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 755–764.
49. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M *et al.* High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 665–677.
50. Bian Y, Wang L, Lu H, Yang G, Zhang Z, Fu H *et al.* Downregulation of tumor suppressor QKI in gastric cancer and its implication in cancer prognosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **422**: 187–193.
51. Zhao Y, Zhang G, Wei M, Lu X, Fu H, Feng F *et al.* The tumor suppressing effects of QKI-5 in prostate cancer: a novel diagnostic and prognostic protein. *Cancer Biol Ther* 2014; **15**: 108–118.
52. Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 16090–16095.
53. Hao H, Dong Y, Bowling MT, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, McMasters KM. E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* 2007; **7**: 24.
54. Brun S, Rincheval V, Gaumer S, Mignotte B, Guenal I. reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila. *Oncogene* 2002; **21**: 6458–6470.
55. Coleno-Costes A, Jang SM, de Vanssay A, Rougeot J, Bouceba T, Randsholt NB *et al.* New partners in regulation of gene expression: the enhancer of Trithorax and Polycomb Corto interacts with methylated ribosomal protein l12 via its chromodomain. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1003006.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group*****. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

Table S1

	up	down
slp-1	5'-CGCATTAGCTACCCGTCTCT-3'	5'-TGGTTTCTGATTCTCACACACGAC-3'
pcna	5'-CGTGCCTCGAACATATTGAA-3'	5'-ACATCCCTATCCCGCTCATT-3'
buffy	5'- CAAACATTGGCTCGTTGTTG-3'	5'- CCCTGCTTACCCATCCATTA-3'
how	5'-ATCGGTTAAGTGGCCTTGTG-3'	5'-TCTCTCACCCTCGCTCATTT-3'

Table S2

	up	down
rp49	5'-GACGCACTCTGTTGTCGATAC-3'	5'-TACAGGCCCAAGATCGTGAAG-3'
buffy	5'-TACACGATTG GCTGGAAGGC-3'	5'-AATGACCGCA CAGGCAACGA-3'
diap1	5'-TTCTCTGGC TCCTTTCCTCT-3'	5'-TTCCTTGTCTGCCGCACAAT-3'
how	5'-AACTTTGTCGGTCGCATTTT-3'	5'-CGTCCTCCTTCTTCTTGTCG-3'
how(L)	5'- CACACAAACCACACAACACG-3'	5'- GGTGTGTGCTTTTCTGACGA-3'

Tables S1 and S2 : Primers used for real-time PCR

II. Manuscrit n°2 : Rbf1 induit une apoptose mitochondriale dépendante de *debcl* et *drp1*.

Les premières données obtenues au cours de ma thèse indiquent que l'activité pro-apoptotique de Rbf1 dépend de sa capacité à réprimer l'expression de *buffy*, un facteur anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Chez la drosophile, la famille Bcl-2 contient uniquement deux membres : Buffy et Debcl (Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). Ces deux protéines agissent souvent de façon opposée et sont toutes les deux localisées au niveau de la mitochondrie (Doumanis *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003; Senoo-Matsuda *et al.*, 2005; Sevrioukov *et al.*, 2007; Tsubouchi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2000). Toutefois, les bases moléculaires du contrôle de l'apoptose par Buffy et Decbl sont relativement peu décrites.

Par le biais de tests d'interaction génétique, nous avons pu mettre en évidence que *debcl* est requis, en aval de *buffy*, pour la mort induite par Rbf1. Ces données suggèrent l'existence d'une voie de mort mitochondriale dépendante de *debcl* induite en réponse à la surexpression de *rbf1* dans les cellules du disque imaginal d'aile. Une partie de mes travaux de thèse a donc consisté à caractériser cette voie d'apoptose mitochondriale.

Une fragmentation du réseau mitochondrial survient fréquemment au cours des processus apoptotiques que ce soit chez la drosophile ou chez les mammifères (*cf.* dans l'introduction le paragraphe I.B.4.e) (Abdelwahid *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2001; Galindo *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2007). Nous avons pu montrer qu'il existe une fragmentation mitochondriale dépendante de *debcl* au cours de la mort cellulaire induite par Rbf1. Drp1 est le principal effecteur de la fission mitochondriale. Drp1 est une grande GTPase principalement cytosolique qui fait la navette entre le cytosol et la membrane externe mitochondriale. Une fois recrutée à la mitochondrie, Drp1 s'oligomérise et induit une courbure puis une constriction des membranes mitochondriales ce qui conduit à la fission. Nos données indiquent que Drp1 est requis pour la mort cellulaire induite par Rbf1. De plus, nous avons pu mettre en évidence, par des expériences de fractionnement cellulaire, qu'en réponse à la surexpression de *rbf1,* Drp1 est recruté à la mitochondrie de façon dépendante de *debcl*. Nous avons également pu montrer que ce recrutement est corrélé à une interaction physique entre Debcl et Drp1 qui pourrait être directe. De façon intéressante, Buffy s'oppose à cette interaction.

En outre, nos travaux indiquent que la surexpression de *rbf1* conduit à une production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) au niveau de la mitochondrie, de façon dépendante de *debcl* et *drp1*. Ces EAO sont requis pour activer la voie JNK ce qui *in fine* déclenche la mort cellulaire.

L'ensemble de ces données constitue un manuscrit actuellement en révision à « Journal of Cell Science ». Nos résultats soulignent la place de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 et contribuent à mieux caractériser la fonction pro-apoptotique de Debcl chez la drosophile.

Title: The Drosophila retinoblastoma protein, Rbf1, induces a *debcl* and *drp1*-dependent mitochondrial apoptosis.

Running title: Rbf1 induces Debcl-dependent apoptosis

Authors: Amandine Clavier[1,2], Vincent Ruby[1], Aurore Rincheval-Arnold[1], Bernard Mignotte[1,2], Isabelle Guénal[1]

[1] Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

[2] Ecole Pratique des Hautes Etudes, 4-14, rue Ferrus - 75014 Paris

Corresponding author: Isabelle Guénal, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France. Tel: +33 (0)1 70 42 94 36; E-mail: isabelle.guenal@uvsq.fr

Abstract:

In accordance with its tumor suppressor role, the Retinoblastoma protein pRb can ensure pro-apoptotic functions. *rbf1*, the Drosophila homolog of *Rb*, also displays a pro-apoptotic activity in proliferative cells. We previously showed that *rbf1* pro-apoptotic activity depends on its ability to decrease the level of anti-apoptotic proteins such as the Bcl-2 family protein Buffy. Buffy often acts opposite to Debcl, the other Drosophila Bcl-2-family protein. Both proteins can localize at the mitochondrion, but the way they control apoptosis still remains unclear. Here, we demonstrate that *debcl* and the pro-fission gene *drp1* are necessary downstream of *buffy* to trigger a mitochondrial fragmentation during *rbf1*-induced apoptosis. Interestingly, *rbf1*-induced apoptosis leads to a *debcl*- and *drp1*-dependent Reactive Oxygen Species production, which in turn activates the Jun Kinase pathway to trigger cell death. Moreover, we show that Debcl and Drp1 can interact and that Buffy inhibits this interaction. Notably, Debcl modulates Drp1 mitochondrial localization during apoptosis. These results provide a mechanism by which Drosophila Bcl-2 family proteins can control apoptosis and shed light on a link between Rbf1 and mitochondrial dynamics, *in vivo*.

Key words: Apoptosis, mitochondrial dynamics, Debcl, Rbf1, Drp1

Introduction

The retinoblastoma susceptibility gene (*Rb*) is a tumor suppressor gene mutated in a large variety of cancer (Di Fiore et al., 2013). Its tumor suppressive activity is at least partially dependent on its ability to induce cell cycle arrest. However, the role of pRb in cancer is not limited to cell cycle regulation and appears to be more complex. Indeed, pRb can be pro- (Bowen et al., 1998; Hilgendorf et al., 2013; Ianari et al., 2009) or anti-apoptotic (Biasoli et al., 2013; Morgenbesser et al., 1994; Tsai et al., 1998), and the regulation of these dual roles of pRb toward apoptosis is still largely not understood. The ability of pRb to induce apoptosis fits with its tumor suppressor function. Deciphering the molecular mechanisms involved in pRb pro-apoptotic activity could provide important clues for a better understanding of pRb role in cancer suppression. Drosophila allows us to characterize *in vivo* the properties of *rbf1*, the *Rb* homologue, in the control of apoptosis. As pRb, Rbf1 can be either pro- or anti-apoptotic depending on the cellular context. For instance, *rbf1* overexpression in proliferating cells of wing imaginal discs leads to apoptosis (Milet et al., 2010). Moreover, we recently showed that *rbf1* induces cell death by reducing expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family gene *buffy* (Clavier et al., 2014) which encodes a mitochondrial protein, suggesting the existence of a mitochondrial death pathway in Rbf1-induced apoptosis.

Mitochondria have a pivotal role in apoptosis regulation in vertebrates (Estaquier et al., 2012; Green et al., 2014; Tait and Green, 2013). Intermembrane space proteins, such as cytochrome c, are released in the cytosol to promote caspase activation. This process requires mitochondrial outer membrane permeabilization, which is tightly regulated by Bcl-2 family proteins (Garcia-Saez, 2012; Hardwick and Soane, 2013). In Drosophila, this family contains only two members: *buffy* (Quinn et al., 2003) and *debcl (Death executioner Bcl-2 homologue)* (Brachmann et al., 2000; Colussi et al., 2000; Igaki et al., 2000; Zhang et al., 2000). Although *debcl* is not required for most of developmental cell death, *debcl* is necessary for apoptosis in specific context such as pruning cells and embryonic cell death (Galindo et al., 2009; Senoo-Matsuda et al., 2005) or DNA damage-induced apoptosis (Sevrioukov et al., 2007). Moreover, ectopic expression of *debcl* induces apoptosis (Brachmann et al., 2000; Colussi et al., 2000; Igaki et al., 2000; Zhang et al., 2000). Thus, the mitochondrial protein Debcl has pro-apoptotic activity in fly. Buffy suppresses Debcl-induced cell death (Quinn et al., 2003)

whereas *debcl* is required to inhibit *buffy* in DNA damage-induced apoptosis (Sevrioukov et al., 2007). Therefore, Buffy can act as an anti-apoptotic protein by physically interacting with Debcl (Quinn et al., 2003). Nevertheless, the mode of action of the Drosophila Bcl-2 proteins remains elusive.

Although early studies did not emphasized a crucial role of mitochondria during apoptosis in fly (Dorstyn et al., 2004; Means et al., 2006; Zimmermann et al., 2002), more recent data give it a more significant place. First, key players of Drosophila apoptosis are localized to mitochondria such as the caspases Dronc and Drice (Dorstyn et al., 2002) or the pro-apoptotic proteins Reaper (Freel et al., 2008; Olson et al., 2003; Thomenius et al., 2011), Hid (Abdelwahid et al., 2007; Morishita et al., 2013) and Grim (Claveria et al., 2002). For some of them, the loss of mitochondrial localization is associated with a reduction of the pro-apoptotic function (Abdelwahid et al., 2007; Freel et al., 2008; Olson et al., 2003; Sandu et al., 2010). Second, caspases can be activated *in vitro* by mitochondria from apoptotic S2 cells (Varkey et al., 1999) suggesting that some mitochondrial proteins are required for apoptosis. Such proteins were identified, i.e., dOmi (Challa et al., 2007) and dTSPO (drosophila translocator protein) (Lin et al., 2014) for irradiation-induced apoptosis and cytochrome c-d for developmental cell death in the eye (Mendes et al., 2006).

Of note, an increase in mitochondrial fragmentation can be observed during apoptosis in Drosophila. Drp1 (dynamin-related protein 1), a large GTPase of the dynamin family, is required for mitochondrial fission whereas the homologue of mitofusin 2 Marf (Mitochondrial assembly regulatory factor) and Opa1 (Optic atrophy 1) are respectively required for outer and inner mitochondrial membrane fusion. Knockdown of *drp1* using genetic mutants or RNA interference leads to apoptosis inhibition (Abdelwahid et al., 2007; Goyal et al., 2007), highlighting the role of mitochondrial dynamic in fly cell death. Interestingly, recent data indicate that Reaper induces mitochondrial fragmentation by binding and inhibiting the pro-fusion protein Marf. This decrease of mitochondrial fusion allows caspase activation and eventually apoptosis (Thomenius et al., 2011). However, the precise mechanisms of Drosophila mitochondrial cell death pathway remain to be uncovered. Especially a potential link between Bcl-2 family proteins and mitochondrial fission remains to be elucidated.

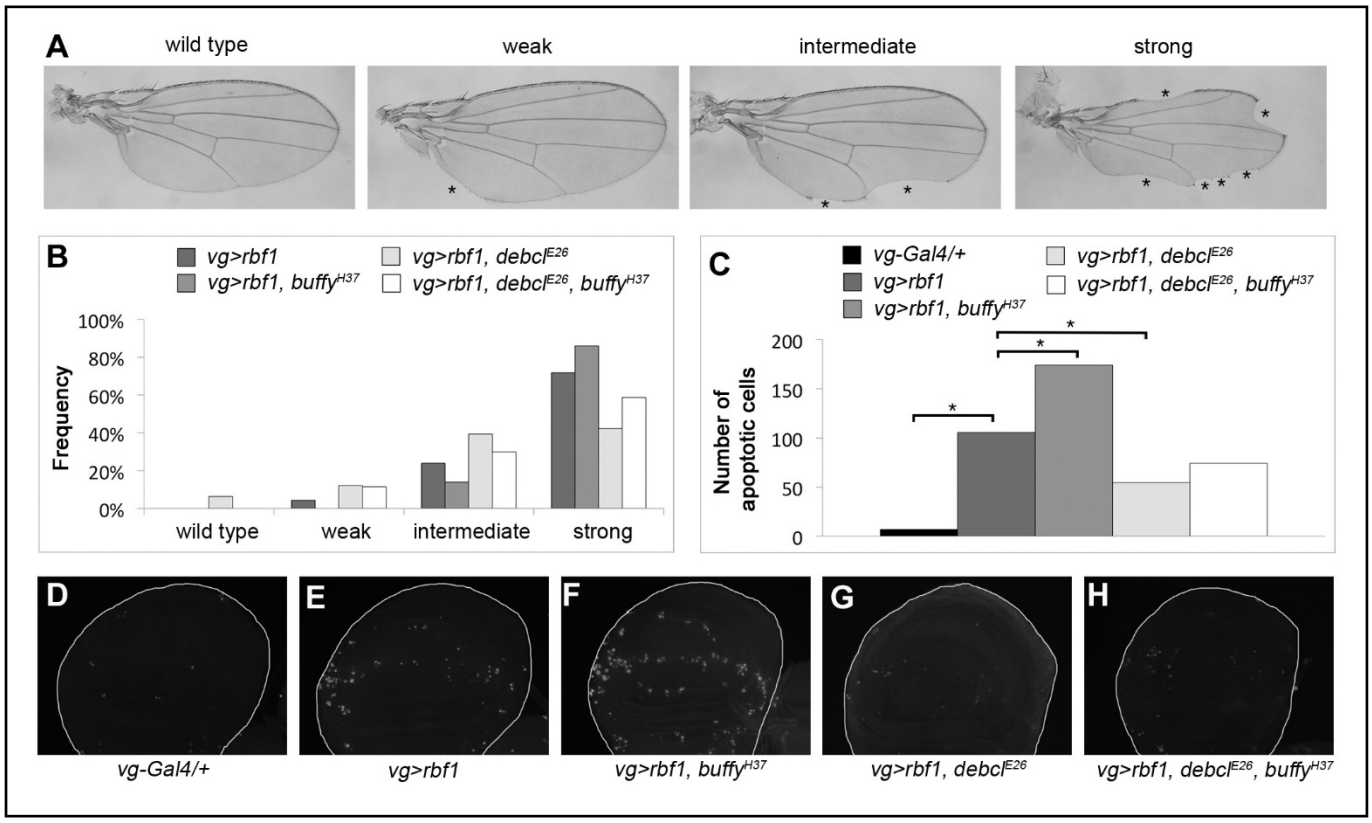


Figure 1: Rbf1-induced *debcl*-dependent apoptosis.

(A) Flies are classified into four categories (wild type, weak, intermediate and strong) according to the number of notches observed on the wing margin (asterisks) (Clavier et al., 2014).

(B) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,buffy^{H37}*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,debcl^{E26}* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,debcl^{E26},buffy^{H37}*. Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests: *debcl^{E26}*: n=305, $\alpha=4{,}25.10^{-8}$, Ws=-5,56; *buffy^{H37}*: n=349, $\alpha=6{,}53.10^{-4}$, Ws=3,40; *debcl^{E26},buffy^{H37}*: n=364, $\alpha=4{,}63.10^{-3}$, Ws=-2,82. Each experiment was independently performed three times; a representative experiment is shown.

(C) Quantification of apoptotic cells in the wing imaginal discs pouch visualized by TUNEL staining from the genotypes described previously.

(D-H) Apoptotic cells were visualized by TUNEL staining (white dots) of wing imaginal discs of the genotype indicated at the bottom of the image.

Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test $\alpha<0.05$).

In this study, we used Rbf1-induced apoptosis to highlight the role of Bcl-2 family genes in Drosophila apoptosis and display a new aspect of Rbf1 pro-apoptotic activity. We show that Debcl is required downstream of *buffy* in Rbf1-induced apoptosis. Debcl induces mitochondrial fragmentation by binding the pro-fission protein Drp1 which induces the production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), leading to the JNK (c-Jun N-terminal kinases) pathway activation and eventually cell death.

Result:

***debcl* is required downstream of *buffy* for Rbf1-induced apoptosis**

We previously showed that the Bcl-2 anti-apoptotic gene *buffy* counteracted Rbf1-induced apoptosis (Clavier et al., 2014). To determine if *debcl*, the second *Bcl-2* gene in Drosophila, was involved in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. As shown previously, *rbf1* overexpression at the dorso-ventral frontier of wing imaginal discs using the UAS-Gal4 system with the *vestigial (vg)* Gal4 driver induced notches along the wing margin. The number of notches correlated with the amount of apoptosis in wing imaginal discs of third instar larvae (Milet et al., 2010). Wing phenotypes were classified into four categories according to the number of notches: wild type (no notch), weak, intermediate and strong (Fig. 1A). When *rbf1* was overexpressed in loss of function mutant $debcl^{E26}$ heterozygous background, a significant shift of the distribution toward weaker phenotypes was observed as compared to overexpression of *rbf1* only (Fig. 1B), showing that *debcl* is necessary for Rbf1-induced notched wing phenotype. TUNEL staining quantification of third instar larval wing imaginal discs confirmed that the shift of phenotypic distribution was related to a variation of the amount of apoptosis in larvae. Indeed, many cells were TUNEL-labeled in *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* wing discs but we observed a significant decrease of TUNEL-labeled cells when *rbf1* was overexpressed in $debcl^{E26}$ background (Fig. 1C). These results indicate that Debcl has a pivotal role in Rbf1-induced apoptosis.

Because Rbf1 transcriptionally represses *buffy*, we hypothesized that *buffy* inhibition may indirectly activate Debcl in Rbf1-induced apoptosis. To determine the epistatic relation between *buffy* and *debcl* in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests.

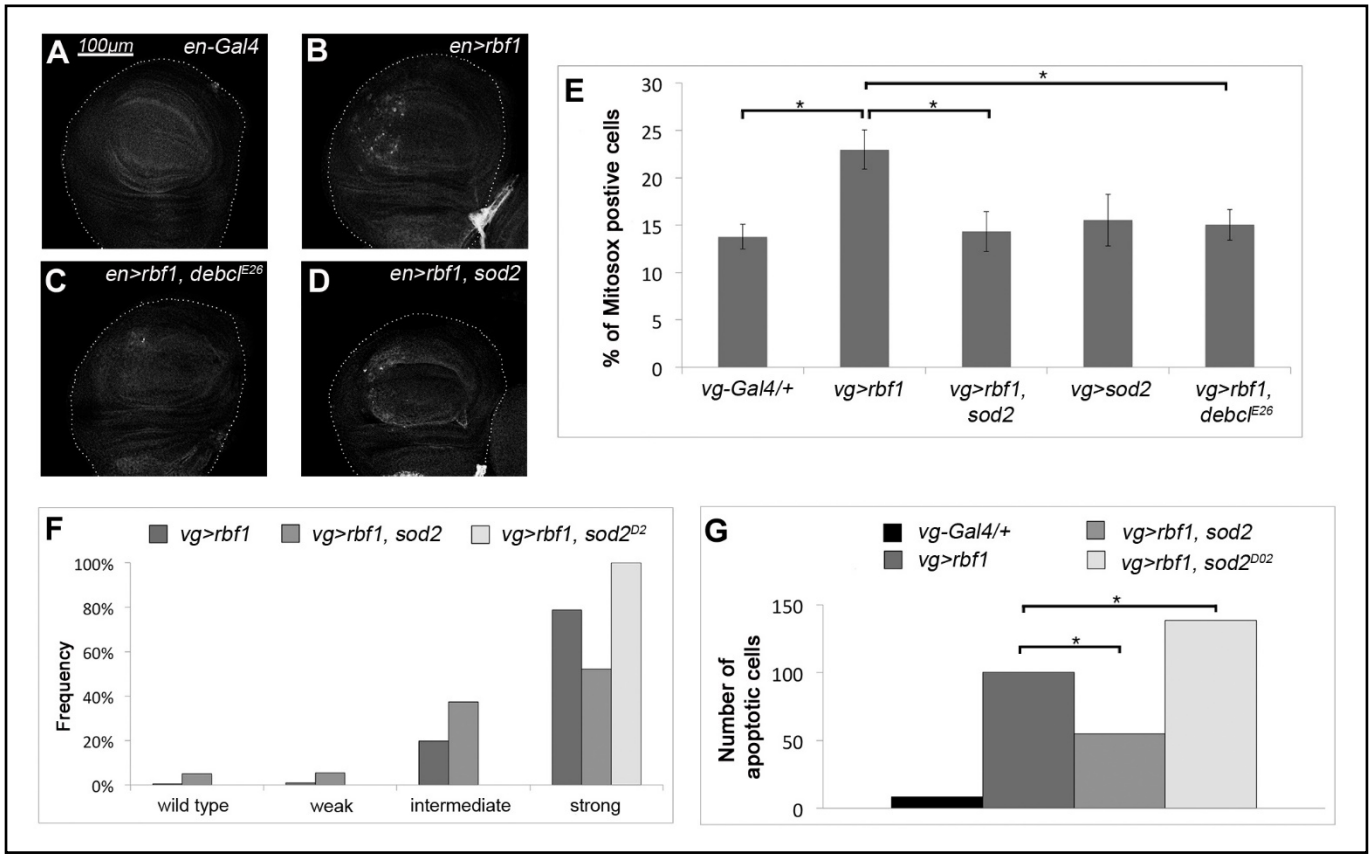


Figure 2: Rbf1 triggers ROS-dependent JNK activation and apoptosis.

(A-D) Anti-Mmp1 immunostaining (white dots), of wing imaginal discs from *en-Gal4* (a); *en-Gal4>UAS-rbf1* (b); *en-Gal4>UAS-rbf1,debcl*^{E26} (c) and *en-Gal4>UAS-rbf1,UAS-sod2* (d) larvae. All discs are shown with posterior to the left. Scale bar: 100 µm.

(E) Quantification by flow cytometry of MitoSOx staining (a mitochondrial superoxyde indicator) in wing imaginal discs from *en-Gal4*; *en-Gal4>UAS-rbf1*; *en-Gal4>UAS-rbf1,UAS-sod2*; *en-Gal4>UAS-sod2* and *en-Gal4>UAS-rbf1,debcl*^{E26} larvae.

(F) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *UAS-sod2* and *vg-Gal4>UAS-rbf1*, *sod2*$^{\Delta 02}$. Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests: *sod2*: n=423, $\alpha=3{,}37.10^{-9}$, Ws=-6,03; *sod2*$^{\Delta 02}$: n=269, $\alpha=5{,}3.10^{-4}$, Ws=3,46. Each experiment was independently performed three times; a representative experiment is shown.

(G) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining in wing imaginal discs from the genotypes described previously.

Error bars are the S.E.M.. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test $\alpha<0.05$).

When *rbf1* was overexpressed in a *buffy*^{H37} loss of function heterozygous background, distribution of the phenotypes significantly shifted toward stronger phenotypes as compared to expression of *rbf1* alone (Fig. 1B). Interestingly, in a *debcl*^{E26} heterozygote background, *buffy*^{H37} loss of function cannot induced anymore phenotypic aggravation (*vg-gal4/debcl*^{E26} *; UAS-rbf1/+* compared with *vg-gal4/debcl*^{E26} *buffy*^{H37} *; UAS-rbf1/+,* Wilcoxon test : n=343, α=1.6 10^{-3}, Ws = 3.2). Thus, *buffy* needs *debcl* to counteract Rbf1-induced loss of tissue. Consistently, the numbers of apoptotic cells were not significantly different between these two genetic backgrounds (Fig. 1C). Therefore, *debcl* is required downstream of *buffy* in Rbf1-induced apoptosis.

Rbf1 overexpression triggers mitochondrial reactive oxygen species production in a *debcl* dependent manner

We previously showed that the JNK pathway activation was required to trigger apoptosis in response to *rbf1* overexpression (Milet et al., 2014). To determine the importance of Debcl in JNK pathway activation, we performed an immunostaining against Mmp1, a protein encoded by a target gene of JNK signaling pathway. We used *engrailed-Gal4* (*en-gal4*) driver which allows *rbf1* overexpression in the posterior compartment of wing imaginal discs. A punctuated staining was observed in the posterior compartment for *en-Gal4; UAS-rbf1* wing imaginal discs (Fig. 2B), contrarily to *en-Gal4/+* control wing imaginal discs (Fig. 2A). This data confirm that Rbf1 induces JNK pathway activation. However, when *rbf1* was overexpressed in *debcl*^{E26} heterozygous background (Fig. 2C), Mmp1 protein level was decreased in the posterior compartment compared to overexpression of *rbf1* alone. A quantification of *mmp1* mRNA levels by RT-qPCR in these different genetic backgrounds confirmed these data (Fig. S1A). Thus *debcl* is required for Rbf1-induced JNK pathway activation in wing imaginal discs.

JNK pathway can be activated by a wide variety of stimuli, such as receptor/ligand interactions or cellular stress like ROS. In particular ROS have been reported to activate JNK pathway (Son et al., 2013). Interestingly, Debcl is localized in mitochondria which are known to be the major site of ROS production in cells. Therefore we asked whether *rbf1* overexpression induces mitochondrial ROS production which could be responsible of JNK pathway activation. We measured mitochondrial superoxide production with MitoSOX

fluorescence by flow cytometry. *rbf1* overexpression increased the percentage of MitoSOX positive cells as compared to the *vg-gal4/+* control (Fig. 1E). Sod2 (Superoxide dismutase 2) is a mitochondrial antioxidant enzyme which detoxifies superoxide. Consistently, when *rbf1* and *sod2* were co-overexpressed, the percentage of MitoSOX positive cells decreased, compared to overexpression of *rbf1* alone. We also observed a significant decrease of MitoSOX positive cells when *rbf1* was overexpressed in $debcl^{E26}$ heterozygous background indicating that *debcl* is required for Rbf1-induced ROS production. Then, in these different genetic backgrounds, we assessed *gstD1* expression, which is a marker of mitochondrial oxidative stress. An increase of *gstD1* mRNA level was observed when *rbf1* was overexpressed compared to the control *vg-Gal4/+* (Fig. S1B). When *rbf1* was overexpressed in a $debcl^{E26}$ heterozygous background, the expression level of *gstD1* mRNA was similar to *vg-Gal4/+* control (Fig. S1B). All these data confirm that Rbf1 triggers ROS production in a Debcl dependent manner.

In order to precise the implication of ROS in Rbf1-induced apoptosis, we used $sod2^{\Delta 02}$ loss of function mutant and *sod2* overexpression to perform some genetic interaction tests. When *rbf1* was overexpressed in a $sod2^{\Delta 02}$ heterozygous background, distribution of the wing phenotypes shifted toward stronger phenotypes as compared to overexpression of *rbf1* alone (Fig. 2F). Conversely, when *rbf1* and *sod2* were co-overexpressed, distribution of the wing phenotypes shifted toward weaker phenotypes. The variation of the phenotypic distribution between these different genetic backgrounds correlated well with the variation of apoptotic cells in wing imaginal discs (Fig. 2G). Thus, Sod2 limits Rbf1-induced apoptosis, which suggests that ROS mediate this cell death.

Then, we wondered if ROS are involved in JNK pathway activation which could explain their role in Rbf1-induced cell death. When *rbf1* and *sod2* were co-overexpressed, Mmp1 protein (Fig. 2D) and mRNA levels (Fig. S1) were decreased compared to overexpression of *rbf1* alone. Hence, Sod2 inhibits Rbf1-induced JNK pathway activation which suggests that ROS are required to activate this signaling pathway.

Altogether, these data show that *rbf1* overexpression induces a *debcl*-dependent mitochondrial ROS production leading to JNK pathway activation and thus to cell death.

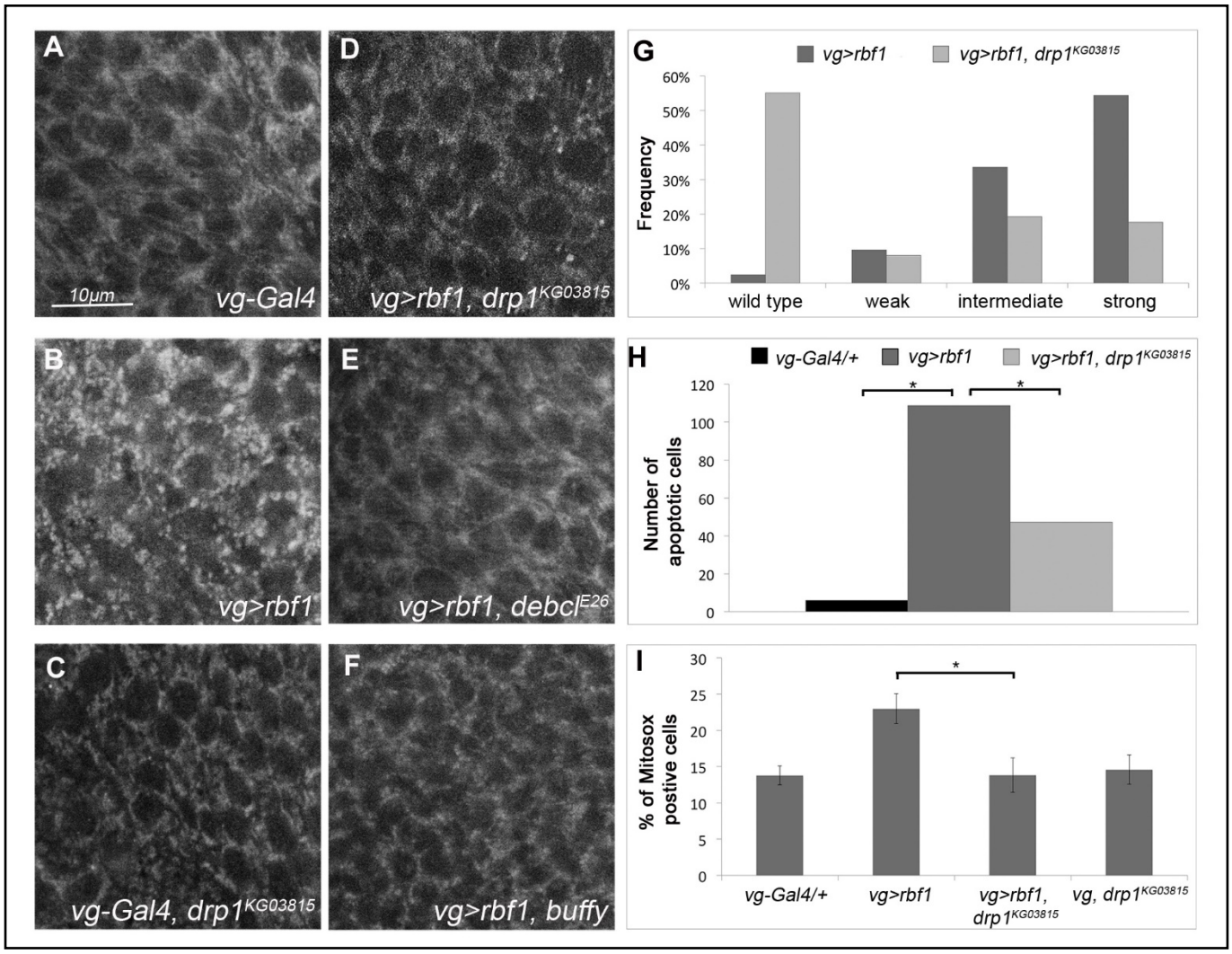


Figure 3: Rbf1-induced apoptosis requires Drp1 mediated mitochondrial fission.

(A-F) Mitochondrial morphology was observed by Alexa 488-coupled streptavidin in wing imaginal discs from *vg-Gal4* (a)*; vg-Gal4>UAS-rbf1* (b); *vg-Gal4,drp1*^{KG03815} (c); *vg-Gal4>UAS-rbf1,drp1*^{KG03815} (d); *vg-Gal4>UAS-rbf1,debcl*^{E26} (e) and *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-buffy* (f) larvae. Scale bar: 10 µm.

(G) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,drp1*^{KG03815}. n=312, $\alpha<10^{-30}$ and Ws = -9.52. Each experiment was independently performed three times; a representative experiment is shown.

(H) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining of wing imaginal discs from *vg-Gal4*; *vg-Gal4>UAS-rbf1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,drp1*^{KG03815} flies.

(I) Quantification by flow cytometry of MitoSOx staining (a mitochondrial superoxyde indicator) in wing imaginal discs from *vg-Gal4*; *vg-Gal4>UAS-rbf1*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,drp1*^{KG03815} and *vg-Gal4,drp1*^{KG03815} larvae.

Error bars are the S.E.M.. Asterisks indicate a significant difference between two genotypes (Student's test $\alpha<0.05$).

Rbf1 induces mitochondrial fragmentation which is required for ROS production and cell death

Mitochondrial fission, which can occur during apoptosis (Desagher and Martinou, 2000; Goyal et al., 2007) in mammalians cells and Drosophila, can regulate ROS generation(Park et al., 2013; Qi et al., 2013). Interestingly, apoptosis can be blocked with a dominant negative mutation or specific RNAi of the pro-fission gene *drp1* (Abdelwahid et al., 2007; Arnoult et al., 2005; Breckenridge et al., 2003; Frank et al., 2001). Several studies highlighted the role of Bcl-2 family proteins in the control of mitochondrial dynamic during apoptosis in mammalian cells (Brooks et al., 2007; Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2004; Karbowski et al., 2002; Rolland and Conradt, 2010; Sheridan et al., 2008; Wasiak et al., 2007). Therefore, we assessed the impact of *rbf1* overexpression on the mitochondrial dynamic. To visualize the mitochondrial network, we used Streptavidin Alexa Fluor® 488 conjugate. As expected in *vg-Gal4/+* control discs, cells had a typical filamentous mitochondrial network (Fig. 3A), while in response to *rbf1* overexpression, we observed punctuate units (Fig. 3B) which are hallmarks of mitochondrial fragmentation. Of note, when *rbf1* was overexpressed in a $drp1^{KG03815}$ heterozygous loss of function background (Fig. 3D), the mitochondrial network appeared more filamentous than the one observed when *rbf1* was overexpressed alone. These data suggest that Rbf1-induced mitochondrial fragmentation is due to an increase in mitochondrial fission that involved Drp1. Interestingly, we also observed a rescue of this fragmentation when *rbf1* was overexpressed in $debcl^{E26}$ heterozygous background (Fig. 3E) or when *rbf1* and *buffy* were co-overexpressed (Fig. 3F). Thus Debcl is required for Rbf1-induced mitochondrial fission whereas Buffy prevents mitochondrial fragmentation.

We used $drp1^{KG03815}$ loss of function mutant to determine the implication of mitochondrial fission in Rbf1-induced apoptosis. When *rbf1* was overexpressed in a $drp1^{KG03815}$ heterozygous background, we observed a decrease of notches in wings as well as a decrease of the number of apoptotic cells in wing imaginal discs (Fig. 3G,H) compared to *rbf1* overexpression alone. Thus, Drp1 is required for Rbf1-induced apoptosis and that suggests that mitochondrial fission plays a key role in Rbf1-induced cell death. In addition, we observed a significant decrease of Mitosox positive cells when *rbf1* was overexpressed in $drp1^{KG03815}$ heterozygous background (Fig. 3I) compared to overexpression of *rbf1* alone,

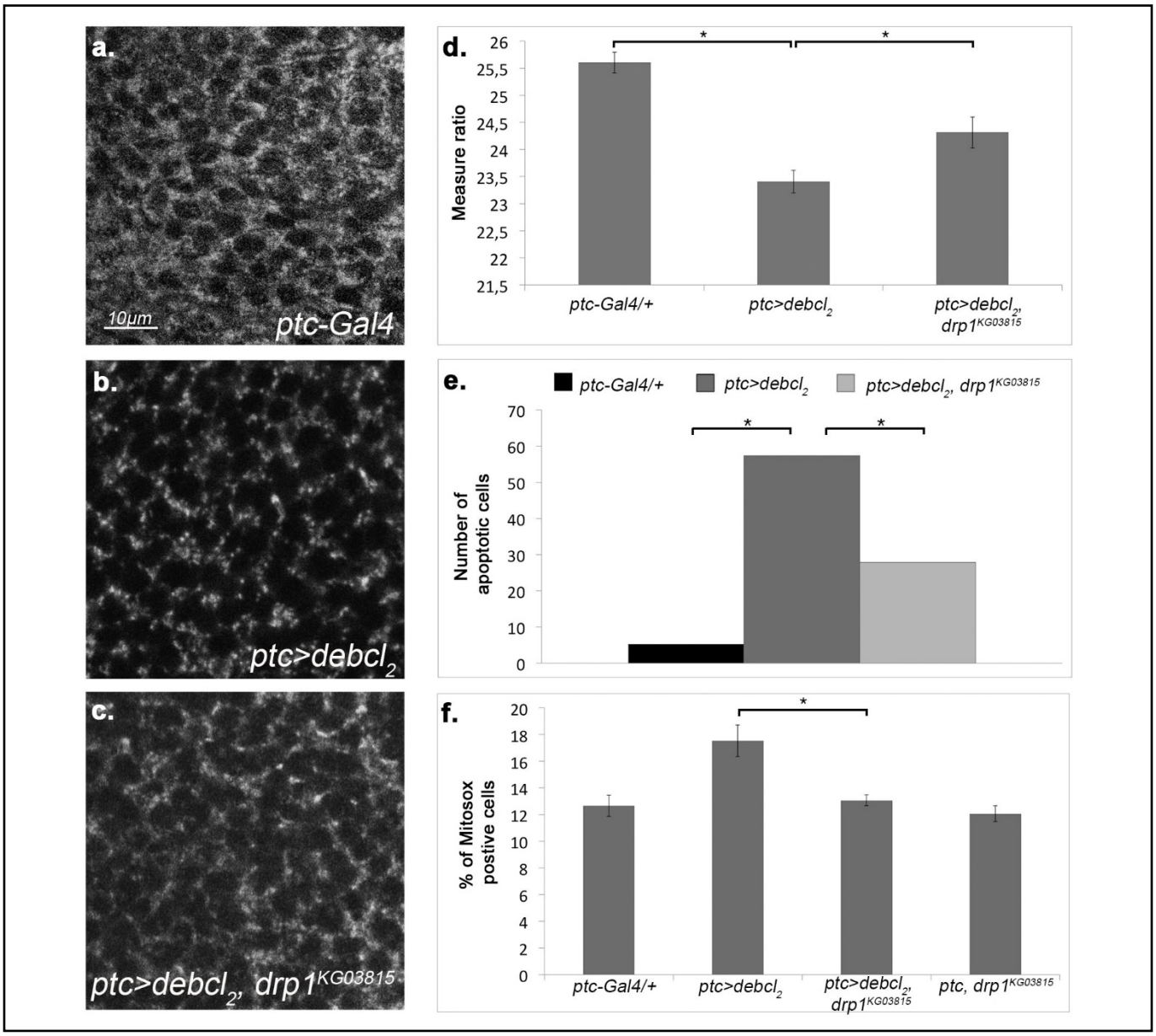


Figure 4: Debcl-induced apoptosis requires Drp1 mediated mitochondrial fission.

(A,B,C) Mitochondrial morphology observed by Alexa 488-coupled streptavidin in wing imaginal discs from *ptc-Gal4* (a)*; ptc-Gal4>UAS-debcl,UAS-debcl* (b) and *vg-Gal4>UAS-debcl,UAS-debcl,drp1^{KG03815}* (c) larvae. Scale bar: 10 µm.

(D) Measure of relative distance between L3 and L4 veins of the previously described genotypes.

(E) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining of wing imaginal discs from the genotypes described previously.

(F) Quantification by flow cytometry of MitoSOx staining (a mitochondrial superoxyde indicator) in wing imaginal discs from *ptc-Gal4*; *ptc-Gal4>UAS-rbf1*; *ptc-Gal4>UAS-rbf1,drp1^{KG03815}* and *ptc-Gal4,drp1^{KG03815}* larvae.

Error bars are the S.E.M.. Asterisks indicate a significant difference between two genotypes (Student's test $\alpha<0.05$).

indicating that Drp1 is required for Rbf1-induced ROS production. Furthermore, we verify that *drp1* loss of function decreased Rbf1-induced JNK pathway activation (Fig. S2).

Taken together these results show that *rbf1* overexpression induces a *debcl*- and *drp1*-dependent mitochondrial fragmentation which promotes ROS production, JNK pathway activation and eventually cell death.

Debcl induces mitochondrial fragmentation which is required for ROS production and cell death

Our data indicate that Debcl plays a key role in Rbf1-induced apoptosis. We assessed if the cascade of events (mitochondrial fragmentation, ROS production and JNK pathway activation) characterized in Rbf1-induced apoptosis occurs in a similar fashion in Debcl-induced apoptosis. Indeed, Debcl has been previously described as a pro-apoptotic protein. For instance, overexpression of *debcl* using the UAS-Gal4 system with the *patched* (ptc) Gal4 driver induced apoptosis along the antero-posterior frontier (Colin et al., 2014). To determine whether Debcl-induced apoptosis is associated with altered mitochondrial network, we used Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate.

In *ptc-Gal4/+* control discs, mitochondrial network was filamentous while punctuated staining appeared in response to *debcl* overexpression (Fig. 4A,B). Thus, Debcl, as Rbf1, induces a mitochondrial fragmentation in wing discs. When *debcl* was overexpressed in a loss of function $drp1^{KG03815}$ heterozygous background (Fig. 4C), the mitochondrial network appeared more filamentous than the one observed when *debcl* is overexpressed alone. These data suggest that Debcl-induced mitochondrial fragmentation results from an increase of mitochondrial fission.

We performed genetic interaction tests between *debcl* and $drp1^{KG03815}$ loss of function to determine the implication of mitochondrial fission in Debcl-induced apoptosis. In adult wing, this apoptosis led to a decrease of the distance between veins L3 and L4 (Fig. 4D and (Colin et al., 2014)). When *debcl* was overexpressed in a $drp1^{KG03815}$ heterozygous background, we observed a rescue of the wing loss of tissue (Fig. 4D) as well as a decrease in the amount of apoptosis in wing imaginal discs (Fig. 4E) as compared to overexpression of *debcl* alone.

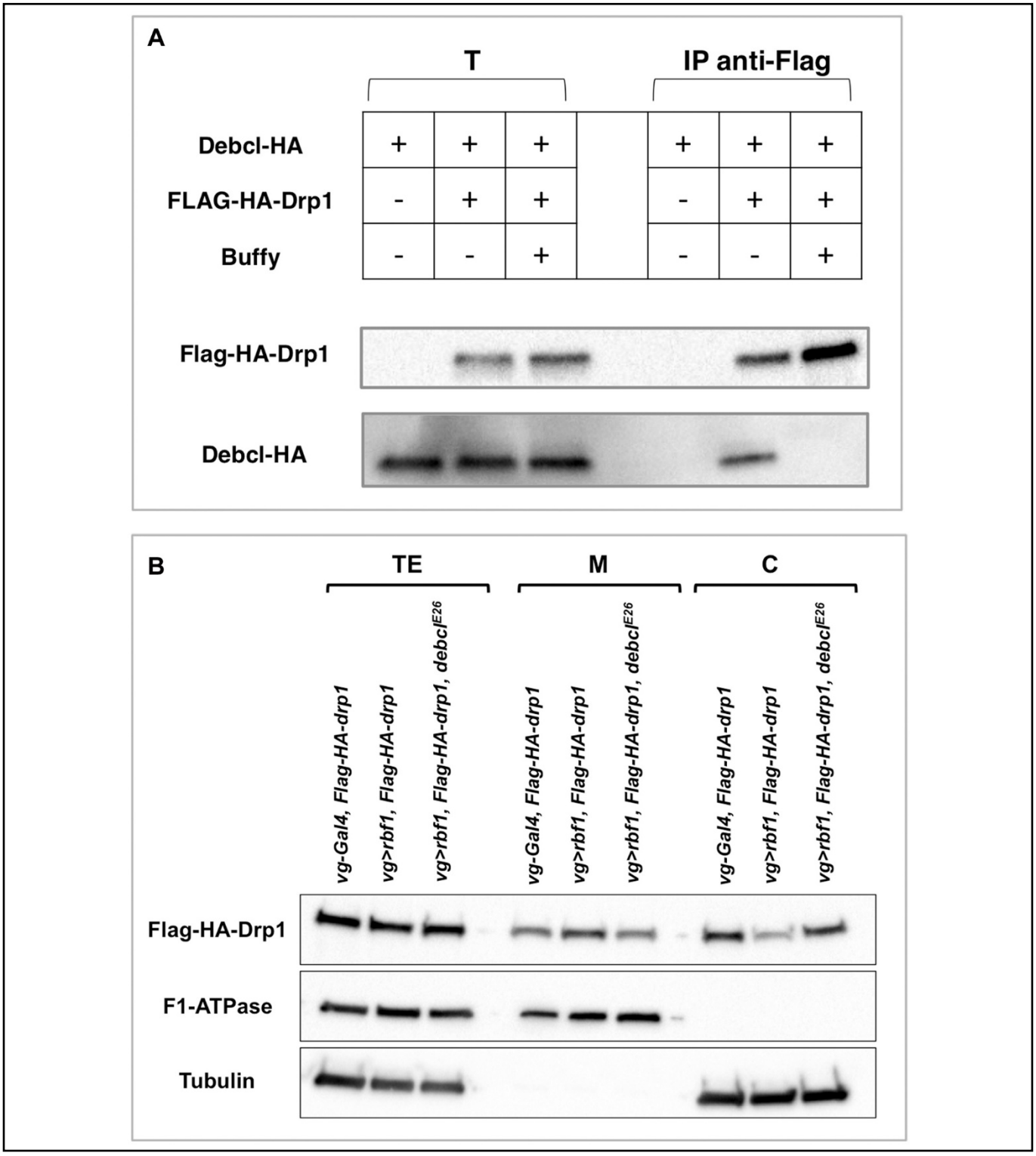


Figure 5: Debcl physically interacts with Drp1.

(A) Immunoprecipitation assays were performed with an anti-Flag antibody on cell extracts from *ptc-Gal4>UAS-debcl-HA*; *ptc-Gal4>UAS-debcl-HA,FLAG-HA-drp1* and *ptc-Gal4>UAS-debcl-HA,UAS-buffy,FLAG-HA-drp1* larvae. Western-blotting on total extract (T) and immunoprecipitates (IP) were analyzed with anti-Flag (Drp1) or anti-HA (Debcl) antibodies.

(B) Cell fractionations were performed on cell extracts from *vg-Gal4, FLAG-HA-drp1*; *vg-Gal4>UAS-rbf1, FLAG-HA-drp1* and *vg-Gal4>UAS-rbf1, FLAG-HA-drp1, debcl^{E26}* larvae. Total extract (T), mitochondrial fraction (M) and cytosolic fraction (C) were subjected to immunoblot analysis with anti-HA (Drp1), anti-F1-ATPase (β subunit) and anti-Tubulin antibodies.

Thus, Drp1 is required for Debcl-induced apoptosis which suggests that mitochondrial fission plays a key role in Debcl-induced cell death.

Then, we investigated whether *debcl* overexpression was sufficient to induce mitochondrial ROS production. Indeed, *debcl* overexpression increases the proportion of Mitosox positive cells in the wing imaginal discs compared to the *ptc-gal4/+* control (Fig. 4F). In addition, we observed a significant decrease of Mitosox positive cells when *debcl* was overexpressed in $drp1^{KG03815}$ heterozygous background when compared to overexpression of *debcl* alone, indicating that Drp1 is required for Debcl-induced ROS production.

These results highlight that *debcl* overexpression induces a *drp1*-dependent mitochondrial fragmentation leading to ROS production and thus to cell death. Therefore *debcl* overexpression was sufficient to recapitulate the mitochondrial events induced by Rbf1.

Debcl physically interacts with Drp1 *in vivo*

Drp1 plays a key role both in Rbf1- and Debcl-induced apoptosis. In mammals, in the absence of apoptotic stimuli Drp1 is mostly cytosolic whereas it is stabilized to mitochondria in apoptotic cells (Wasiak et al., 2007). Because Debcl is a mitochondrial protein, we wondered whether Drp1 and Debcl physically interact during apoptosis. We used transgenic larvae expressing Debcl-HA and/or FLAG-HA-Drp1 to perform immunoprecipitations with anti-FLAG antibody. When FLAG-HA-Drp1 was immunoprecipitated, we observed a co-immunoprecipitation of Debcl-HA (Fig. 5A) suggesting that Drp1 and Debcl physically interact *in vivo*. Interestingly, when *buffy* was overexpressed, the co-immunoprecipitation of Debcl-HA was lost (Fig. 5A), suggesting that Buffy inhibits the physical interaction between Debcl and Drp1. Because we do not have antibody against Debcl we were not able to test if this interaction occurs during Rbf1-induced apoptosis without *debcl-HA* overexpression. Even thought, when *rbf1* was overexpressed, we observed an increase of FLAG-HA-Drp1 proteins in mitochondrial enriched fraction compared to *vg-Gal4, FLAG-HA-drp1* control (Fig. 5B). Consistently, FLAG-HA-Drp1 proteins decreased in the cytosolic fraction. Interestingly, $debcl^{E26}$ heterozygous loss of function impeded both Drp1 mitochondrial accumulation and Drp1 cytosolic depletion (Fig. 5B). This result indicates that Debcl is required for Drp1

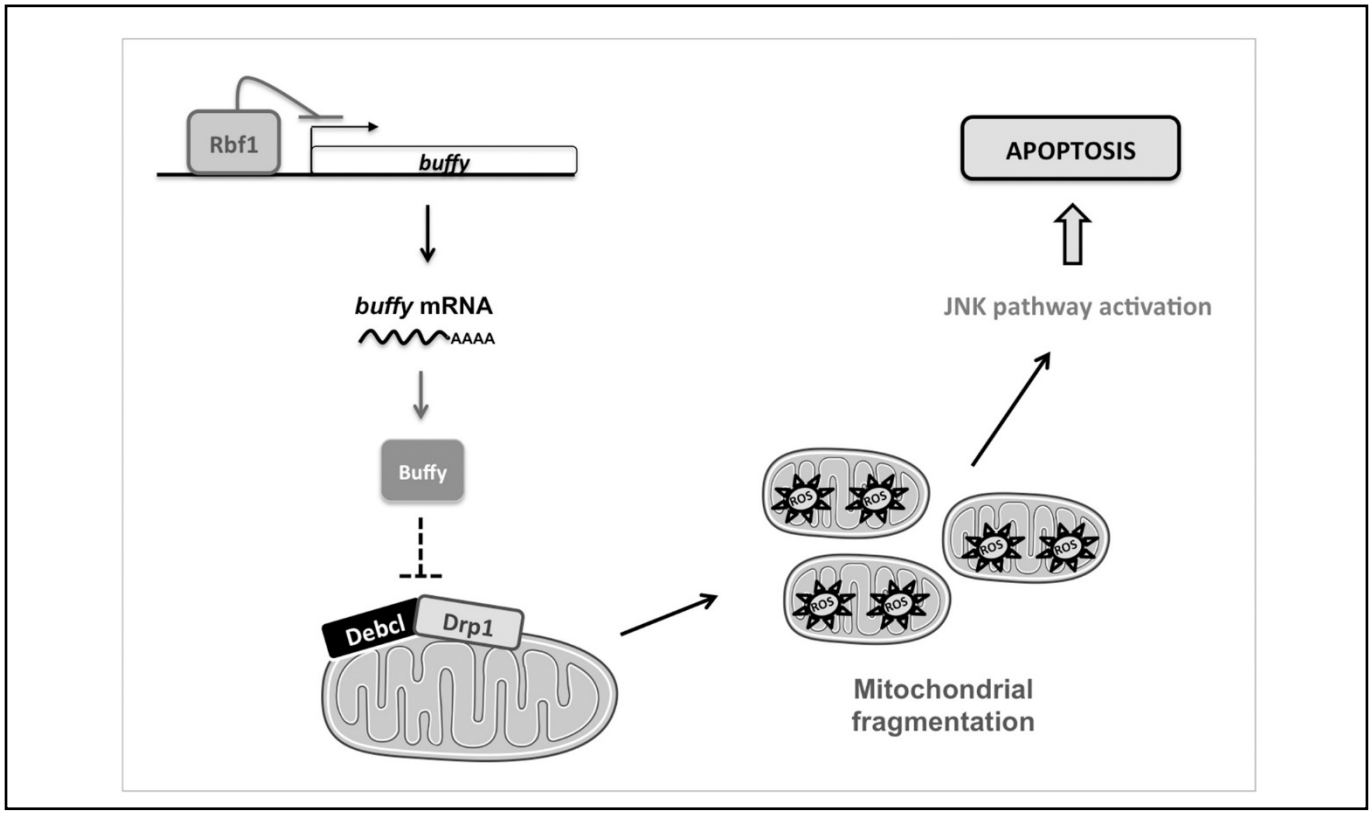


Figure 6: Rbf1 triggers apoptosis through mitochondrial events in a Debcl-dependent fashion.
Rbf1 inhibits *buffy* expression. The decrease of Buffy level results in Debcl activation. Thus, Debcl interacts with Drp1 at mitochondria which lead to mitochondrial fragmentation. Drp1 and Debcl trigger a ROS production that activates apoptosis through JNK pathway.

mitochondrial enrichment and argues for an interaction between Debcl and Drp1 during Rbf1-induced apoptosis.

Taken together these results indicate that Debcl and Drp1 are part of a same protein complex. This complex formation emphasizes Drp1 mitochondrial localization which may trigger the mitochondrial fragmentation observed following *debcl* or *rbf1* overexpression.

Discussion:

In this paper, we characterized the death pathway induced by Rbf1 in Drosophila (Fig. 6) and highlighted the role of Bcl-2 family genes during this process. Although Debcl has a pro-apoptotic activity in different tissues (Brachmann et al., 2000; Colussi et al., 2000; Igaki et al., 2000; Senoo-Matsuda et al., 2005), its mechanism of action was practically unknown. Our results show that *debcl* is required for Rbf1-induced mitochondrial fragmentation, ROS production and JNK pathway activation which lead to Rbf1-induced apoptosis. Moreover, *debcl* overexpression by itself can recapitulate these different events initiated at the mitochondria level. Thus, our work allows shed light on the molecular mechanisms involved in Debcl pro-apoptotic activity. Besides, our results corroborate previous data (Quinn et al., 2003; Sevrioukov et al., 2007) indicating that Debcl and Buffy act in opposing ways. Indeed, we show that *buffy* loss of function leads to an increase in Rbf1-induced apoptosis only in *debcl* loss of function background.

During Rbf1-induced apoptosis, the mitochondrial network is fragmented. Rbf1-induced mitochondrial fragmentation and cell death depend on *drp1*. Thus our data suggest that Rbf1 triggers mitochondrial fission itself required for cell death. However, we still do not know whether Drp1 pro-apoptotic activity relies on its capacity to induce mitochondrial fission. Of note, other data support this idea. Indeed, it has been demonstrated that blocking mitochondrial fusion in wing imaginal discs with RNAi against *marf* cause apoptosis (Thomenius et al., 2011). Moreover, Thomenius *et al.,* demonstrated that Reaper induces mitochondrial fragmentation by binding to Marf and inhibiting it, which in turn leads to caspase activation and cell death (Thomenius et al., 2011). Thus a growing number of studies point out the importance of mitochondrial dynamics in apoptosis regulation. Because Drp1 is

involved in Rbf1-induced mitochondrial ROS production, it is conceivable that Rbf1-induced mitochondrial fragmentation affects mitochondrial respiratory chain function and increases the electron leakage which could explain the increase in mitochondrial ROS. In this case, the role of Drp1 in cell death would be closely related to its function in mitochondrial fission.

In mammals, a number of studies support the link between pro-apoptotic Bcl-2 proteins and mitochondrial fusion/fission machinery (Rolland and Conradt, 2010). During apoptosis, mitochondrial fragmentation occurs simultaneously with Bax relocalization to mitochondria. Bax colocalizes with Drp1 and Mitofusin2 at fission sites (Karbowski et al., 2002). Bax plays a critical role in mitochondrial fragmentation during apoptosis (Brooks et al., 2007; Frank et al., 2001). On the contrary, Mitofusin2 goes against Bax-induced apoptosis (Neuspiel et al., 2005). Thus pro-apoptotic Bcl-2 proteins cause mitochondrial fragmentation by activating fission and/or blocking fusion. Here, we show for the first time in Drosophila, that Debcl and Buffy control mitochondrial dynamic in dying cells. Indeed, we show that Debcl is required for mitochondrial fragmentation observed during *rbf1*-induced apoptosis. Galindo *et al.*, showed that mitochondrial morphology is not affected by *debcl* loss of function. Taken together these results indicate that Debcl ensures a role in mitochondrial dynamic, only in specific context such as in apoptotic conditions. Interestingly, Debcl also modulates mitochondrial density and activity, independently of apoptosis, in neuronal processes (Tsubouchi et al., 2009). Debcl role in mitochondrial dynamic during apoptosis involves a physical interaction between Debcl and Drp1. This interaction may be responsible for Drp1 activation and therefore for mitochondrial fission. In mammals, there is no evidence for a physical interaction between Drp1 and a pro-apoptotic member of Bcl-2 family. However, Bax participates in Drp1 activation by other means. During apoptosis, Bax stimulates Drp1 sumoylation and thus promotes Drp1 stable association to mitochondrial membranes. Moreover, outer mitochondrial membrane permeabilization mediated by Bax allows the release of DDP/TIMM8a. This protein physically interacts with Drp1 (Arnoult et al., 2005) which stabilizes Drp1 at mitochondria where it can induce mitochondrial fragmentation.

Our study also provides a better definition of Rbf1 pro-apoptotic activity. Indeed, our results indicate that Rbf1, through a transcriptional regulation of *buffy*, can activate Debcl which plays a crucial role in cell death commitment. In mammals, Bcl-2 family regulations by pRb

are most of the time transcriptional regulations by pRb/E2F (Bertin-Ciftci et al., 2013; Bracken et al., 2004; Hao et al., 2007; Hershko and Ginsberg, 2004; Morales et al., 2011; Zhao et al., 2005). But a recent study demonstrated that pRb induces apoptosis directly at the mitochondria where pRb binds and conformationally activates Bax(Hilgendorf et al., 2013). Thus, Bcl-2 family role in the control of apoptosis by Rb seems to be conserved between species although operating in different ways.

Our data indicate that *rbf1* overexpression induces a mitochondrial death pathway involving mitochondrial fragmentation and ROS production in a *debcl*-dependent manner. Interestingly a role of Rbf1/dE2F pathway in the regulation of mitochondrial function has been reported (Ambrus et al., 2013). Indeed Rbf1/dE2F controls the expression of genes encoding mitochondrial proteins. This regulation is critical for normal induction of apoptosis in response to irradiation. In mammals, pRB at mitochondria activates Bax and mitochondrial apoptosis in response to diverse stimuli (Hilgendorf et al., 2013), which is in agreement with its tumor-suppressive function. Thus mitochondria seem to play an important role in the death process induced by Rbf1 or its counterpart pRb. Our data highlight an important role of Drp1 in Rbf1-induced apoptosis. In mammals, some data indicate that Bax and Drp1 colocalize at mitochondria during apoptosis (Karbowski et al., 2002) and that Bax and pRb interact *in vivo (Hilgendorf et al., 2013)*. Thus, it would be interesting to test the role of Drp1 in pRb-induced apoptosis.

There is increasing evidence that key oncogenes and tumor suppressors modulate mitochondrial dynamics (Boland et al., 2013) which may be significant for tumorigenesis. Therefore, it is possible that regulating mitochondrial dynamics may be a useful therapeutic modality to induce cell death especially in *Rb*-deficient tumors. According to this idea, BIRO-1, a cell permeable BH3 peptides, promotes mitochondrial fragmentation in retinoblastoma cells which leads to cell death (Allaman-Pillet et al., 2014). Understanding how tumor suppressors modulate mitochondrial dynamics could be a major area of research in order to improve cancer treatment.

Materials and Methods

Fly stocks:

Flies were raised at 25 °C on a standard medium. *The UAS-rbf1* and *vg-Gal4* strains were generous gifts from J Silber. The *en-Gal4* and *ptc-gal4* strains were kindly provided by L. Théodore. The *UAS-debcl* flies were generously provided by H. Richardson(Colussi et al., 2000). The following strains were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington, IN, USA): $buffy^{H37}$ (27340), *UAS-buffy* (32059), $debcl^{E26}$ (27342), $debcl^{E26}$ $buffy^{H37}$ (27338), *UAS-Sod2* (24494), $Sod2^{\Delta 02}$ (27643), $drp1^{KG03815}$ (13510) and *FLAG-FlAsH-HA-drp1* (42208). $buffy^{H37}$, $debcl^{E26}$, $Sod2^{\Delta 02}$ and $drp1^{KG03815}$ are null mutations (Sevrioukov et al., 2007; Verstreken et al., 2005). The UAS-RNAi-hep strain (4353R2) was from the National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Japan). We used a w^{1118} fly stock as the reference strain.

Test of phenotype suppression in the wing:

To test the implication of candidate genes in *rbf1*-induced apoptosis, the severity of the notched wing phenotype induced by *UAS-rbf1* overexpression led by *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. For each gene, we verified that the alteration of this gene expression level (overexpression or mutant) did not induce any wing phenotype. *vg-Gal4>UAS-rbf1* Drosophila females were crossed with males bearing a loss-of function mutation for the different genes or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing margin. Wilcoxon tests were performed as described previously (Brun et al., 2002). We considered the difference significant when $\alpha<10^{-3}$. To test the implication of *drp1* in *debcl*-induced apoptosis, the severity of wing loss of tissue induced by *UAS-debcl* overexpression led by *ptc-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. *ptc-Gal4>(UAS-debcl)$_2$,D*rosophila females were crossed with wild-type males or males bearing a loss-of function mutation for *drp1*. For the progenies of all crosses, the distance between veins L3 and L4 was measured perpendicularity to the sixth sensilla of the dorsal row of the anterior wing margin and plotted against the distance between the extremity of veins 4 and 5. Student's t-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha<5\%$.

TUNEL staining of imaginal discs:

Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/formaldehyde 3.7%, washed three times for 10min in PBT (1X PBS, 0.5% Triton). Discs were then dissected and TUNEL staining was performed according to manufacturer's instructions (ApopTag Red in situ apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley, Marne-La-Vallée, France) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). White patches in the wing pouch (for *rbf1* experiments) or in *ptc* area (for *debcl* experiments) were counted for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's t-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha<5\%$.

Immunostaining:

Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS-3.7% formaldehyde. Discs were labeled by incubation overnight at 4°C with anti-Mmp1 (mouse monoclonal antibody, 1/25, 5H7B11, DSHB, Iowa, USA) in PBT-FCS (PBS, 0,3% Triton, 10% Fetal Calf Serum). Incubation with anti-mouse secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or with Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate (1/50, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was carried in PBT-FCS for 2 h at room temperature. After washing in PBT, wing discs were finally mounted in CitifluorTM (Biovalley) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope.

ROS measurement:

As described in(Bergeaud et al., 2013), MitoSOX (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was used to measure the mitochondrial production of superoxide. Briefly, twenty wing imaginal discs were dissected in Schneider's Drosophila medium (Fisher Bioblock scientific, Illkirch Graffenstaden, France), then cells were trypsinized. 5 µM MitoSOX were added to the cells placed at 37°C. Red fluorescence was then measured by flow cytometry by analyzing 2000 events per experimental condition. Flow cytometric measurements were performed using a BD LSRFortessa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Fluorescence

was induced by the Yellow-Green Laser (561 nm). Red fluorescence was collected with a PE dectector (emission: 578 nm).

Immunoprecipitation:

Five third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, crushed in lysis buffer (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1% (NP40), protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA free, Roche, Boulogne-Billancourt, France)). Cuticles were removed after centrifugation for 10 min at 1500 rpm at 4°C. An additional centrifugation was realized for 15 min at 6000 g at 4°C in order to eliminate membrane fragments. The supernatant (total extracts) was recovered and 75µl were incubated with 15 µl of anti-FLAG antibody attached to agarose beads (Anti-FLAG® M1 Agarose Affinity Gel, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier France) overnight at 4°C on a rotating wheel. Immune complexes were then washed five times with lysis buffer and resuspended in loading buffer. Samples were boiled for 5 min and proteins were subjected to western blotting as described below.

Cell fractionation:

Ten third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, crushed in 400µl of fractionation buffer (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 10 mM, Sucrose 0,32 M), protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA free, Roche). Cuticles were removed after centrifugation for 5 min at 750 rpm at 4°C. 15 µl (total extracts) were kept. An additional centrifugation was realized for 10 min at 5000 rpm at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was recovered. The pellet (mitochondrial fraction) was washed once with fractionation buffer and then was resuspended in 350 µl of fractionation buffer. Samples were boiled for 5 min and proteins were subjected to western blotting as described below.

SDS-PAGE electrophoresis and western blot:

Proteins were separated in 4-20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels according to the manufacturer's instructions (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) and transferred onto PVDF membrane (Millipore, Darmstadt, Germany). Blots were incubated with primary antibodies (anti-HA antibody (1/1000, ab9110, abcam, Cambridge, England), anti-Flag.M2 antibody (1/500, Agilent, Santa Clara, CA, USA), anti-Tubulin (1/500, clone B-5-1-2, Sigma) and anti-F1-ATPase (β-subunit MS503, MitoScience/abcam, Cambridge, United-Kingdom))

overnight at 4°C and were then incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Immunoreactive bands were detected by Immobilon Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), visualized and quantified using ChemiDoc XRS+ system (BIO-RAD).

Acknowledgments :

We are grateful to Sebastien Szuplewski, and Frédéric Canal for their critical readings of the manuscript. Confocal microscopy was performed on CYMAGES imaging facility (University of Versailles/ Saint-Quentin-en-Yvelines). We also acknowledge Vincent Rincheval and Elisabeth Delmas for their help concerning flow cytometry. qPCR experiments were done in the UMR 1198 "Biologie du Développement et Reproduction" (INRA, Jouy-en-Josas). Amandine Clavier was the recipient of a doctoral contract from the UVSQ and of an ATER contract from the EPHE.

Contributions

I.G. and A.C. designed the study. A.C., V.R. and A.A-R. performed experiments. All authors analyzed data and wrote the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References:

Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R. J., Balasundaram, S., Fowle, W. H. and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis. *Dev Cell* **12**, 793-806.

Allaman-Pillet, N., Oberson, A. and Schorderet, D. F. (2014). BIRO-1, a Cell Permeable BH3 Peptide, Promotes Mitochondrial Fragmentation and Death of Retinoblastoma Cells. *Molecular cancer research : MCR*.

Ambrus, A. M., Islam, A. B., Holmes, K. B., Moon, N. S., Lopez-Bigas, N., Benevolenskaya, E. V. and Frolov, M. V. (2013). Loss of dE2F compromises mitochondrial function. *Dev Cell* **27**, 438-51.

Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R. G., Seeburg, D. P., Estaquier, J., Sheng, M. and Blackstone, C. (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* **15**, 2112-8.

Bergeaud, M., Mathieu, L., Guillaume, A., Moll, U. M., Mignotte, B., Le Floch, N., Vayssiere, J. L. and Rincheval, V. (2013). Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Cell Cycle* **12**, 2781-2793.

Bertin-Ciftci, J., Barre, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P. and Braun, F. (2013). pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell death and differentiation* **20**, 755-64.

Biasoli, D., Kahn, S. A., Cornelio, T. A., Furtado, M., Campanati, L., Chneiweiss, H., Moura-Neto, V. and Borges, H. L. (2013). Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell Death Dis* **4**, e767.

Boland, M. L., Chourasia, A. H. and Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* **3**, 292.

Bowen, C., Spiegel, S. and Gelmann, E. P. (1998). Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res* **58**, 3275-81.

Brachmann, C. B., Jassim, O. W., Wachsmuth, B. D. and Cagan, R. L. (2000). The *Drosophila bcl-2* family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. *Curr. Biol.* **10**, 547-550.

Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A. and Helin, K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* **29**, 409-17.

Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and Shore, G. C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* **160**, 1115-27.

Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z. J. and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11649-54.

Brun, S., Rincheval, V., Gaumer, S., Mignotte, B. and Guenal, I. (2002). reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila. *Oncogene* **21**, 6458-70.

Challa, M., Malladi, S., Pellock, B. J., Dresnek, D., Varadarajan, S., Yin, Y. W., White, K. and Bratton, S. B. (2007). Drosophila Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. *Embo J* **26**, 3144-56.

Claveria, C., Caminero, E., Martinez, A. C., Campuzano, S. and Torres, M. (2002). GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. *EMBO J.* **21**, 3327-3336.

Clavier, A., Baillet, A., Rincheval-Arnold, A., Coleno-Costes, A., Lasbleiz, C., Mignotte, B. and Guenal, I. (2014). The pro-apoptotic activity of Drosophila Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA. *Cell Death Dis* **5**, e1405.

Colin, J., Garibal, J., Clavier, A., Rincheval-Arnold, A., Gaumer, S., Mignotte, B. and Guenal, I. (2014). The drosophila Bcl-2 family protein Debcl is targeted to the proteasome by the beta-TrCP homologue slimb. *Apoptosis* **19**, 1444-1456.

Colussi, P. A., Quinn, L. M., Huang, D. C., Coombe, M., Read, S. H., Richardson, H. and Kumar, S. (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *J. Cell Biol.* **148**, 703-714.

Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-77.

Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G. and Vento, R. (2013). RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol* **228**, 1676-87.

Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y. and Kumar, S. (2004). The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. *J Cell Biol* **167**, 405-10.

Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J. R., Hay, B. A. and Kumar, S. (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Biol.* **156**, 1089-1098.

Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J. L. and Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology* **942**, 157-83.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-25.

Freel, C. D., Richardson, D. A., Thomenius, M. J., Gan, E. C., Horn, S. R., Olson, M. R. and Kornbluth, S. (2008). Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. *J Biol Chem* **283**, 367-79.

Galindo, K. A., Lu, W. J., Park, J. H. and Abrams, J. M. (2009). The Bax/Bak ortholog in Drosophila, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. *Development* **136**, 275-83.

Garcia-Saez, A. J. (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ* **19**, 1733-40.

Goyal, G., Fell, B., Sarin, A., Youle, R. J. and Sriram, V. (2007). Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in Drosophila melanogaster. *Dev Cell* **12**, 807-16.

Green, D. R., Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* **345**, 1250256.

Hao, H., Dong, Y., Bowling, M. T., Gomez-Gutierrez, J. G., Zhou, H. S. and McMasters, K. M. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* **7**, 24.

Hardwick, J. M. and Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**.

Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 8627-34.

Hilgendorf, K. I., Leshchiner, E. S., Nedelcu, S., Maynard, M. A., Calo, E., Ianari, A., Walensky, L. D. and Lees, J. A. (2013). The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes & development* **27**, 1003-15.

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A. and Lees, J. A. (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* **15**, 184-94.

Igaki, T., Kanuka, H., Inohara, N., Sawamoto, K., Nunez, G., Okano, H. and Miura, M. (2000). Drob-1, a *Drosophila* member of the bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 662-667.

Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* **164**, 493-9.

Karbowski, M., Lee, Y. J., Gaume, B., Jeong, S. Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* **159**, 931-8.

Lin, R., Angelin, A., Da Settimo, F., Martini, C., Taliani, S., Zhu, S. and Wallace, D. C. (2014). Genetic analysis of dTSPO, an outer mitochondrial membrane protein, reveals its functions in apoptosis, longevity, and Ab42-induced neurodegeneration. *Aging Cell* **13**, 507-18.

Means, J. C., Muro, I. and Clem, R. J. (2006). Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a Drosophila cell-free system. *Cell Death Differ* **13**, 1222-34.

Mendes, C. S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H. and Mollereau, B. (2006). Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the Drosophila retina. *EMBO Rep* **7**, 933-9.

Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Mignotte, B. and Guenal, I. (2010). The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* **9**, 97-103.

Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Morieras, A., Clavier, A., Garrigue, A., Mignotte, B. and Guenal, I. (2014). Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis. *PLoS One* **9**, e102902.

Morales, A., Alvarez, A., Arvelo, F., Suarez, A. I., Compagnone, R. S. and Galindo-Castro, I. (2011). The natural diterpene ent-16beta-17alpha-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2alpha/Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. *Apoptosis* **16**, 1245-52.

Morgenbesser, S. D., Williams, B. O., Jacks, T. and DePinho, R. A. (1994). p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* **371**, 72-4.

Morishita, J., Kang, M. J., Fidelin, K. and Ryoo, H. D. (2013). CDK7 regulates the mitochondrial localization of a tail-anchored proapoptotic protein, Hid. *Cell reports* **5**, 1481-8.

Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. and McBride, H. (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* **280**, 25060-70.

Olson, M. R., Holley, C. L., Gan, E. C., Colon-Ramos, D. A., Kaplan, B. and Kornbluth, S. (2003). A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. *J Biol Chem* **278**, 44758-68. .

Park, J., Choi, H., Min, J. S., Park, S. J., Kim, J. H., Park, H. J., Kim, B., Chae, J. I., Yim, M. and Lee, D. S. (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *J Neurochem* **127**, 221-32.

Qi, X., Qvit, N., Su, Y. C. and Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci* **126**, 789-802.

Quinn, L., Coombe, K. M., Tasman, D., Colussi, P., Kumar, S. and Richardson, H. (2003). Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *EMBO J.* **22**, 3568-3579.

Rolland, S. G. and Conradt, B. (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 852-8.

Sandu, C., Ryoo, H. D. and Steller, H. (2010). Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *The Journal of cell biology* **190**, 1039-52.

Senoo-Matsuda, N., Igaki, T. and Miura, M. (2005). Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in Drosophila. *Embo J* **24**, 2700-13.

Sevrioukov, E. A., Burr, J., Huang, E. W., Assi, H. H., Monserrate, J. P., Purves, D. C., Wu, J. N., Song, E. J. and Brachmann, C. B. (2007). Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. *Genesis* **45**, 184-93.

Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* **31**, 570-85.

Son, Y., Kim, S., Chung, H. T. and Pae, H. O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol* **528**, 27-48.

Tait, S. W. and Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**.

Thomenius, M., Freel, C. D., Horn, S., Krieser, R., Abdelwahid, E., Cannon, R., Balasundaram, S., White, K. and Kornbluth, S. (2011). Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate Drosophila programmed cell death. *Cell Death Differ* **18**, 1640-50.

Tsai, K. Y., Hu, Y., Macleod, K. F., Crowley, D., Yamasaki, L. and Jacks, T. (1998). Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol. Cell.* **2**, 293-304.

Tsubouchi, A., Tsuyama, T., Fujioka, M., Kohda, H., Okamoto-Furuta, K., Aigaki, T. and Uemura, T. (2009). Mitochondrial protein Preli-like is required for development of dendritic arbors and prevents their regression in the Drosophila sensory nervous system. *Development* **136**, 3757-66.

Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R. and Abrams, J. M. (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **144**, 701-710.

Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J., Koh, T. W., Zhou, Y. and Bellen, H. J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron* **47**, 365-78.

Wasiak, S., Zunino, R. and McBride, H. M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* **177**, 439-50.

Zhang, H., Huang, Q., Ke, N., Matsuyama, S., Hammock, B., Godzik, A. and Reed, J. C. (2000). *Drosophila* pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**, 27303-27306.

Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E. T. and Yu, Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16090-5.

Zimmermann, K. C., Ricci, J. E., Droin, N. M. and Green, D. R. (2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* **156**, 1077-1087.

Supplementary Figures

The Drosophila retinoblastoma protein, Rbf1, induces a *debcl* and *drp1*-dependent mitochondrial apoptosis.

Amandine Clavier, Vincent Ruby, Aurore Rincheval-Arnold, Bernard Mignotte, Isabelle Guénal

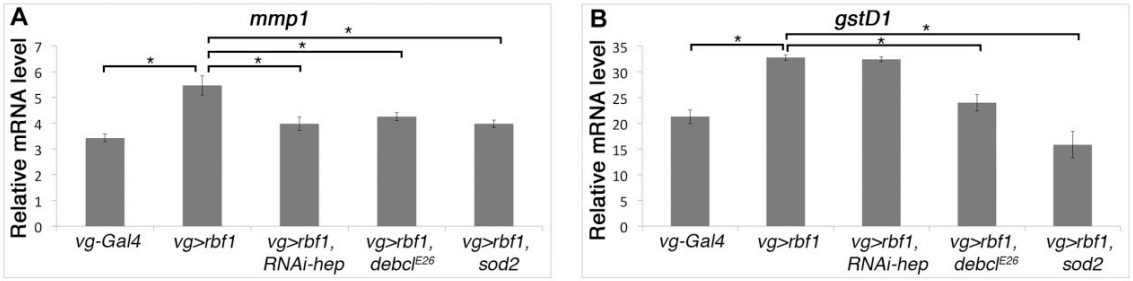


Figure S1: Rbf1 induces JNK activation and ROS production through Debcl.

Quantification by RT-qPCR of *mmp1* mRNA and *gstD1* mRNA in wing imaginal discs from *vg-Gal4*; *vg-Gal4>UAS-rbf1*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-RNAi-hep*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,debcl^{E26}* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-sod2* larvae. Data are normalized against *rp49* and the mean of three independent experiments are shown. RT-qPCR are performed as described previously (Clavier et al., 2014, *Cell Death Dis* **5**, e1405)

Error bars are the S.E.M. *: Student's t-test, P<0,05.

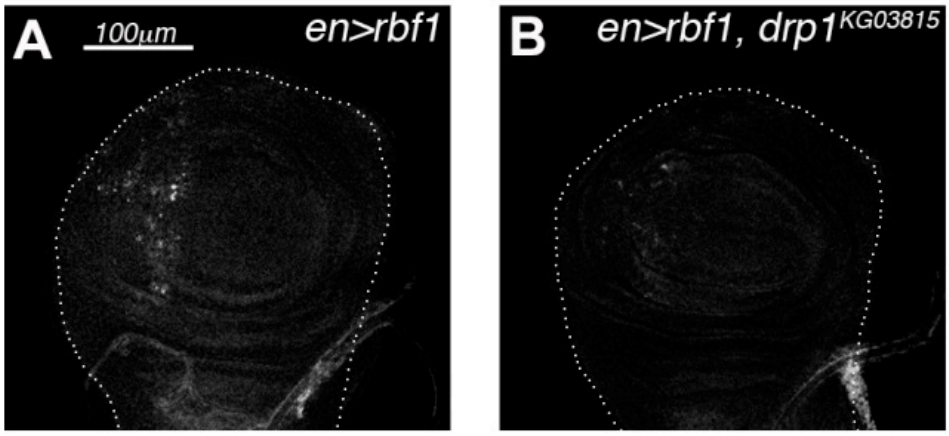


Figure S2: *drp1* is required for rbf1-induced JNK pathway activation.

Anti-Mmp1 immunostaining (white dots), in wing imaginal discs from *en-Gal4>UAS-rbf1* (a) and *en-Gal4>UAS-rbf1,drp1*^{KG03815} (b) larvae. All discs are shown with posterior to the left. Scale bar: 100 µm.

III. <u>Manuscrit n°3</u> : Des activateurs spécifiques de la voie JNK sont requis pour activer l'apoptose ou la prolifération compensatoire en réponse à la surexpression de *rbf1*

La voie JNK est une voie de signalisation extrêmement conservée chez les eucaryotes. Elle a d'abord été caractérisée pour son rôle dans la réponse au stress mais elle assure également des fonctions importantes au cours du développement (Rios-Barrera and Riesgo-Escovar, 2013) (*cf*. paragraphe I.B.5 de l'introduction). Chez la drosophile, cette voie de signalisation est requise pour la morphogenèse des cellules folliculaires, la fermeture dorsale de l'embryon, la fermeture thoracique pupale, la rotation des disques génitaux, autant d'événements qui impliquent un changement de forme des cellules (Dobens *et al.*, 2001; Macias *et al.*, 2004; Martin-Blanco *et al.*, 2000; Noselli and Agnes, 1999; Rousset *et al.*, 2010). Au-delà de cette fonction développementale, la voie JNK est activée pendant la réparation des tissus en réponse à différents stress cellulaires et cette activation conduit au déclenchement de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. En dépit de ces rôles extrêmement variés, les différents effecteurs en amont de la voie convergent pour activer l'unique JNK de drosophile, à savoir Bsk. Un des challenges de la recherche actuelle est de déterminer quels sont les composants de la voie JNK impliqués en amont de Bsk dans l'induction d'une réponse cellulaire donnée.

Une forme mutante de Rbf1, modifiée au niveau d'un site putatif de clivage par les caspases appelée Rbf1^{D253A}, a été généré au laboratoire ((Milet *et al.*, 2014), *cf.* article en Annexe). Nous avons mis en évidence que l'expression de *rbf1^{D253A}* au sein du disque imaginal d'aile induit de la mort cellulaire, ce qui indique que cette forme mutante de Rbf1 conserve la propriété pro-apoptotique de la forme sauvage dans un tissu prolifératif. De façon intéressante, l'expression de *rbf1^{D253A}*, mais pas celle de *rbf1*, conduit à la présence de tissu ectopique sur l'aile adulte, associée à une augmentation de la prolifération cellulaire au stade larvaire. L'apoptose et la prolifération induite par Rbf1^{D253A} dépendent de la JNKK Hep. Ces résultats qui suggéraient un rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire nous ont conduits à poser l'hypothèse que Rbf1^{D253A} perturbait un mécanisme de prolifération compensatoire.

Nous avons utilisé les phénotypes induits par *rbf1* et *rbf1^{D253A}* pour caractériser les membres de la voie JNK spécifiquement impliqués dans l'apoptose et la prolifération cellulaire. Par le biais de tests d'interaction génétique, et en utilisant des marqueurs d'apoptose et de prolifération cellulaire, nous avons pu mettre en évidence que la petite GTPase Rac1 était impliquée en amont des JNKKKs dTak1 et dMekk1 dans l'activation de la voie JNK aboutissant à l'induction d'apoptose en réponse à la surexpression de *rbf1* ou *rbf1^{D253A}*. De plus, nous avons pu mettre en évidence que cette mort cellulaire déclenchait une prolifération en réponse à l'apoptose, elle-même dépendante de la voie JNK, mais impliquant des effecteurs différents, à savoir la protéine adaptatrice dTRAF1 et la JNKKK Slipper. Ainsi, nous avons identifié les membres de la voie JNK impliqués sélectivement dans l'induction d'apoptose par Rbf1 ou dans la prolifération en réponse à cette apoptose.

De façon intéressante, nous avons pu montrer que la surexpression de *dtraf1* s'oppose à la perte de tissus induite par *rbf1* en stimulant la prolifération en réponse à l'apoptose observée suite à la surexpression de *rbf1*. Dans ces conditions, certaines drosophiles adultes présentent un phénotype d'hyperprolifération comparable à celui observé suite à la surexpression de *rbf1^{D253A}*. dTRAF1 semble donc être un facteur clé du processus de prolifération en réponse à l'apoptose chez la drosophile.

En outre, nous avons pu mettre en évidence, en utilisant un système inductible par choc thermique, que l'expression transitoire de *rbf1* conduit à de la mort cellulaire au sein du disque imaginal d'aile et à une augmentation de la prolifération en réponse à cette mort. En dépit de l'induction de mort cellulaire au stade larvaire, les ailes adultes ne présentent aucun phénotype de perte de tissus. Ces résultats soulignent l'existence d'un mécanisme de prolifération compensatoire en réponse à la mort induite par Rbf1 au cours du développement chez la drosophile.

Les données que nous avons obtenues contribuent donc d'une part, à une meilleur caractérisation des mécanismes à l'origine de la spécificité de réponse de la voie JNK et, d'autre part, à une amélioration de notre compréhension du processus de prolifération compensatoire présenté dans la partie I.C de l'introduction. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un manuscrit soumis à « Cell death and differentiation ».

Title: Two different specific JNK activators are required to trigger apoptosis or compensatory proliferation in response to Rbf1 in drosophila

Running title: Rbf1 induces JNK dependent compensatory proliferation

Authors: Amandine Clavier[1,2], Aurore Rincheval-Arnold[1], Adrienne Baillet[1,2] , Bernard Mignotte[1,2], Isabelle Guénal[1]

[1] Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

[2] Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Génétique Moléculaire et Physiologique, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

Corresponding author: Isabelle Guénal, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France. Tel: +33 (0)1 70 42 94 36; E-mail: isabelle.guenal@uvsq.fr

Abstract:

The Jun Kinase (JNK) signaling pathway responds to diverse stimuli by appropriate and specific cellular responses such as apoptosis, differentiation or proliferation. The mechanisms that mediate this specificity remain largely unknown. The core of this signaling pathway, composed of a JNK protein and a JNK kinase (JNKK), can be activated by various putative JNKK kinase (JNKKK) which are themselves downstream of different adaptor proteins. A proposed hypothesis is that the JNK pathway specific response lies in the combination of a JNKKK and an adaptor protein upstream of the JNKK. We previously showed that the drosophila homologue of pRb (Rbf1) and a mutant form of Rbf1 ($Rbf1^{D253A}$) have a JNK-dependent pro-apoptotic properties. $Rbf1^{D253A}$ is also able to induce a JNK-dependent abnormal proliferation. Here, we show that Rbf1-induced apoptosis triggers proliferation which depends on the JNK pathway activation. Taking advantage of these phenotype, we investigated the JNK signaling involved in either Rbf1-induced apoptosis or in proliferation in response to Rbf1-induced apoptosis. We demonstrated that two different JNK pathways involving different adaptor proteins and kinases are involved in Rbf1-apoptosis (*i.e.* Rac1-dTak1-dMekk1-JNK pathway) and in proliferation in response to Rbf1-induced apoptosis (*i.e.* dTRAF1-Slipper-JNK pathway). Using a transient induction of *rbf1*, we show that Rbf1-induced apoptosis activates a compensatory proliferation mechanism which also depend on Slipper and dTRAF1. Thus, these two proteins seem to be key players of compensatory proliferation in drosophila.

Key words: Apoptosis, Rbf1, JNK, compensatory proliferation, dTRAF1

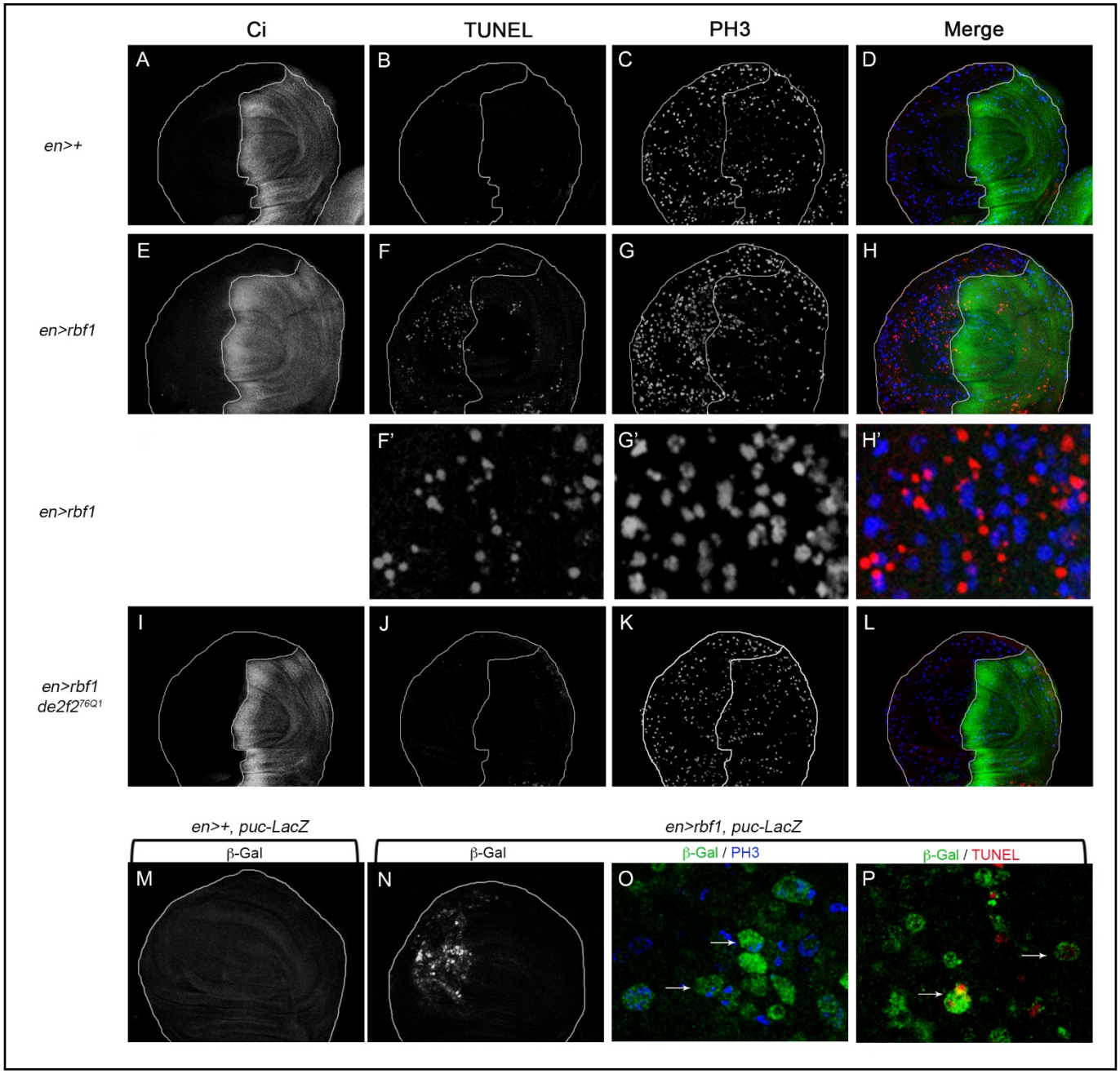


Figure 1: *rbf1*-induced apoptosis triggers cell proliferation and JNK signaling pathway activation in wing imaginal discs.

(A, E, I) anti-Ci staining used to visualize the anterior domain in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/+* or *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* or *en-gal4/de2f2^{76Q1}; UAS-rbf1/+* third instar larvae. A line indicates the antero-posterior frontier and the posterior compartment is on the left side.

(B, F, J) Visualization of apoptotic cells by TUNEL staining in wing pouch imaginal discs of previously described genotypes.

(C, G, K) Visualization of mitotic cells by PH3 staining in wing pouch imaginal discs of previously described genotypes.

(F', G' H') High magnification from F, G and H. (D, H, L) Merge of anti-Ci, TUNEL and PH3 staining.

(M, N) Visualization of β-Galactosidase in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/puc-LacZ or en-Gal4/puc-LacZ; UAS-rbf1/+* third instar larvae.

(O) Visualization of β-Galactosidase and PH3 staining in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/puc-LacZ; UAS-rbf1/+.*

(P) Visualization of β-Galactosidase and TUNEL staining in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/puc-LacZ; UAS-rbf1/+.* Arrows showed double labeled cells.

Introduction

The tumor suppressor retinoblastoma protein (pRb) is inactivated in a wide variety of cancers[1]. It plays important roles in many processes implicated in cell fate decisions such as proliferation, apoptosis and differentiation. Consistently with its tumor suppressor role, pRb inhibits cell proliferation by controlling the G1/S transition[2]. Contrarily to this well characterized role in cell cycle regulation, its role in apoptosis remains poorly understood. Indeed, pRb has been found to be either pro- or anti-apoptotic[3, 4, 5, 6, 7, 8]. However, we still do not know the precise conditions which govern pRb properties on apoptosis. To clarify how the status of the cell impacts the role of pRb in apoptosis regulation, Drosophila has been used as a model organism. The expression of *rbf1* induces apoptosis in proliferative tissues in a caspase-dependent manner, whereas no cell death is triggered by *rbf1* expression in post-mitotic cells[9]. More recently, this powerful model has allowed to highlight that a mutant form of Rbf1, at a conserved caspase cleavage site, called $Rbf1^{D253A}$ retains Rbf1 pro-apoptotic properties but is also able to induce an increase in cell proliferation leading to an overgrowth phenotype[10]. This last phenotype emphasizes the role of Rbf1 in tissue homeostasis regulation and suggests that $Rbf1^{D253A}$ could stimulate a compensatory proliferation mechanism. The activation of the JNK (Jun N-terminal kinase) pathway is required for both Rbf1 and $Rbf1^{D253A}$-induced apoptosis. Interestingly, JNK pathway is also required for $Rbf1^{D253A}$-induced overgrowth phenotype. Thus, JNK pathway activation can lead to different effects.

The JNK signaling pathway is highly conserved among metazoans. It plays an important role in different biological processes such as tissue morphogenesis, wound healing, immune response, programmed cell death or life span[11, 12]. The JNK pathway is a kinase cascade leading to the phosphorylation and activation of the JNK proteins. The activated JNK translocates to the nucleus where it phosphorylates transcription factors and by this way modulates transcriptional level of target genes. JNK is activated by JNKKs which are themselves activated by a great number of JNKKKs[13]. Another level of complexity lies in the mode of activation of the JNKKKs which involves different adaptor proteins: small GTPases of the Ras superfamily, kinases (*i.e.* : Msn) or scaffold proteins such as Traf1 (TNF (tumor necrosis factor) receptor associated factor 1). Despite extensive progress in the understanding of the JNK pathway, the mechanisms by which the pathway contributes to pleiotropic effects are poorly defined.

Here, we used Rbf1 and $Rbf1^{D253A}$-induced phenotypes to tackle the problem of JNK signaling specificity *in vivo*. Firstly, we realized genetic interaction tests based on Rbf1-induced loss of tissue phenotypes to identify JNK pathway members specifically involved in the induction of apoptosis. In parallel, we used $Rbf1^{D253A}$-induced overgrowth phenotypes to determine members of the JNK pathway that are involved in the induction of proliferation. We identified the specific adaptor proteins and JNKKKs which are either responsible for the JNK activation leading to apoptosis or to proliferation. Interestingly, the characterization of JNK members specific effects allowed us to highlight that Rbf1-induced apoptosis triggers proliferation which compensates the loss of tissue. Transient expression of Rbf1 confirms that *rbf1*-induced apoptosis lead to a JNK pathway-dependent compensatory proliferation.

Thus, our study revealed the importance of adaptor proteins and JNKKKs to explain JNK pathway specific response. Moreover, our work identifies specific proteins involved either in Rbf1-induced apoptosis or in proliferation in response to cell death and may represent new potential targets for cancer treatment.

Results

Both *rbf1*-induced apoptosis and proliferation in response to apoptosis involve a JNK pathway activation

We previously demonstrated that $Rbf1^{D253A}$, a mutant form of Rbf1, induces both apoptosis and an overgrowth wing phenotype which is associated with abnormal non-cell autonomous proliferation and requires the activation of the JNK pathway. We postulated that this mutant form of Rbf1 could deregulate an apoptosis-induced proliferation (AiP) mechanism[10]. To test this hypothesis, we first determined if *rbf1*-induced apoptosis is able to promote a compensatory proliferation *in vivo.* We performed simultaneously a TUNEL staining to detect apoptotic cells and an anti-phospho-histone H3 (PH3) staining to label mitotic cells in wing imaginal discs of *en-Gal4/+* and *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* third instar larvae. The *en-Gal4* driver allows the

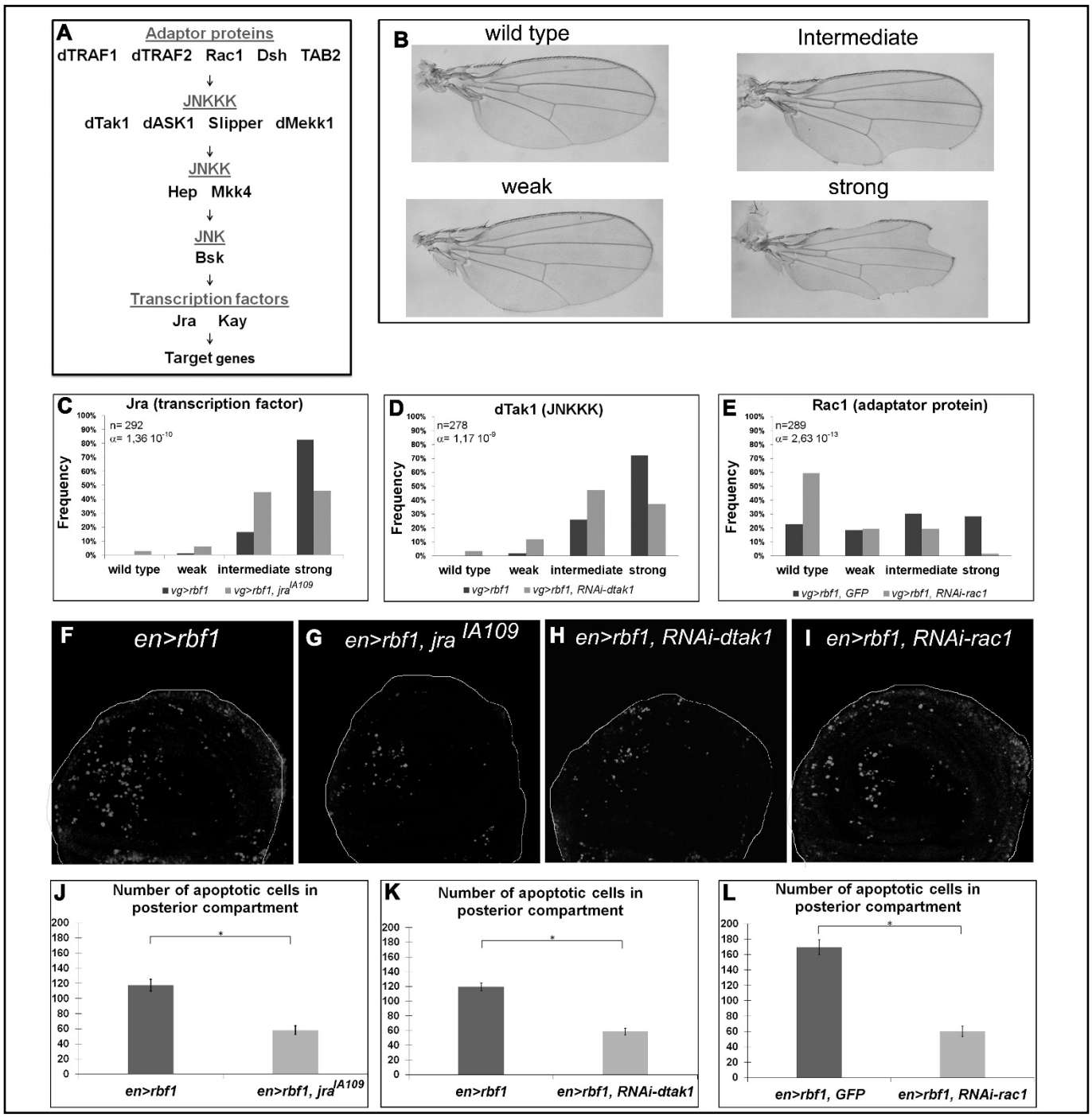


Figure 2: *rbf1*-induced apoptosis requires the GTPase Rac1 and the specific kinases dTak1 and dMekk1.

(A) Diagram of the JNK signaling pathway.

(B) Apoptosis induced by *rbf1* in *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* third instar larval wing imaginal discs give rise to notches in adult wings. Adult wing phenotypes are grouped into four categories (wild type, weak, intermediate and strong) according to the numbers of notches observed along wing margin (adapted from Milet *et al.* 2010).

(C-E) Comparison of notch wing phenotypes distribution between : (C) *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *vg-Gal4/ jra^{lA109}; UAS-rbf1/+* flies, Wilcoxon test: n= 292, α=1,36 10^{-10}, Ws=-6,60; (D) *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *vg-Gal4/ UAS-RNAi dtak1; UAS-rbf1/+* flies, Wilcoxon test: n= 278, α =1,17 10^{-9}, Ws=-6,22; (E) *vg-Gal4/UAS-egfp; UAS-rbf1/+* and *vg-Gal4/ UAS-RNAi rac1; UAS-rbf1/+* flies, Wilcoxon test: n= 278, α =1,17 10^{-9}, Ws=-6,22. Each experiment presented in C-E was independently performed three times.

(F-I) Visualization of apoptotic cells by TUNEL staining in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/UAS-rbf1 or en-Gal4/ jra^{lA109}; UAS-rbf1/+*, or *en-Gal4/UAS-RNAi dtak1; UAS-rbf1/+* or *en-Gal4/ UAS-RNAi rac1; UAS-rbf1/+* third instar larvae. Posterior compartment is on the left side.

(J-L) Comparison of apoptotic cells numbers in the wing pouch imaginal discs between *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/ jra^{lA109}; UAS-rbf1/+* third instar larvae; between *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/UAS-RNAi dtak1; UAS-rbf1/+* third instar larvae and between *UAS-rbf1/+* or *en-Gal4/ UAS- RNAi rac1; UAS-rbf1/+* third instar larvae. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test α<0.05). For each genotype, quantifications were done for 30 third instar larval wing imaginal discs at least.

expression of *rbf1* specifically in the posterior compartment of the wing imaginal disc. So, we used anti-Ci antibodies to stain the anterior compartment and mark off the posterior compartment (figure 1A and E). As expected, numerous apoptotic cells were observed in the posterior compartment of *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* wing discs, compared with *en-Gal4/+* control wing disc (figure 1B, F and F'). Interestingly, an increase in PH3 staining was observed in the *rbf1*-expressing compartment (figure 1C, G and G') compared with control wing disc. Moreover we observed TUNEL and PH3 labelling in adjacent cells in *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* wing imaginal disc (figure 1H'). This indicates that cells which proliferate are adjacent to dying cells. We next tested whether this increase of proliferation is dependent on the presence of apoptotic cells. We had previously shown that *rbf1*-induced apoptosis requires the dE2F2 transcription repressor and is inhibited in a heterozygous *de2f2* mutant background [14]. Thus, we used the $de2f2^{76Q1}$ loss of function mutant to inhibit *rbf1*-induced apoptosis. We observed that the inhibition of apoptosis in *en-gal4/*$de2f2^{76Q1}$; *UAS-rbf1/+* wing imaginal discs was associated with a reduction of PH3 staining compared with *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* (figure 1J, K). Thus, the increase in proliferation observed in *rbf1* overexpressing discs was trigger in response to apoptosis.

JNK signaling pathway can be associated with both apoptosis and proliferation events. To investigate if the JNK pathway is activated either in apoptotic or mitotic cells consecutively to *rbf1* expression, we use the *puc-LacZ* reporter, which monitors JNK activity[15]. *rbf1* overexpression caused an activation of the JNK signaling both in apoptotic and in proliferative cells, as PH3 or TUNEL positive cells were detected by the presence of β-Gal staining (figure 1M-P). Thus the JNK pathway is activated in both apoptotic cells and proliferating cells.

Altogether, these data indicate that *rbf1*-induced apoptosis triggers cell proliferation in response to apoptosis and that both events were associated with an activation of the JNK signaling pathway.

The specific adaptor dRac1 and the kinases dTak1 and dMekk1 are required for *rbf1*-induced apoptosis

JNK signaling pathway involves a kinase cascade composed of different levels of MAP Kinases (figure 2A). By co-expressing *rbf1* with a *bsk-RNAi* to disrupt the JNK pathway, we had previously shown that the JNK Bsk was required for Rbf1-induced apoptosis[10]. In this study we tested the involvement of JNK pathway effectors using at least two mutant or RNAi lines per effector. RNAi efficiency has been confirmed previously[16, 17]. First, to verify that the Jun-related antigen (Jra) and the Kayak (Kay), transcription factors were necessary, we performed genetic interaction tests. Indeed, as previously described, the overexpression of *rbf1* with the *vestigial (vg)-Gal4* driver, induces notches along the wing margin whose number is correlated with the amount of apoptosis in wing imaginal discs of third instar larvae[9]. Thus, we tested if *rbf1*-induced adult phenotypes and *rbf1*-induced apoptosis were altered in a jra^{IA109} loss of function mutant heterozygous background. Rbf1-induced wing phenotypes were classified into four categories according to the number of notches: wild type (no notch), weak, intermediate and strong (figure 2B). When *rbf1* was overexpressed in a jra^{IA109} heterozygous background, a significant shift of the phenotypes distribution toward weaker phenotypes was observed compared with overexpression of *rbf1* alone (figure 2C), showing that *jra* is necessary for *rbf1*-induced wing notches phenotype. To confirm that *jra* was involved in *rbf1*-induced apoptosis, we did TUNEL experiments in wing imaginal disc of larvae expressing *rbf1* under *en-Gal4* driver (figure 2F) and quantified the number of apoptotic cells, specifically in the posterior domain which overexpressed *rbf1*. The number of TUNEL-labeled cells was significantly weaker in *en-Gal4/* jra^{IA109}*; UAS-rbf1/+* wing imaginal disc compared with *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* discs (figure 2F-G and J), confirming that the shift of phenotypic distribution we had observed was correlated with the amount of apoptosis in larvae. We then assessed the involvement of Kay transcription factor, as well as Hep and Mkk4 JNKK in *rbf1*-induced apoptosis. Fly and larvae co-expressing *RNAi-kay*, *RNAi-hep* or *RNAi-mkk4* with *rbf1* were analyzed. The partial depletion of Kay transcription factor or Hep JNKK suppressed both *rbf1*-induced notches phenotype and apoptosis, whereas *RNAi-mkk4* had no effect on these phenotypes (table 1). Altogether these results indicate that in addition to Bsk[10], Jra, Kay and Hep have a pivotal role in *rbf1*-induced apoptosis.

Table 1: Characterization of the JNK signaling pathway effectors required for *rbf1*-induced apoptosis

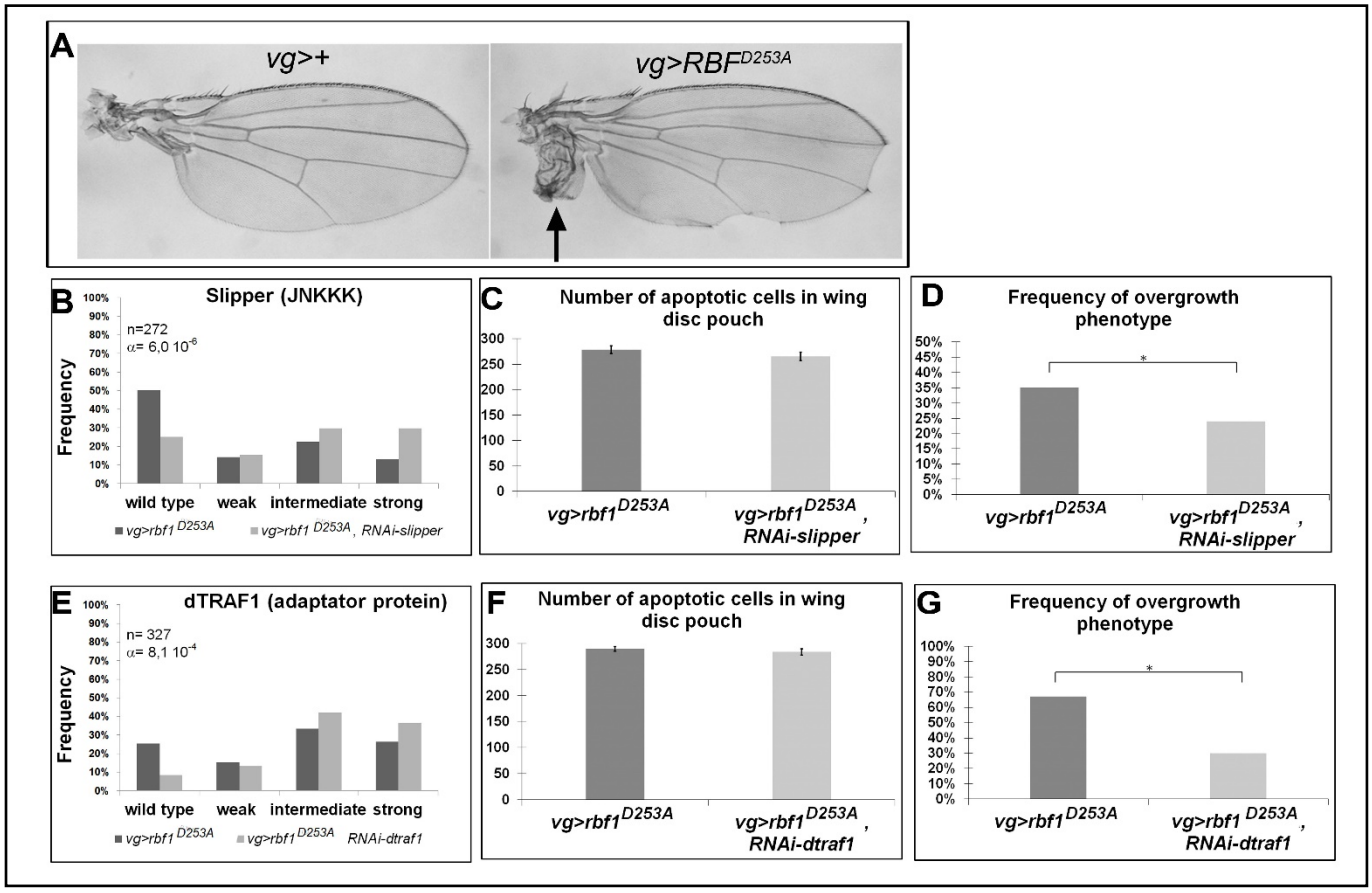
Rbf1		Adult stage (wing)	Larval stage (wing imaginal disc)
		Notch phenotype	Quantification of apoptosis
Transcription factors	*jra* ^{IA109}	Rescue n= 292, α=1,36 10^{-10}, Ws=-6,60	Decrease n= 39, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-kay	Rescue n= 284, α=2,12 10^{-7}, Ws=-5,24	Decrease n= 42, $\alpha<10^{-30}$
JNKK	*UAS-RNAi-hep*	Rescue n= 239, α=1,36 10^{-12}, Ws=-7,38	Decrease n= 54, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-mkk4	No effect n= 240, α=0,14, Ws=1,47	No effect n= 49, α=0,47
JNKKK	*UAS-RNAi-dtak1*	Rescue n= 278, α=1,17 10^{-9}, Ws=-6,22	Decrease n= 28, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-dASK1	No effect n= 232, α=0,06, Ws=1,87	No effect n= 46, α=0,33
	UAS-RNAi-slipper	No effect n= 194, α=0,17, Ws=1,36	No effect n= 41, α=0,46
	UAS-RNAi-dmekk1	Rescue n= 264, $\alpha<10^{-30}$, Ws=-12,96	Decrease n= 53, $\alpha<10^{-30}$
Adaptator proteins	*UAS-RNAi-dtraf1*	No effect n= 200, α=0,45, Ws=0,75	No effect n= 59, α=0,44
	UAS-RNAi-dtraf2	No effect n= 217, α=0,33, Ws=-0,95	No effect n= 49, α=0,25
	UAS-RNAi-rac1	Rescue n= 289, α=2,63 10^{-13}, Ws=-7,65	Decrease n= 45, $\alpha<10^{-30}$
	dsh ^{1}	No effect n=165, α=0,23, Ws=-1,20	No effect n= 51, α=0,22
	UAS-RNAi-tab2	No effect n=246, α=0,18, Ws=-1,32	No effect n= 44, α=0,67

The JNK signaling pathway can be activated by a wide range of stimuli involving many adaptor proteins and JNKKK (figure 2A). Thus, we have sought if a specific cascade was necessary for *rbf1*-induced apoptosis. We used specific *RNAi* or mutants to probe the role of four JNKKKs and fives adaptor proteins in *rbf1*-induced apoptosis. Similar genetic interaction tests and TUNEL stainings were performed. The results obtained are summarized in table 1. The wing phenotypic repartition, TUNEL stainings and quantification are shown for *dtak1* and *rac1* in figure 2D, H, K and E, I, L respectively. We found a significant rescue of *rbf1*-induced adult phenotypes and a decrease of *rbf1*-induced apoptosis for two of the JNKKKs tested, dTak1 and dMekk1, and for only one adaptor protein, Rac1 (table 1). On the contrary, the alteration of the level of dASK1, Slipper, dTRAF1, dTRAF2, Dsh and TAB2 had no effect on *rbf1*-induced notches phenotype and apoptosis. All these results indicate that a Rac1/dTak1-dMekk1/Hep/Bsk JNK pathway is necessary for the activation of Jra-Kay transcription factors which eventually induce apoptosis in response to *rbf1* overexpression in the wing cells.

The specific adaptor dTRAF1 and the kinase Slipper are required for *rbf1^{D253A}*-induced overgrowth phenotype and *rbf1*-induced proliferation in response to apoptosis

The overexpression of the *rbf1^{D253A}* mutant form can induce both notches and overgrowth wing phenotype as shown figure 3A. We had previously shown that the kinase Bsk mediates *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis, and is responsible for *rbf1^{D253A}*-induced overgrowth[10]. Thus we wondered which kinases and adaptor proteins of the JNK pathway were involved in these phenotypes. As previously done for Rbf1, we performed genetic interaction tests, using mutants and *RNAi*, to disrupt the JNK pathway in *vg-Gal4, UAS-rbf1^{D253A}/+* overexpression background. The notches phenotypes were classified and analyzed as described above for wild type *rbf1* expression and overgrowth phenotypes were simultaneously counted. Both phenotypes induced by *rbf1^{D253A}* were quantified and compared between control and JNK disrupt background. TUNEL stainings were also performed in parallel in wing imaginal disc for each genotype. The results are presented in table 2 and figure 3. Interestingly, when *rbf1^{D253A}* was expressed in *jra^{IA109}* mutant heterozygous background or co-expressed with a specific *RNAi* against *kay*, *hep*, *dtak1*, *dmekk1* or *rac1* a rescue of the notches phenotype was observed. In all these contexts, quantifications of TUNEL staining in third instar larval wing imaginal discs confirmed that the observed shift of phenotypic distribution was correlated with a decrease in the amount of apoptosis. Thereby, the Rac1-dTak1-dMekk1-JNK pathway which is necessary for *rbf1*-induced apoptosis is also involved in *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis. As expected, the decrease in apoptosis was associated with a decrease in overgrowth phenotype, which is in agreement with the hypothesis that overgrowth phenotype is triggered by some proliferation in response to - *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis. As observed for *rbf1*-induced apoptosis, the decrease of the mRNA levels of the genes encoding the JNKK Mkk4, the JNKKK dASK1 and the adaptor proteins dTRAF2, Dsh and TAB2 had no effect on *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis, notches or overgrowth phenotypes. Surprisingly the co-expression of *rbf1^{D253A} with RNAi* specific to the JNKKK *slipper* or the adaptor protein *dtraf1* significantly enhanced the notches phenotype (figure 3B and E). Interestingly, these shifts toward stronger phenotypes were not associated with a change in apoptosis level but with a rescue of the overgrowth phenotype (figure 3C-D and F-G). Thus, the reduction of mRNA levels of *slipper* or *dtraf1* was able to inhibit overgrowth phenotype without inhibiting apoptosis. Slipper and dTRAF1 were the only regulators we had found necessary for *rbf1^{D253A}*-induced overgrowth phenotype but not involved in *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis pathway, suggesting that a dTRAF1/Slipper-JNK pathway is necessary for *rbf1^{D253A}*-induced proliferation in response to apoptosis.

To test this hypothesis, we investigated whether Slipper and dTraf1 were necessary for *rbf1*-apoptosis induced proliferation. We performed PH3 staining in larval wing imaginal discs of *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* in control background or in a JNK pathway disrupted background, using the specific mutants or *RNAi* tested above. The partial depletion of all the effectors necessary for *rbf1*-induced apoptosis (*kay, jra, hep*, *dtak1*, *dmekk1* or *rac1*) induces a decrease in PH3 staining (table 3), confirming that this proliferation is linked to the apoptosis. Contrarily, co-expression of a *RNAi-slipper* or a *RNAi-dtraf1* with *rbf1* significantly reduced proliferation levels



<u>Figure 3:</u> The kinase Slipper and the TNF associated factor dTRAF1 are required for *rbf1^{D253A}*-induced overgrowth phenotypes but not for *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis.

(A) Wild type wing and overgrowth wing phenotype observed in some fly expressing *rbf1^{D253A}* (adapted from Milet *et al.* 2014).

(B, E) Comparison of notch wing phenotypes distribution between *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+* and *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/ UAS-RNAi slipper* (Wilcoxon test: n= 272, α=6,0 10^{-06}, Ws=4,54) and between *vg-Gal4, rbf1^{D253A} /*and *vg-Gal4, rbf1^{D253A} /+; UAS-RNAi dtraf1/+* flies (Wilcoxon test: n= 327, α=8,1 10^{-4}, Ws=3,34).

(C, F) Comparison of apoptotic cells numbers in the wing pouch imaginal discs between *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+* and *vg-Gal4, rbf1^{D253A} /UAS-RNAi slipper* third instar larvae and between *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+* and *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+; UAS-RNAi dtraf1/+* third instar larvae. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test α<0.05). For each genotype, quantifications were done for 30 third instar larval wing imaginal discs at least.

(D, G) Frequencies of *rbf1^{D253A}*-induced ectopic tissue observed in *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+* and *vg-Gal4, rbf1^{D253A} / UAS-RNAi slipper* flies and in *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+* and *vg-Gal4, rbf1^{D253A}/+; UAS-RNAi dtraf1/+* flies. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Chi^2 test α<0.05).

Each experiment presented in B, D, E and G was independently performed three times.

(figure 4) with no effect on apoptosis (table 1). These results show that a dTRAF1-Slipper-JNK pathway triggers *rbf1* AiP.

Therefore, we demonstrate that two different JNK pathways involving different adaptor proteins and kinases are involved in *rbf1*-apoptosis (*i.e.* Rac1-dTak1-dMekk1-JNK pathway) and in *rbf1* AiP (*i.e.* dTRAF1-Slipper-JNK pathway).

dtraf1 overexpression is sufficient to increase the proliferation triggered by Rbf1-induced apoptosis

We suggested that $rbf1^{D253A}$ overgrowth induced-phenotype results from a deregulation of the AiP mechanism [10]. We thus wondered whether an overexpression of *dtraf1* would be sufficient to enhance *rbf1* AiP and thus to mimic $rbf1^{D253A}$-induced overgrowth phenotype. First, to verify that *dtraf1* overexpression could increase the JNK pathway activation triggered by *rbf1*, we quantified by RT-qPCR the *mRNA* levels of two JNK pathway target genes: *puc* and *mmp1* (figure 5A). As expected *vg-Gal4/ UAS-dtraf1; UAS-rbf1/+* greatly increased *puc* and *mmp1* expression compared with *vg-Gal4/UAS-dtraf1* control. Then, we compared the notches phenotype of *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* with *vg-Gal4/UAS-dtraf1; UAS-rbf1/+* flies. We verified that *vg-Gal4/ UAS-dtraf1* flies showed no particular wing phenotype. *dtraf1* overexpression triggered a significant shift of *rbf1*-induced notches phenotype toward weaker phenotype (figure 5B), indicating that *dtraf1* expression can partially suppress *rbf1*-induced notches phenotype. We performed TUNEL and PH3 stainings to compare *en-Gal4/ UAS-dtraf1* with *en-Gal4/+* control wing imaginal discs. *dtraf1* overexpression did not modify apoptosis nor proliferation levels compared to *en-Gal4/+* control (figure 5 C-H). Interestingly, the co-expression of *dtraf1* with *rbf1* did not affect *rbf1*-induced apoptosis (figure 5H, 5K and 5O), but significantly increase *rbf1* AiP (figure 5I; 5L and 5P). Moreover, some rare overgrowth phenotypes were observed in wing of flies co-expressing *rbf1* and *dtraf1* (figure 5R). These results show that *dtraf1* overexpression is sufficient to enhance *rbf1* AiP, confirming that overgrowth phenotypes ensue from an excess of proliferation during wing imaginal discs development.

Rbf1-induced apoptosis activate a compensatory proliferation mechanism that depends on _slipper_ and _dtraf1_

In our assay with *vg-Gal4*, notches result from a balance between apoptosis and AiP events as suggested by the enhancement of the $rbf1^{D253A}$-induced notch phenotype by coexpressing *slipper* or *dtraf1* specific RNAi. As *vg-Gal4* driver is expressed until the end of pupal development, we thought that apoptosis induced-proliferation may not be sufficient to compensate the loss of tissue induced at the end of development. Thus, we investigated whether a transient induction of *rbf1* could activate a compensatory proliferation mechanism able to maintain tissue homeostasis. We used *heat shock-Gal4 (hs-Gal4*) driver to induce a transient expression of *rbf1* to investigate if this transient induction of *rbf1* was able to induced apoptosis and proliferation. Thus, *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *hs-Gal4/ +* control third instar larvae were shocked at 29°C for 10 hours. Their wing imaginal discs were dissected 5 hours after the end of the heat shock and stained for TUNEL or PH3, and the amount of apoptotic or mitotic cells quantified in the wing disc pouch. A significant increase in TUNEL and PH3 stainings was observed in *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* as compared with *hs-Gal4/+* control wing discs (figure 6A-B and D-E), showing that a brief pulse of *rbf1* is sufficient to induced apoptosis and AiP in wing imaginal discs. Interestingly, wings of heat shocked *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* adult flies were normal (figure 6F and O), indicating that under these conditions the amount of *rbf1* AiP was sufficient to compensates the cell loss. We then wondered whether the dTRAF1-Slipper-JNK pathway is involved in this compensatory proliferation. Thus, we repeated the same experiment by co-expressing *RNAi-slipper* or *RNAi-dtraf1* with *rbf1* by using the *hs-Gal4* driver. A significant number *hs-Gal4/UAS-RNAi-slipper; UAS-rbf1/+* and *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-RNAi-dtraf1* flies presented notched wings (figure 6I, L, O) compared with *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* flies. We performed TUNEL and PH3 stainings of wing imaginal discs of the same genotypes. The reduction of *slipper* or *dtraf1* mRNA level in wing discs expressing *rbf1* did not affect the number of apoptotic cells (figure 6G, J, M), confirming that

Rbf1^{D253A}		Adult stage (wing)		Larval stage (wing imaginal disc)
		Notch phenotype	Overgrowth phenotype	Quantification of apoptosis
Transcription factors	*jra* ^{IA109}	Rescue n= 417, α=3,5 10^{-4}, Ws=-3,56	Rescue n= 511, α=3,74 10^{-2}	Decrease n= 52, α<10^{-30}
	UAS-RNAi-kay	Rescue n= 417, α=1,1 10^{-11}, Ws=-7,04	Rescue n= 417, α=0,86 10^{-4}	Decrease n= 45, α<10^{-30}
JNKK	*UAS-RNAi-hep*	Rescue n= 348, α=6,7 10^{-7}, Ws=-5,01	Rescue n= 384, α<10^{-30}	Decrease n= 47, α<10^{-30}
	UAS-RNAi-mkk4	No effect n= 207, α=0,4, Ws=-0,90	No effect n= 212, α=0,49	No effect n= 51, α=0,53
JNKKK	*UAS-RNAi-dtak1*	Rescue n= 198, α=1,1 10^{-8}, Ws=-5,82	Rescue n= 252, α<10^{-30}	Decrease n= 56, α<10^{-30}
	UAS-RNAi-dASK1	No effect n= 354, α=8,8 10^{-2}, Ws=-2,61	No effect n= 370, α=0,48	No effect n= 41, α=0,78
	UAS-RNAi-slipper	Enhancement n= 272, α=6,0 10^{-6}, Ws=4,54	Rescue n= 294, α=4,33 10^{-2}	No effect n= 40, α=0,23
	UAS-RNAi-dmekk1	Rescue n= 352, α=2,2 10^{-6}, Ws=4,76	Rescue n= 372, α=1,19 10^{-2}	Decrease n= 38, α<10^{-30}
Adaptator proteins	*UAS-RNAi-dtraf1*	Enhancement n= 327, α=8,1 10^{-4}, Ws=3,34	Rescue n= 357, α<10^{-30}	No effect n= 53, α=0,42
	UAS-RNAi-dtraf2	No effect n= 279, α=0,5, Ws=0,64	No effect n= 336, α=0,39	No effect n= 46, α=0,17
	UAS-RNAi-rac1	Rescue n= 625, α=3,4 10^{-9}, Ws=-6,03	Rescue n= 708, α=<10^{-30}	Decrease n= 49, α<10^{-30}
	dsh ^{1}	No effect n= 434, α=4,0 10^{-3}, Ws=-2,87	No effect n= 476, α=0,34	No effect n= 40, α=0,60
	UAS-RNAi-tab2	No effect n= 461, α=1 10^{-4}, Ws=-2,47	No effect n= 505, α=0,27	No effect n= 36, α=0,91

Table 2: Characterization of the JNK signaling pathway effectors required for *rbf1^{D253A}*-induced apoptosis and overgrowth phenotypes

Slipper and dTRAF1 are not involved in Rbf1-induced apoptotic cascade. However, a significant decrease of PH3 staining was observed (figure 6H, K, N). These results highlight that Slipper and dTRAF1 are necessary to trigger the compensatory proliferation in response to Rbf1-induced apoptosis.

Discussion

Compensatory proliferation is one of the main mechanisms that allows the reconstruction of a damaged tissue after the induction of massive apoptosis *in vivo*. Indeed, apoptotic cells are able to promote proliferation of the surrounding cells. This process has been largely studied using "undead cells", in which apoptosis has been induced but cannot be executed because effector caspases are inhibited by *p35* overexpression. However, there are major differences between undead and genuine apoptotic (that do not overexpress *p35*) cells. Although under *p35*-expressing conditions JNK activity seems to occur only in "undead cells"[18], it is often necessary both inside and outside the ablated domain during compensatory proliferation[19, 20]. Moreover, if Dpp and Wg are mitogens involved in response to undead cells, the regenerative response can occurred in absence of these mitogens[21]. We had previously reported that *rbf1*^{D253A} AiP depends on JNK pathway activation and do not involved Wg[10]. Thus, overgrowth phenotypes associated with *rbf1*^{D253A} expression constitute a robust model to screen regulators of AiP without using p35.

If the JNK signaling pathway is essential for AiP, the way it is activated and the specific kinases involved remain elusive. Recent results, obtained in the eye imaginal disc, have identified specific components upstream of Bsk involved in the JNK cascade activation in an *ey>hid, p35* model of AiP[20]. This work permitted the identification of a subset of genes acting upstream of JNK activity including Rho1. In our model, we have identified a different set of JNK pathway components. Three differences can account for this apparent discrepancy. First, we did not use p35 to inhibit cell death, second we used another apoptosis inducer (*rbf1 versus hid*), and third the nature of the tissue was different (wing versus eye disc). Indeed, the kinases and their protein partners present in the cells are probably specific of the tissue, which could explain specific responses. Accordingly, the JNK signaling pathway can lead to a great number of responses including cell death and proliferation depending on the context. This could be partly explained by the large number of possible kinases, adaptors and ligand/receptor complexes combinations. Moreover, these families of proteins have unique and overlapping functions, but the intrinsic properties of the individual family members that confer particular responses to distinct signals remains elusive. For example the C-terminal regions of Slpr and dTak1 contribute to their localization and selective integration into the appropriate signaling pathways in a context-dependent manner[22].

The originality of our approach is to characterize both the effectors of the JNK pathway involved in apoptosis and those involved in AiP in response to the same stimulus (Figure 7). This was facilitated by the duality of the adult phenotypes induced by the *rbf1*^{D253A} form (notches and overgrowth). In Drosophila, there is a unique JNK, Bsk. Surprisingly, the same kinase and the same transcription factors Jra and Kay can trigger proliferation or apoptosis. As expected, we have shown that these events do not occur in the same cells. Nevertheless, this highlights that the nature and the combination of the kinases activated upstream of Bsk may lead to somehow different Jra/Kay activation. Alternatively, it could be that Bsk phosphorylation sites might vary depending on the kinases activated upstream in the pathway.

Bsk can be phosphorylated by the JNKK Mkk4 but this event seems restricted to certain particular situation such as the activation of the JNK pathway by the Eiger (the unique fly TNF) /Wengen complex[23]. Mkk4 is not involved in our model suggesting that the activation of the JNK cascade during AiP does not involve Wengen. Even though, it does not excluded a potential role of Eiger for which a new receptor, Grindelwald (Grnd), has recently been characterized[24]. As Grnd integrates signals from Egr and apical polarity determinants to induce JNK-dependent neoplastic growth or apoptosis in a context-dependent manner it is a potentially interesting candidate to test in our model. Another candidate is Diap1 which has been shown to poly-ubiquitinylate

Rbf1		Larval stage (wing imaginal disc)
		Quantification of proliferation
Transcription factors	*jra* ^{IA109}	Decrease n= 50, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-kay	Decrease n= 39, $\alpha=1,3\ 10^{-3}$
JNKK	*UAS-RNAi-hep*	Decrease n= 48, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-mkk4	No effect n= 42, $\alpha=0,638$
JNKKK	*UAS-RNAi-dtak1*	Decrease n= 41, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-dASK1	No effect n= 43, $\alpha=0,791$
	UAS-RNAi-slipper	Decrease n= 47, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-dmekk1	Decrease n= 35, $\alpha<10^{-30}$
Adaptator proteins	*UAS-RNAi-dtraf1*	Decrease n= 39, $\alpha<10^{-30}$
	UAS-RNAi-dtraf2	No effect n= 46, $\alpha=0,849$
	UAS-RNAi-rac1	Decrease n= 40, $\alpha<10^{-30}$
	dsh ^{1}	No effect n= 33, $\alpha=0,606$
	UAS-RNAi-tab2	No effect n= 38, $\alpha=0,894$

Table 3: Characterization of the JNK signaling pathway effectors required for proliferation induced in response to *rbf1*-induced apoptosis

dTRAF1[25]. We have previously demonstrated that *rbf1*-induced apoptosis involves a downregulation of *diap1* expression[10]. Interestingly, a decrease of Diap1 level can trigger an activation of the JNK pathway[26]. Thus, the activation of the JNK signaling cascade involved in Rbf1 AiP could result from a decrease in *diap1* mRNA.

Considering the dying cells, we have already showed that *rbf1*-induced apoptosis involved reactive oxygen species (ROS) and that the activation of the JNK pathway by Rbf1 is a consequence of ROS accumulation (Clavier *et al* submitted). Many data report an activation of the JNK pathway depending on ROS. However, all the factors that regulate this activation are not yet identified. For example, in mammalian cells the JNKKK ASK1 has been extensively characterized as an ROS-responsive kinase. Indeed its activation is regulated by the protein Trx that has a redox-active site and functions as a reactive oxygen species sensor[27, 28]. As dASK1 is not involved in our model we hypothesize that another kinase could be responsible of the activation of JNK pathway. Elsewhere, the *ob/ob* mice displayed abnormal glycometabolism, oxidative stress and excessive expression of Rac1 in the pancreas[29].

Currently, we do not know how proliferation is induced downstream of the JNK pathway in response to Rbf1-induced apoptosis. It has been shown that a JNK-dependent activation of Yorkie, the transcriptional coactivator that is negatively regulated by Hippo signaling, is essential to regeneration-associated growth[30]. Other works showed that JNK activation could stimulate non-autonomous JAK-STAT signaling for proliferation [31]. In the case of an apoptosis-induced proliferation triggered by Dmp53, cell proliferation depends on Notch[32]. Thus, each of these pathways constitutes putative effector of apoptosis-induced proliferation in our model.

Our study is the first characterization of JNK effectors involved in apoptosis and apoptosis-induced proliferation in a same model. AiP is an important general process for homeostasis in multicellular organisms and its dysregulation can be involved in tumor resistance to irradiation. Thus, elucidating signaling specificity among JNK pathway in AiP could be of first interest in oncology.

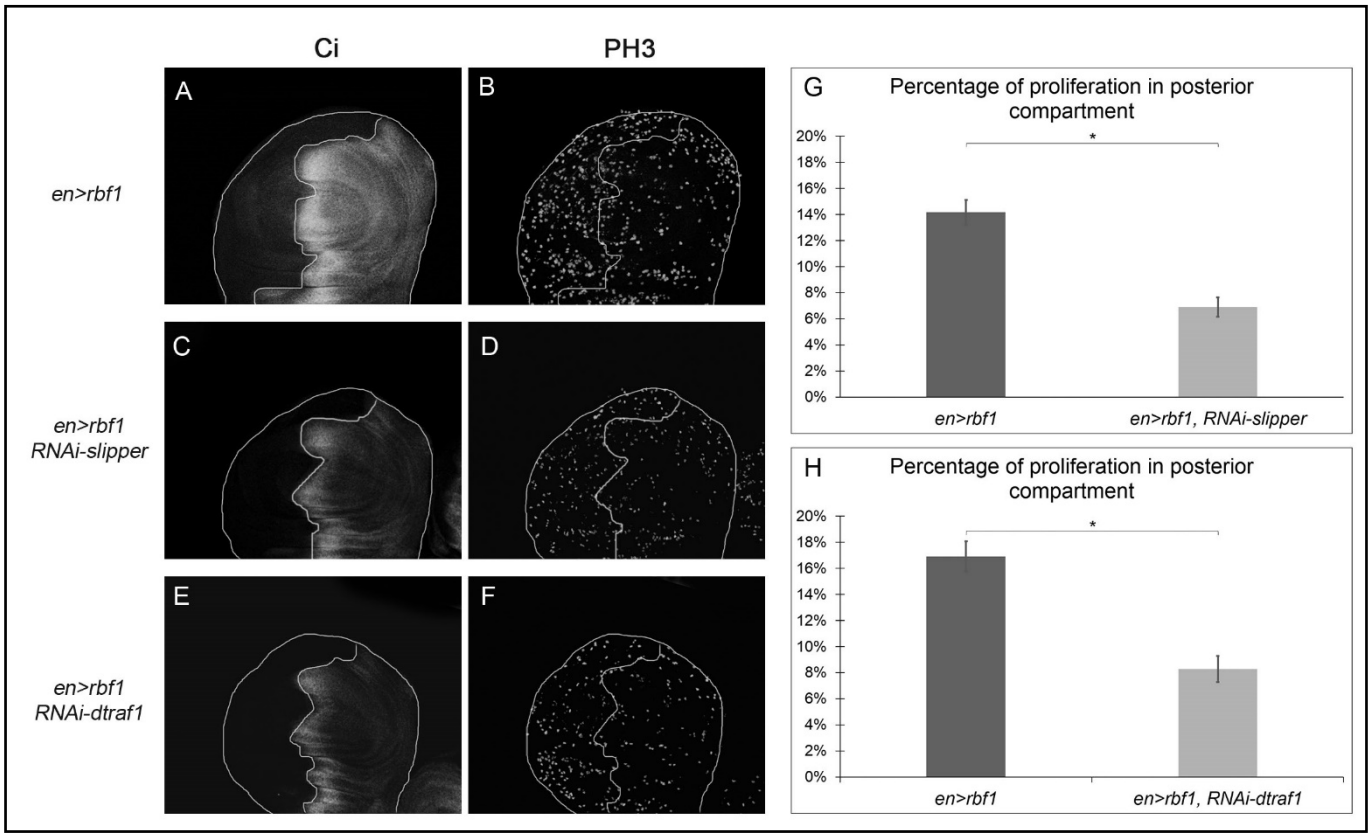
Materials and Methods

Fly stocks:

Flies were raised at 25 °C on a standard medium. *The UAS-rbf1* and *vg-Gal4* strains were generous gifts from J Silber. The *en-Gal4* strain was kindly provided by L. Théodore. The *hs-Gal4* strain was previously described[33].The following strains were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington, IN, USA): *de2f2*^{76Q1} (7436), *puc*^{E69} (*puc-LacZ*, 6762), *jra*^{lA109} (3273), *UAS-RNAi-rac1* (28985), *traf4*^{EP578} (*UAS-dtraf1*, 17285) and *dsh*^{1} (5298). The *UAS-RNAi-kay* (v27722), *UAS-RNAi-mkk4* (v26928), *UAS-RNAi-dtak1* (v101357), *UAS-RNAi-slipper* (v106449), *UAS-RNAi-dASK1* (v34892), *UAS-RNAi-dmekk1* (v25528), *UAS-RNAi-dtraf1* (v21213), *UAS-RNAi-dtraf2* (v16125) and *UAS-RNAi-tab2* (v37553) strains come from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). The *UAS-hep-RNAi* (4353R2) strain was provided by the National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Kyoto, Japan). The *UAS-gfp* strain (BL35786) and the host line *y,w[1118];P{attP,y[+],w[3']}* (transformant ID 60100) were respectively used as control for TRIP V10 collection and KK VDRC library. We used a *w*^{1118} fly stock as the reference for all other strain.

Test of phenotype suppression in the wing:

To test the implication of candidate genes in *rbf1*-induced apoptosis and proliferation, the severity of the notched wing phenotype induced by *UAS-rbf1* overexpression led by *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. For each gene, we verified that the alteration of this gene expression level (overexpression, RNAi or mutant) did not induce any wing phenotype. *vg-Gal4>UAS-rbf1* Drosophila females were crossed with males bearing a loss-of function mutation for the different genes or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing



<u>Figure 4:</u> Cell proliferation induced in response to Rbf1-apoptosis requires Slipper and dTRAF1.

(A, C, E) anti-Ci staining used to visualize the anterior domain in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* or *en-Gal4/UAS-RNAi slipper ; UAS-rbf1/+* or *en-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-RNAi dtraf1* third instar larvae. A line indicates the antero-posterior frontier and the posterior compartment is on the left side.

(B, D, F) Visualization of mitotic cells by PH3 staining in wing pouch imaginal discs from the previously described genotypes.

(G, H) Comparison of proliferation percentage in posterior compartment between wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/ UAS-RNAi slipper ; UAS-rbf1/+* third instar larvae or between *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-RNAi dtraf1* third instar larvae. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Chi^2 test $\alpha<0.05$).

Each experiment presented in B, and H was independently performed three times.

margin. Wilcoxon tests were performed as previously described[33]. We considered the difference significant when $\alpha<10^{-3}$.
To test the implication of candidate genes in *rbf1*^{D253A}-induced proliferation, the number of flies presenting ectopic tissue in the wing was counted in different genetic backgrounds. Chi^2 tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha<5\%$.

Immunostaining and TUNEL staining of imaginal discs:

Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS-3.7% formaldehyde. Discs were labeled by incubation overnight at 4°C with anti-phospho-histone H3 (rabbit polyclonal antibody, 1/1000, 06-570, Millipore, Temecula, CA, USA) and anti β-Galactosidase (mouse monoclonal antibody, 1/200, 40-1a, DSHB, Iowa, USA) in PBT-FCS (PBS, 0,3% Triton, 10% Fetal Calf Serum). Incubation with fluorescently labeled Alexa 488, 568 and 647 secondary antibodies (1/500, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was carried in PBT-FCS for 2 h at room temperature. After washing in PBT, TUNEL staining was performed according to manufacturer's instructions (ApopTag Red in situ apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley, Marne-La-Vallée, France) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Wing discs were finally mounted in CitifluorTM (Biovalley) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope.
Quantification of TUNEL and PH3 staining was done in the wing pouch (for *rbf1*^{D253A} or heat shock experiments) or in the posterior compartment (for *rbf1* experiments) for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's t-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha<5\%$.

RNAs extraction and RT-qPCR.

Fifty wing imaginal discs per genotype were dissected on ice in serum-free Schneider medium. Total RNAs were extracted from each sample using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), by following the manufacturer's instructions. RT was performed on each sample using 4.8 mg of RNA incubated with random primer oligonucleotides (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with Recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR analysis was performed using the ABI Prism 7700 HT apparatus (Applied Biosystems, Life Technologies). Briefly, PCR was performed with the ABsolute blue QPCR SYBR Green ROX mix (Abgene, Thermo Fisher Scientific), using 11 ng of cDNA per RT. Data were normalized against rp49. Three independent RT experiments were performed and the S.E.M was calculated from these three independent samples.

Heat-shock protocol

Crosses were done at 18°C. Early third instar larvae were placed at 29°C during 10h and then returned to 18°C. Larvae were collected 5h after the end of the heat shock for immunostaining or larvae stay at 18°C to allow pupariation and adult wings were observed.

Acknowledgments

We are grateful to Sebastien Szuplewski, and Frédéric Canal for their critical readings of the manuscript. Confocal microscopy and qPCR experiments were performed on CYMAGES imaging facility and on the genomic platform respectively (University of Versailles/Saint-Quentin-en-Yvelines). Amandine Clavier and Adrienne Baillet were supported by the UVSQ and the EPHE.

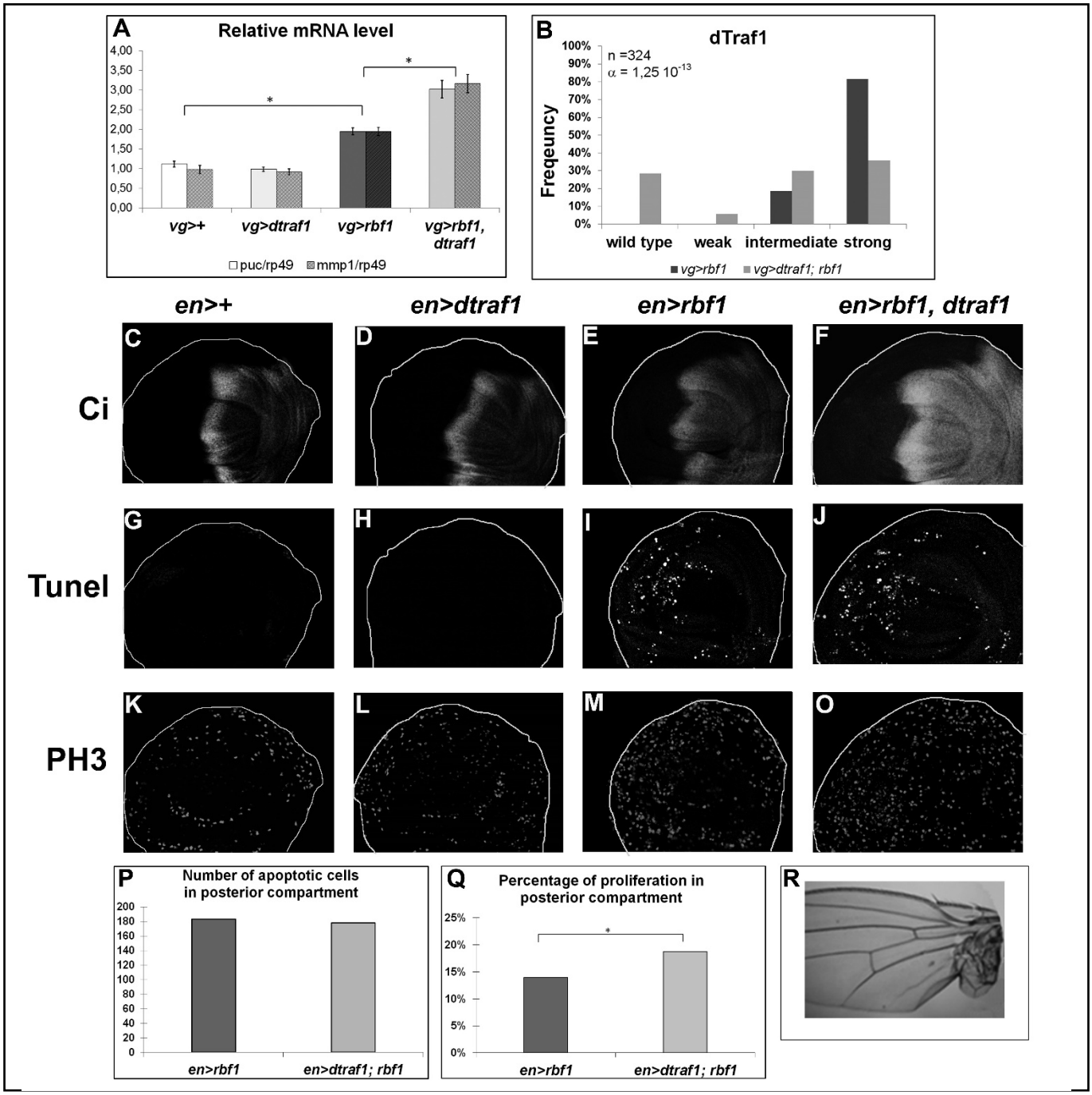


Figure 5: *dtraf1* overexpression does not affect Rbf1-induced apoptosis but increases the proliferation and the overgrowth phenotypes induced in response to Rbf1-

(A) *puc* and *mmp1* mRNA quantification by RT-qPCR in wing imaginal discs. Data are normalized against *rp49* and correspond to the mean of three independent experiments. Error bars are the S.E.M. Asterisks indicate statistical significant difference between two genotypes (Student's t-test, P<0,05). (B) Comparison of notch wing phenotypes distribution between *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-dtraf1* flies. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test: n=324, α=1,25 10^{-13}, Ws=-7,76 (C, D, E, F) Ci staining used to visualize the anterior domain in wing pouch imaginal discs from *en-Gal4/+; +/+ or en-Gal4/ UAS-dtraf1; +/+* or *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* or *en-Gal4/ UAS-dtraf1; UAS-rbf1/+* third instar larvae. A line indicates the antero-posterior frontier and the posterior compartment is on the left side. (G, H, I, J) Visualization of apoptotic cells by TUNEL staining in wing pouch imaginal discs from the previously described genotypes. (K, L, M, N) Visualization of mitotic cells by PH3 staining in wing pouch imaginal discs from the previously described genotypes. (0) Comparison of apoptotic cells numbers in posterior compartment of the wing pouch between imaginal discs from *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/ UAS-dtraf1; UAS-rbf1/+* third instar larvae. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test α<0.05). For each genotype, quantifications were done for at least 30 third instar larval wing imaginal discs. (P) Comparison of proliferation percentage in posterior compartment of the wing pouch between imaginal discs from *en-Gal4/+; UAS-rbf1/+* and *en-Gal4/ UAS-dtraf1 ; UAS-rbf1/+* third instar larvae. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Chi^2 test α<0.05). (R) Overgrowth wing phenotype observed in some fly co-expressing *rbf1* and *dtraf1*. Each experiment presented in B and P was independently performed three times

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002, **2**(2)**:** 103-112.

2. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 2005, **24**(17)**:** 2796-2809.

3. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W*, et al.* Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(12)**:** 5436-5440.

4. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I*, et al.* Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 2009, **15**(3)**:** 184-194.

5. Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, Ianari A*, et al.* The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes & development* 2013, **27**(9)**:** 1003-1015.

6. Tsai KY, Hu Y, Macleod KF, Crowley D, Yamasaki L, Jacks T. Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 1998, **2**(3)**:** 293-304.

7. Sharma A, Comstock CE, Knudsen ES, Cao KH, Hess-Wilson JK, Morey LM*, et al.* Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells. *Cancer research* 2007, **67**(13)**:** 6192-6203.

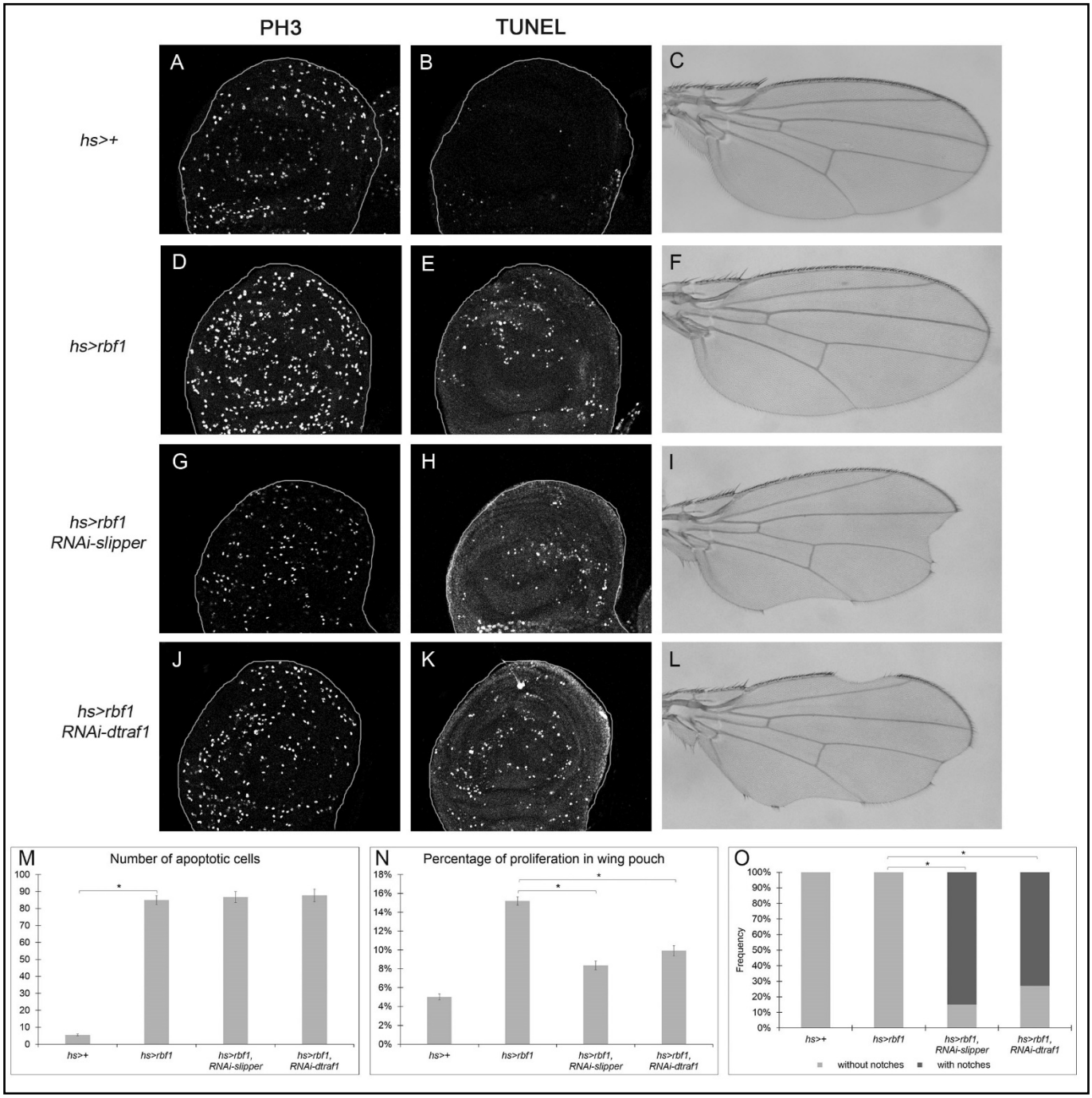
8. Huh MS, Parker MH, Scime A, Parks R, Rudnicki MA. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J Cell Biol* 2004, **166**(6)**:** 865-876.

9. Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I. The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010, **9**(1)**:** 97-103.

10. Milet C, Rincheval-Arnold A, Morieras A, Clavier A, Garrigue A, Mignotte B*, et al.* Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis. *PLoS One* 2014, **9**(8)**:** e102902.

11. Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling. *Apoptosis* 2009, **14**(8)**:** 1021-1028.

12. Biteau B, Karpac J, Hwangbo D, Jasper H. Regulation of Drosophila lifespan by JNK signaling. *Exp Gerontol* 2011, **46**(5)**:** 349-354.



<u>Figure 6:</u> Rbf1-induced apoptosis activates a compensatory proliferation mechanism that depends on *slipper* and *dtraf1.*

(A, D, G, J) PH3 staining used to visualize the mitotic cells in wing pouch imaginal discs from *hs-Gal4/+ or hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* or *hs-Gal4/UAS-RNAi slipper; UAS-rbf1/+* or *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-RNAi dtraf1* third instar larvae.

(B, E, H, K) Visualization of apoptosis cells by TUNEL staining in the wing pouch of imaginal discs from the previously described genotypes.

(C, F, I, L) Wing phenotypes observed in some fly from *hs-Gal4/+ or hs-Gal4/+; UAS-rbf1/+* or *hs-Gal4/UAS-RNAi slipper; UAS-rbf1/+* or *hs-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-RNAi dtraf1* genotypes

(M) Comparison of apoptotic cells numbers in the wing pouch of imaginal discs from the previously described genotypes. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test $\alpha<0.05$). For each genotype, quantifications were done for 30 third instar larval wing imaginal discs at least.

(N) Comparison of proliferation percentage in posterior compartment from the genotypes described previously. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Chi^2 test $\alpha<0.05$).

(0) Frequencies of notches phenotypes observed in genotypes flies described previously. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Chi^2 test $\alpha<0.05$).

Each experiment presented in N and 0 was independently performed three times

13. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008, **27**(48)**:** 6245-6251.

14. Clavier A, Baillet A, Rincheval-Arnold A, Coleno-Costes A, Lasbleiz C, Mignotte B*, et al.* The pro-apoptotic activity of Drosophila Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA. *Cell Death Dis* 2014, **5:** e1405.

15. Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM*, et al.* puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. *Genes Dev* 1998, **12**(4)**:** 557-570.

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

17. Marchal C, Vinatier G, Sanial M, Plessis A, Pret AM, Limbourg-Bouchon B*, et al.* The HIV-1 Vpu protein induces apoptosis in Drosophila via activation of JNK signaling. *PLoS One* 2012, **7**(3)**:** e34310.

18. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 2004, **7**(4)**:** 491-501.

19. Bergantinos C, Corominas M, Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* 2010, **137**(7)**:** 1169-1179.

20. Fan Y, Wang S, Hernandez J, Yenigun VB, Hertlein G, Fogarty CE*, et al.* Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in Drosophila. *PLoS Genet* 2014, **10**(1)**:** e1004131.

21. Herrera SC, Martin R, Morata G. Tissue homeostasis in the wing disc of Drosophila melanogaster: immediate response to massive damage during development. *PLoS genetics* 2013, **9**(4)**:** e1003446.

22. Stronach B, Lennox AL, Garlena RA. Domain specificity of MAP3K family members, MLK and Tak1, for JNK signaling in Drosophila. *Genetics* 2014, **197**(2)**:** 497-513.

23. Geuking P, Narasimamurthy R, Basler K. A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of Drosophila TAB2 as a functionally conserved component. *Genetics* 2005, **171**(4)**:** 1683-1694.

24. Andersen DS, Colombani J, Palmerini V, Chakrabandhu K, Boone E, Rothlisberger M*, et al.* The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* 2015.

25. Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H*, et al.* Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9)**:** 705-710.

26. Kanda H, Miura M. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* 2004, **136**(1)**:** 1-6.

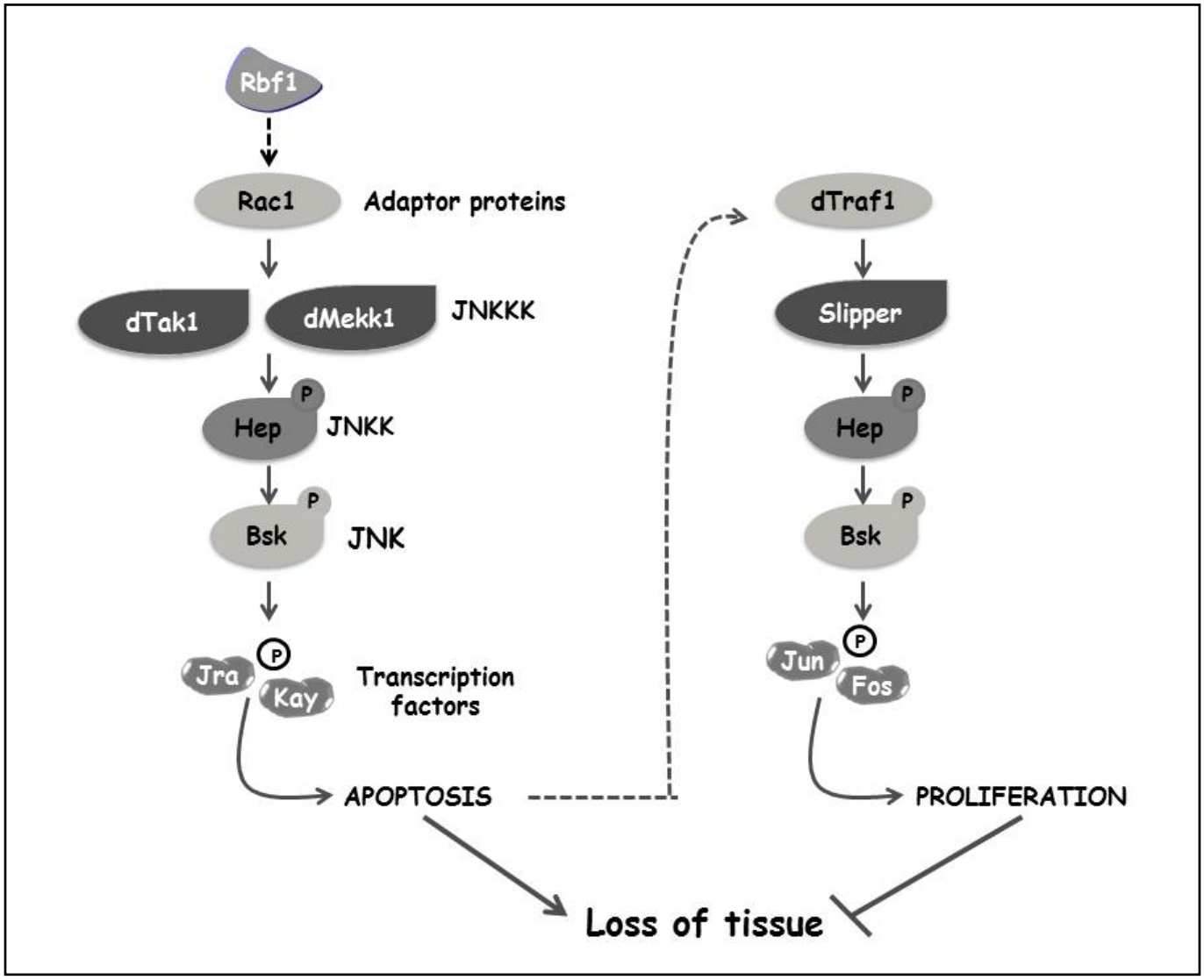


Figure 7: Two specific JNK activation pathways are involved in apoptosis and compensatory proliferation induced in response to Rbf1.

27. Son Y, Kim S, Chung HT, Pae HO. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol* 2013, **528:** 27-48.

28. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* 2006, **13**(5)**:** 730-737.

29. Zhou S, Yu D, Ning S, Zhang H, Jiang L, He L*, et al.* Augmented Rac1 Expression and Activity are Associated with Oxidative Stress and Decline of beta Cell Function in Obesity. *Cell Physiol Biochem* 2015, **35**(6)**:** 2135-2148.

30. Sun G, Irvine KD. Ajuba family proteins link JNK to Hippo signaling. *Sci Signal* 2013, **6**(292)**:** ra81.

31. Wu M, Pastor-Pareja JC, Xu T. Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* 2010, **463**(7280)**:** 545-548.

32. Simon R, Aparicio R, Housden BE, Bray S, Busturia A. Drosophila p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. *Apoptosis* 2014, **19**(10)**:** 1430-1443.

33. Brun S, Rincheval V, Gaumer S, Mignotte B, Guenal I. reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila. *Oncogene* 2002, **21**(42)**:** 6458-6470.

Discussion

De manière générale, il est admis que les gènes appelés « gènes suppresseur de tumeur » régulent négativement la progression dans le cycle cellulaire et positivement l'induction d'apoptose. L'inactivation de tels gènes est une étape préalable au développement de nombreux cancers. Le gène *rb* est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié dans des cellules humaines. De façon cohérente avec son rôle de suppresseur de tumeur, pRb inhibe la prolifération cellulaire en contrôlant la transition G1/S du cycle cellulaire. Son rôle dans le contrôle de l'apoptose est moins bien décrit et semble plus complexe. En effet, en fonction du contexte cellulaire, pRb peut avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques.

Des études menées au laboratoire sur *rbf1* ont permis de mettre en évidence que le rôle de *rbf1* vis-à-vis de l'apoptose dépend du statut prolifératif de la cellule. En effet, la surexpression de *rbf1*, grâce au système UAS/Gal4, dans un tissu en prolifération induit de l'apoptose, ce qui n'est pas observé dans un tissu post-mitotique (Milet *et al.*, 2010). Un rôle pro-apoptotique de pRb dans des cellules en prolifération a également été mis en évidence suite à un stress oncogénique ou génotoxique dans des cellules cancéreuses humaines et *in vivo* au sein de l'épithélium intestinal de souris (Ianari *et al.*, 2009). La capacité de pRb d'induire un processus de mort cellulaire dans des cellules en prolifération semble donc être conservée entre différentes espèces.

La protéine pRb étant fonctionnellement inactive dans la majorité des cancers humains, il apparait important de mieux comprendre les bases moléculaires de l'apoptose induite par pRb pour, à plus long terme, dans un but thérapeutique, envisager de restaurer cette mort cellulaire dans des cellules déficientes pour *rb*. Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont contribué à caractériser les événements moléculaires de l'apoptose induite par Rbf1 dans un tissu prolifératif, à savoir le disque imaginal d'aile.

I. Importance de l'activité transcriptionnelle de Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique

pRb et Rbf1 fonctionnent comme des régulateurs transcriptionnels dans de nombreux processus cellulaires. Ils ont la capacité de réguler différents facteurs chromatiniens ce qui leur permet de moduler l'expression d'un grand nombre de gènes cibles ayant des fonctions variées. Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de montrer l'importance de l'activité transcriptionnelle de Rbf1 dans sa fonction pro-apoptotique en mettant notamment en avant un rôle de dE2F2 et du complexe dREAM dans la régulation transcriptionnelle des gènes *how* et *buffy*.

A. Quels sont les partenaires chromatiniens de Rbf1 impliqués dans sa fonction pro-apoptotique ?

1. Le rôle des facteurs dE2Fs et du complexe dREAM dans le contrôle de l'apoptose dépend du contexte cellulaire

Les partenaires physiques les mieux caractérisés de Rbf1 sont les facteurs de transcription de la famille E2F. Chez la drosophile, cette famille comprend deux membres : dE2F1 (Dynlacht *et al.*, 1994; Ohtani and Nevins, 1994) et dE2F2 (Sawado *et al.*, 1998). Ces deux protéines ont un cofacteur commun appelé dDP (Dynlacht *et al.*, 1994). Nous avons pu mettre en évidence, principalement par l'intermédiaire de tests d'interaction génétique, que dE2F2 et dDP sont requis pour l'apoptose induite par Rbf1 alors que dE2F1 s'oppose à cette mort cellulaire. Ces résultats peuvent, aux premiers abords, paraitre surprenants. Jusqu'à présent dE2F1 était principalement décrit comme un facteur pro-apoptotique alors que dE2F2 était considéré comme un gène anti-apoptotique.

En effet, l'expression ectopique de dE2F1 induit de l'apoptose dans différents contextes cellulaires et différents gènes pro-apoptotiques sont activés transcriptionnellement par dE2F1 (Asano *et al.*, 1996; Du *et al.*, 1996b; Moon *et al.*, 2005; Neufeld *et al.*, 1998; Zhou and Steller, 2003). De plus, en réponse à l'irradiation, dE2F1 favorise l'apoptose des cellules au sein des disques imaginaux d'aile alors que dE2F2 inhibe cette mort cellulaire (Wichmann *et al.*, 2010). Ces données ont conduit à penser que les facteurs dE2Fs assuraient des fonctions opposées dans le contrôle de l'apoptose, dE2F1 et dE2F2 étant respectivement pro-apoptotique et anti-apoptotique.

En réalité, le rôle de dE2F1 vis-à-vis de l'apoptose semble fortement dépendre du contexte cellulaire. Au sein d'un même tissu (le disque imaginal d'aile), en réponse à l'irradiation, dE2F1 favorise la mort des cellules situées, au stade adulte, entre les veines alors qu'il protège celles situées au niveau de la frontière dorso-ventrale de cette mort cellulaire (Moon *et al.*, 2005). Des données récentes indiquent, en outre, que dE2F2 est requis pour la mort de cellules appartenant au système nerveux périphérique situées à la marge de l'aile (Rovani *et al.*, 2012). Ces données sont en accord avec nos résultats indiquant un rôle pro-apoptotique possible pour dE2F2 dans certains contextes cellulaires. De même, des résultats obtenus au laboratoire indiquent que le rôle de Rbf1 varie en fonction du contexte. Ces données associées à celles montrant que le rôle de Rbf1 vis-à-vis de l'apoptose varie selon le statut des cellules vis-à-vis de la prolifération (Milet *et al.*, 2010), nous permettent de dire que l'effet de Rbf1, dE2F1 et dE2F2 dans le contrôle de l'apoptose varie fortement en fonction du contexte cellulaire.

Le complexe dREAM semble également assurer des fonctions variables dans le contrôle de l'apoptose. Ainsi, sa fonction pro- ou anti-apoptotique peut être corrélée à l'état prolifératif des cellules. Nos résultats indiquent que le complexe dREAM est requis pour l'apoptose induite par Rbf1 dans le disque imaginal d'aile. Ainsi, le complexe dREAM assure une fonction pro-apoptotique dans un tissu en prolifération. A l'inverse, la perte de fonction de *lin52,* un membre du complexe dREAM, ou de *rbf1* dans les cellules en postérieur du sillon morphogénétique dans le disque imaginal d'œil induit de l'apoptose (Bhaskar *et al.*, 2014; Tanaka-Matakatsu *et*

al., 2009) ce qui suggère une fonction anti-apoptotique du complexe dREAM dans des cellules post-mitotiques. L'apoptose observée suite à la perte de fonction de ces gènes est due à une dérépression de la transcription du gène pro-apoptotique *hid* (Bhaskar *et al.*, 2014; Tanaka-Matakatsu *et al.*, 2009).

Ce rôle double des membres des familles Rb et E2F vis-à-vis de l'apoptose est conservé chez les mammifères : les protéines pRb et E2Fs peuvent stimuler l'apoptose ou au contraire protéger les cellules de la mort cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si des modifications post-traductionnelles de ces protéines peuvent expliquer leurs propriétés pro- ou anti-apoptotiques. Cette hypothèse est soutenue par le fait que pRb et Rbf1 sont ubiquitinés (Munro *et al.*, 2012; Raj *et al.*, 2012b) et que cette ubiquitination a un impact important sur la fonction de régulateur de la transcription de Rbf1 (Raj *et al.*, 2012b; Zhang *et al.*, 2014) donc potentiellement sur sa capacité à induire la mort cellulaire.

De plus, pRb est sujet à des clivages post-traductionnels par les caspases. Ces clivages modulent le rôle de pRb dans le contrôle de l'apoptose (Janicke *et al.*, 1996; Le Floch *et al.*, 2010; Lemaire *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 1997). De façon intéressante, des données obtenues au laboratoire suggèrent que Rbf1 est également clivé *in vivo* (*cf.* article en annexe, (Milet *et al.*, 2014)). La surexpression de $rbf1^{D253A}$, une forme de Rbf1 mutée au niveau d'un site putatif de clivage par les caspases, dans un tissu en prolifération induit de l'apoptose comme dans le cas de l'expression de la forme sauvage de *rbf1*. Mais les drosophiles surexprimant cette forme mutante présentent un phénotype d'excès de tissu allaire (Milet *et al.*, 2014). Ces données suggèrent que ce site de clivage putatif de Rbf1 reconnu par une caspase pourrait être impliqué dans la modulation des propriétés de Rbf1 vis-à-vis du contrôle de l'homéostasie tissulaire. A la vue de ces différentes données, il est tout à fait possible que des modifications post-traductionnelles survenant uniquement dans certains contextes cellulaires ou en réponse à un stress particulier orientent les protéines Rb et E2F vers un rôle pro-apoptotique ou au contraire anti-apoptotique.

2. Implication du complexe dREAM dans la fonction de régulateur transcriptionnel de Rbf1 : une histoire compliquée

a) Diversité de la régulation transcriptionnelle assurée par le complexe dREAM

Nous avons pu mettre en évidence que le complexe dREAM est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *how* et *buffy* par Rbf1. Des données de la littérature sont en accord avec ce résultat. En effet, l'inactivation des différents membres du complexe dREAM en cellules de drosophile en culture conduit à une variation du niveau d'expression de *how* et *buffy* (Georlette *et al.*, 2007). Il est important de rappeler que le rôle du complexe dREAM dans une fonction biologique particulière résulte de l'intégration du rôle propre de chaque sous-unité du complexe. De façon intéressante, comme nous avons pu le montrer *in vivo*, l'implication des différents composants du complexe dREAM dans la régulation transcriptionnelle de *how* et *buffy* n'est pas équivalente. En effet, dE2F2, Mip120 et Mip130 sont requis pour la répression transcriptionnelle de *buffy* induite

par Rbf1 alors que dMyb s'oppose à cet effet. De plus, le rôle propre de chaque protéine du complexe dREAM varie selon le gène cible considéré : alors que dE2F2 joue un rôle répresseur concernant la régulation de l'expression de *buffy*, il est converti en un activateur concernant la régulation de l'expression de *how*. Par ailleurs, Mip120 et Mip130 sont requis pour la répression de *buffy* induite par Rbf1 alors qu'ils ne semblent pas impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *how*. Nos données complètent donc les résultats d'une étude menée à large échelle par l'équipe de Michael Botchan à partir de cellules de drosophile en culture (Georlette *et al.*, 2007). Cette étude avait pour but d'identifier des réseaux de gènes régulés par le complexe dREAM. Pour cela, ils ont éteint l'expression des différents membres du complexe dREAM par ARNi et étudié l'effet par microarray sur l'expression génique. Ils ont également caractérisé la localisation génomique des différents membres du complexe par immunoprécipitation de chromatine. Cette étude révèle qu'une combinaison extrêmement variable de sous-unités du complexe dREAM est impliquée dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles du complexe et que le rôle propre de chaque sous-unité varie d'une cible à l'autre. Néanmoins, la composition du complexe semble être constante : les régions promotrices des différents gènes cibles sont liées par l'ensemble des membres du complexe dREAM.

b) Rôle antagoniste de dE2F2 et dMyb

Nos données étayent également un autre aspect du fonctionnement du complexe dREAM à savoir que les facteurs dE2F2 et dMyb assurent des fonctions opposées. En effet, nous avons pu mettre en évidence que dE2F2 est requis pour la répression transcriptionnelle de *buffy* induite par Rbf1 alors que dMyb s'oppose à cette inhibition. A l'inverse, dE2F2 stimule l'expression de *how* en réponse à Rbf1 alors que dMyb joue un rôle négatif dans la régulation de l'expression de ce gène. Ce rôle antagoniste de dE2F2 et dMyb concernant la régulation de l'expression génique est en accord avec les conclusions d'une étude transcriptomique citée ci-dessus indiquant qu'il n'y a pas de chevauchement entre la liste de gènes régulés négativement pas dMyb et celle des gènes réprimés par dE2F2 (Georlette *et al.*, 2007). Par contre, d'après cette étude, il existe de nombreux exemples de gènes qui sont régulés positivement par dMyb et négativement par dE2F2. Ces données transcriptomiques ont conduit à penser que dMyb et dE2F2 ont des fonctions antagonistes au sein du complexe dREAM. Toutefois, il a été récemment mis en évidence que cette règle n'est pas immuable. En effet, la perte de fonction de *dmyb* conduit à la survie de certains neurones du système nerveux périphérique situés au niveau de la marge postérieure de l'aile (Rovani *et al.*, 2012). dMyb assure donc une fonction pro-apoptotique concernant la mort développementale de ces cellules neuronales. De façon intéressante, ce phénotype de survie neuronale observé en contexte perte de fonction de *dmyb* est fortement aggravé dans un contexte double mutant pour *dmyb* et *de2f2* (Rovani *et al.*, 2012). Ces données indiquent que dE2F2 et dMyb coopèrent *in vivo* pour assurer la mort de certains précurseurs neuronaux allaires. Il semble donc que dE2F2 et dMyb puissent coopérer ou assurer des rôles opposés concernant la régulation des processus apoptotiques. Les conditions et les facteurs qui influencent leur rôle restent à identifier.

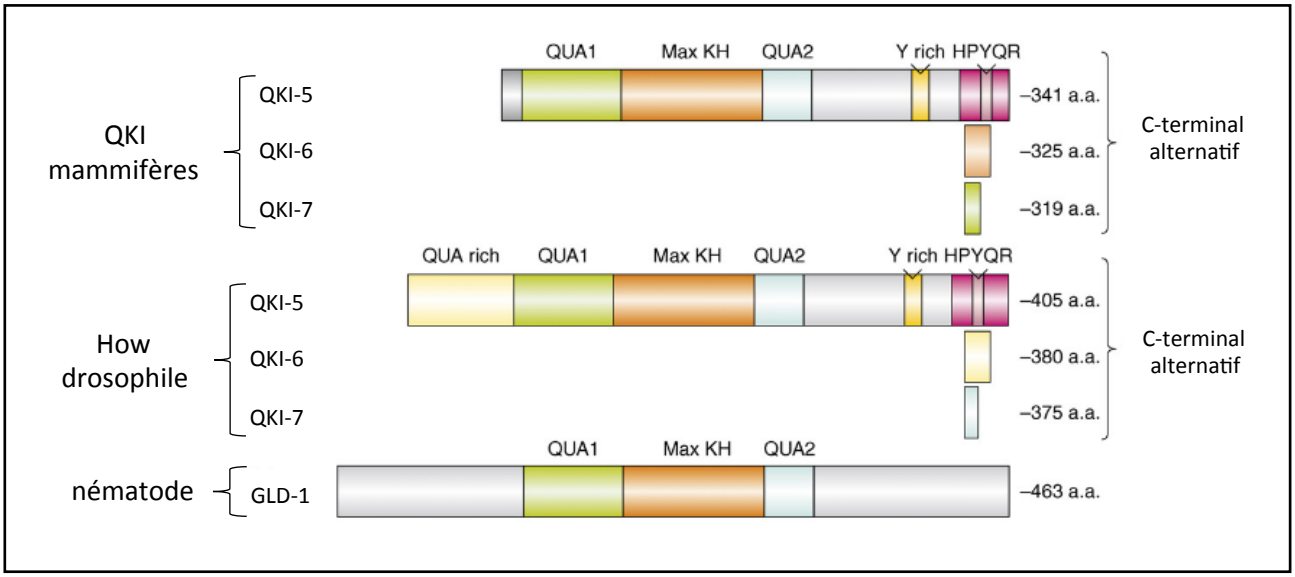
c) Un rôle méconnu d'activation de la transcription pour Rbf1 et le complexe dREAM

Nos données indiquent un rôle d'activateur transcriptionnel de Rbf1 et dE2F2 concernant la régulation de l'expression du gène *how*. Ce rôle positif de Rbf1 et dE2F2 concernant le contrôle de l'expression génique peut paraitre surprenant. En effet, les premières études concernant Rbf1, dE2F2 et le complexe dREAM attribuaient uniquement un rôle de répresseur transcriptionnel à ces protéines (Korenjak *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2004; Sawado *et al.*, 1998). Toutefois, ces protéines peuvent également stimuler la transcription *via* une action directe au niveau de la région promotrice de certains gènes cibles (Georlette *et al.*, 2007). Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette activation transcriptionnelle reste à ce jour inconnu.

Chez les mammifères, pRb peut également assurer un rôle d'activateur transcriptionnel dans certains contextes particuliers, notamment au cours de la différenciation cellulaire (Chen *et al.*, 1996c; Chen *et al.*, 1996d; Gu *et al.*, 1993; Ianari *et al.*, 2009; Novitch *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001). Toutefois, le rôle d'activateur de pRb ne serait pas forcément direct. En effet, des données suggèrent que pRb ne stimulerait pas directement la transcription mais bloquerait l'action d'un facteur répresseur en interagissant physiquement avec lui (Chinnam and Goodrich, 2011). Par exemple, pRb peut lier et bloquer l'activité d'EID-1 (MacLellan *et al.*, 2000; Miyake *et al.*, 2000b). Cette protéine lie et inhibe l'activité de l'histone acétylase p300 qui stimule la transcription en agissant comme cofacteur de différents facteurs de transcription dont MyoD. Lorsqu'il est lié à pRb, EID-1 est adressé au protéasome. Ainsi pRb en inhibant l'action de l'inhibiteur d'un coactivateur stimule indirectement la transcription.

Il est également envisager que pRb puisse activer la transcription en modifiant la structure de la chromatine. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la protéine pRb est capable de déplacer RBP2 de certains promoteurs comme celui de l'*ostéocalcine* (Chinnam and Goodrich, 2011). Or RBP2 est une histone déméthylase spécifique de la di- et de la tri-méthylation de H3K4, la triméthylation de H3K4 étant une marque permissive pour la transcription (Christensen *et al.*, 2007). Le retrait de RBP2 de certaines régions promotrices en réponse à pRb permettrait donc une activation de la transcription. Par conséquent, il existe certains exemples détaillant le mécanisme moléculaire d'une activation transcriptionnelle impliquant pRb mais on ne dispose pas aujourd'hui d'une vue détaillé de cette fonction de pRb.

De façon intéressante, l'équipe de David Arnosti a mis en évidence, chez la drosophile, un enrichissement du motif DRE (DNA Replication-related Element) au niveau des promoteurs des gènes cibles des facteurs dE2Fs et particulièrement au niveau des gènes cibles ayant une fonction dans l'apoptose (Acharya *et al.*, 2012). Ce motif permet le recrutement du facteur de transcription DREF (DNA Replication-related Element-binding Factor). Ce facteur stimule la transcription d'un grand nombre de gènes et des fonctions pro-apoptotiques de DREF ont été mise en évidence (Hirose *et al.*, 2001; Vo *et al.*, 2014; Yanai *et al.*, 2014). Comme *rbf1*, la surexpression de *dref* au sein du disque imaginal d'aile induit de l'apoptose à l'origine d'une perte de tissu au stade adulte (Milet *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2001). A la vue de ces données, on pourrait envisager que la capacité de Rbf1 d'activer la transcription implique DREF notamment dans le cas de son rôle



<u>Figure n°65</u> : Similarité structurale entre les protéines QKI, How et GLD-1

Le domaine KH (K-homology en orange) et les deux domaines adjacents QUA1 et QUA2 sont conservés entre les trois protéines de la famille STAR présentées ici. De plus, QKI de mammifères et How de drosophile possèdent un profil d'épissage similaire (trois isoformes). Les isoformes longues (QKI-5 et How(L)) partagent un domaine HPYQR conservé et un domaine riche en tyrosine (Y rich) qui peut être régulé par phosphorylation

Adapté de Volk *et al.,* 2008

pro-apoptotique. Il serait intéressant de réaliser des tests d'interaction génétique afin de tester si DREF est requis pour l'apoptose induite par Rbf1 dans un tissu prolifératif.

B. Quels sont les gènes cibles de Rbf1 importants pour l'induction d'apoptose ?

1. Implication de *how* dans les processus de mort cellulaire

Nos données indiquent que la protéine de liaison aux ARNm How est requise pour l'apoptose induite par Rbf1 dans les disques imaginaux d'aile. De plus nous avons pu mettre en évidence que cette fonction pro-apoptotique de How implique une régulation négative du niveau de transcrits du gène anti-apoptotique *diap1* et que cette régulation nécessite la région 3'UTR des ARNm *diap1*. Par conséquent, bien que How ne soit pas considéré comme un facteur clé de la machinerie apoptotique chez la drosophile, il semble jouer un rôle crucial dans la capacité de Rbf1 d'induire la mort cellulaire. Il existe au moins deux autres exemples dans la littérature où How assure une telle fonction pro-apoptotique. En effet, l'équipe de Talila Volk a pu mettre en évidence que l'isoforme longue de How lie la région 3'UTR des ARNm *diap1* ce qui conduit à la dégradation de ces transcrits. Cette inhibition de *diap1* par How(L) est requise pour la mort développementale des cellules de la ligne médiane au cours du développement embryonnaire. How(L) a également un effet pro-apoptotique dans les cellules de l'œil chez la drosophile (Reuveny *et al.*, 2009). Il serait intéressant de déterminer si en dehors de *diap1*, How(L) possède d'autres transcrits cibles impliqués dans sa fonction d'inducteur de mort cellulaire.

Il est important de noter que cette fonction pro-apoptotique de How est conservée chez les mammifères. *quaking* (*QKI*) est l'homologue de *how* chez les mammifères. Ce gène code pour au moins 5 isoformes dont QKI-5, QKI-6 et QKI-7 qui diffèrent les unes des autres au niveau de leur région C-terminale (**Figure 65**) (Volk *et al.*, 2008). QKI-7 est la seule des isoformes capables d'induire de l'apoptose (Chen and Richard, 1998; Pilotte *et al.*, 2001). Il a notamment été mis en évidence que QKI-7 induit de l'apoptose dans des fibroblastes et des oligodendrocytes de rat (Pilotte *et al.*, 2001). On ne connait pas encore les bases moléculaires de cette fonction pro-apoptotique mais la portion C-terminale de QKI-7 est requise pour l'induction de la mort cellulaire. De façon intéressante, il semble que le ratio entre les différentes isoformes de QKI influence le destin cellulaire. En effet, les isoformes QKI-6 et QKI-5 ont une fonction anti-apoptotique, elles sont capables de neutraliser QKI-7 en s'hétérodimérisant avec elle (Pilotte *et al.*, 2001). A l'inverse, GLD-1 (defective in germline development 1), homologue de How chez *C. elegans*, assure une fonction anti-apoptotique en régulant négativement *cep1* (homologue de *p53*) (Schumacher *et al.*, 2005).

Par conséquent, les protéines de liaison à l'ARN de la famille STAR semblent réguler les phénomènes d'apoptose dans différentes espèces. L'effet pro- ou anti-apoptotique dépendrait, d'une part de l'isoforme considérée, et d'autre part de l'espèce d'intérêt.

2. Importance de la régulation transcriptionnelle de *how* par Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique

Nous avons pu mettre en évidence que Rbf1 et dE2F2 déclenchent l'apoptose en régulant positivement l'expression du gène *how*. Toutefois, cette régulation ne semble pas essentielle pour maintenir le niveau basal d'expression de ce gène puisque l'expression d'ARNi dirigés contre *rbf1* ou *de2f3* ne module pas les quantités d'ARNm de *how*. On ne peut néanmoins pas exclure qu'une telle régulation survienne en réponse à certains types de stress cellulaires ou suite à divers traitements thérapeutiques.

Chez les mammifères, pRb assure un rôle pro-apoptotique en réponse à un stress génotoxique. Plus précisément, suite à un traitement à la doxorubicine (agent induisant des dommages à l'ADN) de cellules de glioblastomes ou d'ostéosarcome en culture, pRb coopère avec E2F1 pour induire la transcription de gènes pro-apoptotiques et donc la mort des cellules (Ianari *et al.*, 2009). Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer si la régulation positive de *how* par Rbf1 au cours d'un processus de mort cellulaire est conservée chez les mammifères. En effet, Frédéric Canal en post-doctorat au laboratoire est en train de tester si pRb régule l'expression de *qki* en réponse à la doxorubicine dans des cellules d'ostéosarcome en culture et les premiers résultats sont encourageants. Si ces résultats se confirment, les travaux menés chez la drosophile auront permis d'éclaircir le rôle pro-apoptotique de pRb dans des cellules humaines et donc d'avancer dans la compréhension de sa fonction de suppresseur de tumeur.

3. Implication de *buffy* dans les processus de mort cellulaire

A l'heure actuelle le rôle de *buffy* dans le contrôle de l'apoptose n'est pas encore totalement compris. Buffy joue un rôle double dans la régulation de la mort cellulaire, il peut assurer des fonctions pro- ou anti-apoptotiques en fonction du tissu considéré et du type de mort cellulaire étudié (Doumanis *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2003; Senoo-Matsuda *et al.*, 2005; Sevrioukov *et al.*, 2007; Tanner *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010; Yacobi-Sharon *et al.*, 2013). Buffy ne semble pas jouer un rôle majeur dans la mort cellulaire développementale mais il serait requis pour moduler l'apoptose induite par un stress tel que l'irradiation (Sevrioukov *et al.*, 2007). Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, une régulation transcriptionnelle de *buffy* au cours du développement. En effet, la perte de fonction de *rbf1* conduit à une augmentation de la transcription de *buffy* ce qui indique que Rbf1 est requis pour maintenir un faible niveau d'expression de *buffy* au cours du développement dans le disque imaginal d'aile. Cette répression transcriptionnelle pourrait participer à la sensibilité des cellules en prolifération, notamment des cellules du disque imaginal d'aile, à la mort induite par différents stress. Il serait donc intéressant de déterminer si Rbf1 régule l'expression de *buffy* en réponse à l'irradiation étant donné le rôle de Buffy dans la réponse à ce type de stress cellulaire (Sevrioukov *et al.*, 2007).

Toutefois, il est important de garder à l'esprit que la diminution du niveau d'expression de *buffy* sensibilise les cellules à la mort cellulaire mais n'est pas suffisante pour induire de l'apoptose. L'expression d'un

ARNi dirigé contre *buffy* n'induit pas de phénotype d'aile et les mouches homozygotes pour une mutation amorphe de *buffy* sont viables et ne présentent pas de phénotype visible correspondant à un excès de mort cellulaire (Sevrioukov *et al.*, 2007). En cela, Buffy est très différent de Diap1. En effet, la perte de fonction de *diap1* conduit massivement à de l'apoptose (Goyal *et al.*, 2000; Leulier *et al.*, 2006; Lisi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999; Yin and Thummel, 2004). De plus, Diap1 ayant une durée de vie extrêmement courte (environ 30 minutes) (Holley *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2002), une diminution post-transcriptionnelle du niveau de *diap1* va avoir un impact rapide dans la cellule sur le niveau protéique de ce facteur anti-apoptotique. Ainsi, l'activation transcriptionnelle de *how* par Rbf1 conduit à une diminution du niveau d'ARNm *diap1* ce qui aboutit rapidement à une réduction du niveau protéique de Diap1 et donc à une levée de l'inhibition des caspases.

A la vue de ces données, on peut penser que l'activation de *how* joue un rôle plus important, que la répression de *buffy,* dans l'induction de la mort cellulaire en réponse à la surexpression de *rbf1*. Néanmoins, Debcl et la voie mitochondriale (en aval de *buffy*) tiennent une place importante dans la mort cellulaire induite par Rbf1. En effet, la perte de fonction de *debcl* sauve fortement de l'apoptose induite par Rbf1. Par ailleurs, des boucles de rétrocontrôles positives peuvent exister entre la voie mitochondriale en aval de *buffy* et la voie dépendante d'une inactivation de Diap1. En effet, au cours de l'apoptose induite par Rbf1, la voie mitochondriale aboutit à une activation de la voie de signalisation JNK. Or l'activation de cette voie peut conduire à une activation de la transcription de *rpr* qui code pour un inhibiteur de Diap1. Ainsi la répression transcriptionnelle de *buffy* en activant la voie mitochondriale puis la voie JNK pourrait aboutir indirectement à une inhibition de Diap1 par Rpr. Donc bien que la perte de fonction de *buffy* ne constitue pas un évènement suffisant pour induire la mort cellulaire, la voie de mort mitochondriale semble avoir une place importante dans la mort induite par Rbf1.

4. Importance de la régulation transcriptionnelle de *buffy* par Rbf1 pour sa fonction pro-apoptotique

Nous avons pu montrer que, chez la drosophile, Rbf1 réprime directement la transcription de *buffy* au cours du développement. Chez *C. elegans*, Lin-35 (homologue de pRb) favorise l'apoptose des cellules germinales en réprimant l'expression de *ced-9* (un homologue du facteur anti-apoptotique Bcl-2) (Schertel and Conradt, 2007). Par ailleurs, pRb et E2F1 régulent directement l'expression des gènes *bcl-2*, *noxa*, *bim* et *puma* appartenant à la famille Bcl-2 (Bertin-Ciftci *et al.*, 2013; Engelmann and Putzer, 2010; Hao *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005). La régulation transcriptionnelle des gènes de la famille Bcl-2 par les protéines Rb est donc conservée au cours de l'évolution. Cette conservation suggère un rôle important de cette régulation pour les fonctions biologiques de pRb. La régulation transcriptionnelle des gènes de la famille Bcl-2 par pRb pourrait, au moins en partie, expliquer son rôle dans le contrôle de la mort cellulaire et donc indirectement son rôle de suppresseur de tumeurs.

II. Place de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1

Un nombre croissant de données dans la littérature indiquent un rôle de la mitochondrie, d'une part, dans le déclenchement de la mort cellulaire chez la drosophile (Abdelwahid *et al.*, 2011) et d'autre part, dans le contrôle de l'apoptose assurée par les protéines des familles Rb et E2F (Boland *et al.*, 2013b) que ce soit chez la drosophile ou chez les mammifères. Les travaux que nous avons réalisés viennent soutenir ces deux idées.

A. Lien entre voie Rb/E2F, mitochondrie et apoptose

1. Les facteurs dE2Fs régulent la fonction mitochondriale chez la drosophile

Nos données indiquent l'existence d'une voie mitochondriale en aval de Rbf1 déclenchée suite à la répression transcriptionnelle de *buffy*. Plusieurs études récentes indiquent des liens étroits entre E2F/Rb, le fonctionnement de la mitochondrie et le contrôle de l'apoptose à la fois chez la drosophile et chez les mammifères. Par exemple, une étude réalisée en 2013 par l'équipe de Maxim Frolov indique que les facteurs dE2Fs régulent l'expression de gènes codant pour des protéines ayant une fonction mitochondriale (Ambrus *et al.*, 2013; Minton, 2014). De façon intéressante, cette régulation semble importante pour le rôle des facteurs dE2Fs dans le contrôle de l'apoptose. Les cellules du disque imaginal d'œil mutantes pour *ddp* sont résistantes à l'apoptose induite par irradiation (Ambrus *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2005). Pendant longtemps, on a considéré que cette résistance était due à un défaut d'induction du programme transcriptionnel d'apoptose du fait d'une incapacité de dE2F1 de lier l'ADN et d'activer la transcription en absence de dDP. En réalité, les gènes pro-apoptotiques sont correctement activés après irradiation dans les cellules *ddp* mutantes (Ambrus *et al.*, 2013). Par contre, une réduction de l'expression de différents gènes ayant une fonction mitochondriale est observée dans ces cellules et cette réduction est encore plus importante après irradiation. Cette diminution conduit à des défauts mitochondriaux (fragmentation du réseau mitochondrial, altération de la production d'ATP et réduction du potentiel de membrane mitochondriale) qui pourraient expliquer la résistance des cellules mutantes pour *ddp* à l'apoptose induite par dommage à l'ADN. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'expression d'un ARNi dirigé contre différents gènes cibles des facteurs dE2Fs ayant une fonction mitochondriale conduit à une altération de la réponse apoptotique après irradiation (Ambrus *et al.*, 2013). Ces données suggèrent fortement que l'absence d'activité des facteurs dE2Fs compromet le fonctionnement de la mitochondrie ce qui est à l'origine d'une réduction de l'efficacité de l'apoptose. Les travaux que nous avons réalisés permettent de compléter ces données car ils démontrent que Rbf1 déclenche l'apoptose en modulant la dynamique mitochondriale et en induisant un stress oxydant au niveau de la mitochondrie. Par conséquent, les données de la littérature associées à notre étude soulignent que le statut de la mitochondrie joue un rôle crucial dans les processus apoptotiques dépendant de la voie Rbf1/dE2Fs chez la drosophile.

Il est intéressant de noter que ce lien étroit entre le fonctionnement mitochondriale et l'apoptose dépendante de la voie Rb/E2F est conservé chez les mammifères. En effet, dans des cellules d'ostéosarcome humain, E2F1 lie les promoteurs de gènes orthologues de ceux liés par les protéines dE2Fs ayant une fonction mitochondriale. De plus, une réduction de l'expression de ces gènes est observée après inactivation de E2F1. Cette réduction est associée à des défauts de fonctionnement de la mitochondrie et à une résistance à la mort cellulaire induite par dommage à l'ADN (Ambrus *et al.*, 2013). La mitochondrie semble donc avoir une place importante dans la fonction pro-apoptotique des protéines Rb et E2F chez la drosophile et chez les mammifères.

2. pRb participe à l'induction d'apoptose directement au niveau de la mitochondrie

La très grande majorité des études concernant l'activité pro-apoptotique de pRb et Rbf1 se sont concentrées sur leur capacité à réguler la transcription de gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose (Attardi and Sage, 2013). Toutefois, une fonction pro-apoptotique de pRb indépendante de sa fonction de régulateur transcriptionnel a été récemment mise en évidence. En effet, une partie de pRb se localise à la mitochondrie où il peut interagir avec Bax et l'activer ce qui favorise la mort cellulaire en réponse au TNFα et à d'autres traitements induisant un stress (Hilgendorf *et al.*, 2013). Nous avons montré que Rbf1 réprime la transcription de *buffy* ce qui participe à l'induction d'apoptose via une voie de mort dépendante de Debcl. Etant donné que la perte de fonction de *buffy* n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire, on peut envisager qu'il existe en plus de la levée d'inhibition de Debcl par Buffy des événements supplémentaires induit par Rbf1 aboutissant à une activation efficace de Debcl. A la vue des données obtenues par Hilgendorf *et al.,* il serait intéressant de déterminer si, chez la drosophile, Rbf1 se localise à la mitochondrie et le cas échéant, s'il module l'action de protéines impliquées dans le contrôle de l'apoptose en interagissant avec elles au niveau de la mitochondrie. Des données obtenues par Maxance Ribeiro au cours de son stage de Master 1 suggèrent qu'il n'y aurait pas d'interaction physique entre Rbf1 et Debcl. Mais cela n'exclut pas une action mitochondriale directe de Rbf1 par un autre biais qu'une interaction physique avec Debcl.

3. Mitochondrie, apoptose et cancer

Plusieurs pistes intéressantes concernant les mécanismes moléculaires à l'origine de l'apoptose induite par Rbf1 et pRb indiquent que la mitochondrie occupe une place centrale dans ce processus. De façon intéressante, de nombreux oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, induisent des voies de signalisation qui convergent vers la régulation les protéines de la famille Bcl-2 pour contrôler la sensibilité des cellules à l'apoptose au cours de la tumorigenèse ou suite à un traitement thérapeutique des cancers (Elkholi *et al.*, 2014; Green and Kroemer, 2004; Juin *et al.*, 2013). Une caractérisation plus précise de la place de la mitochondrie dans la régulation de l'apoptose par pRb, mais aussi par d'autres oncogènes ou gènes suppresseur de tumeur, apparait donc importante pour avoir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au développement de

cancer. Ainsi, à plus long terme, des thérapies impliquant l'induction d'une voie de mort mitochondriale dans les cellules cancéreuses pourraient être envisagées.

B. Un lien étroit entre dynamique mitochondriale et mort cellulaire

1. La fission mitochondriale est-elle impliquée dans les processus de mort cellulaire ?

Nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de *debcl* ou de *rbf1* déclenche une fragmentation mitochondriale et que la protéine Drp1 est requise pour la mort cellulaire induite par ces deux gènes pro-apoptotiques. Ces données suggèrent un rôle de la dynamique mitochondriale dans la régulation de l'apoptose. Une fragmentation du réseau mitochondriale dépendante de Drp1 est également observée *in vivo* au cours de différents phénomènes d'apoptose développementale ou en réponse à différents stress, tel qu'un traitement à l'étoposide, ou tel qu'une expression ectopique de *rpr* et *hid* (Abdelwahid *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2007; Thomenius *et al.*, 2011). De plus, la perte de fonction de *drp1* protège les cellules de drosophile en culture de la mort induite par différents stimuli apoptotiques (Abdelwahid *et al.*, 2007; Goyal *et al.*, 2007).

Toutefois, rien ne permet d'exclure qu'au cours de la mort cellulaire induite par Rbf1 ou Debcl, Drp1 assure une fonction pro-apoptotique indépendante de son rôle dans la dynamique mitochondriale et que la fragmentation mitochondriale observée ne soit qu'une conséquence de l'apoptose. Il a d'ailleurs été montré que Drp1 favorise l'oligomérisation de Bax indépendamment de son activité GTPase qui est, elle, requise pour son rôle dans la fission mitochondriale (Montessuit *et al.*, 2010). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de Drp1, le mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor-1) inhibe la libération du cytochrome c induite par tBid à partir de mitochondries isolées incapables de subir une fission mitochondriale *in vitro* (Cassidy-Stone *et al.*, 2008; Lackner and Nunnari, 2010). Ces données suggèrent que Drp1 est nécessaire pour la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale indépendamment de sa capacité à induire une fission mitochondriale. Ainsi Drp1 peut moduler l'apoptose par une activité différente de son rôle dans la dynamique mitochondriale en impliquant les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Néanmoins, l'expression d'un ARNi dirigé contre *marf* induit de l'apoptose au sein du disque imaginal d'aile (Thomenius *et al.*, 2011) ce qui suggère qu'un blocage de la fusion permet de déclencher la mort cellulaire. Ces données soutiennent un rôle de la dynamique mitochondriale dans la régulation des processus apoptotiques chez la drosophile.

Il serait intéressant de déterminer si le simple fait de s'opposer à la fragmentation mitochondriale observée au cours de l'apoptose induite par Rbf1, par exemple en surexprimant *marf*, est suffisante pour inhiber le processus de mort cellulaire. Un sauvetage du phénotype d'apoptose suite à la surexpression de *marf*

constituerait un argument en faveur d'un rôle direct de la dynamique mitochondriale dans le contrôle de la mort cellulaire.

2. Debcl altère la dynamique mitochondriale au cours de l'apoptose induite par Rbf1

Debcl assure une fonction pro-apoptotique dans différents contextes cellulaires (Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Copeland *et al.*, 2007; Dorstyn *et al.*, 2002; Doumanis *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2009; Grusche *et al.*, 2011; Igaki *et al.*, 2000; Kanda *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010; Quinn *et al.*, 2003; Senoo-Matsuda *et al.*, 2005; Tanner *et al.*, 2011; Yacobi-Sharon *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2002) mais les bases moléculaires de cette fonction sont assez peu décrites. Indirectement, par l'étude de l'apoptose induite par Rbf1, nous avons pu mieux caractériser le mode d'action de Debcl au cours de l'apoptose. Nous avons pu montrer qu'au cours de l'apoptose induite par Rbf1, Debcl participe au recrutement de Drp1 au niveau de la mitochondrie, ce qui conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial. Debcl et Drp1 stimulent la production d'EAO mitochondriaux ce qui permet, par un mécanisme encore inconnu, l'activation de la voie de signalisation JNK aboutissant *in fine* à l'induction d'apoptose. Nos données soulignent donc un lien étroit entre Debcl et la dynamique mitochondriale.

Ce lien avait été suggéré par plusieurs données de la littérature. En effet, la perte de fonction de *debcl* dans des cellules de drosophile en culture augmente significativement le pourcentage de mitochondries présentant une morphologie anormale observée en réponse à un traitement par un inhibiteur de la chaine respiratoire mitochondriale (Senoo-Matsuda *et al.*, 2005). De plus, la perte de fonction de *debcl* ou de *buffy* conduit à une modification de la morphologie mitochondriale équivalente à celle observée en contexte perte de fonction de *drp1,* lors d'une induction de la mort des cellules nourricières par privation de nutriments pendant l'ovogenèse (Tanner *et al.*, 2011). En outre, des données indiquent que Debcl module la densité et l'activité mitochondriale indépendamment de l'apoptose au cours de la morphogenèse des dendrites (Tsubouchi *et al.*, 2009). Toutefois, au cours du développement larvaire, la distribution, le volume et la densité des mitochondries sont identiques entre des cellules sauvages et des cellules mutantes pour *debcl* au sein des disques imaginaux d'aile et des glandes salivaires (Galindo *et al.*, 2009). Ainsi, Debcl pourrait participer au contrôle de la dynamique mitochondriale uniquement dans certains contextes cellulaires et notamment au cours des processus apoptotiques.

Il est intéressant de noter que ce rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le contrôle de la dynamique mitochondriale est conservé chez les mammifères (Rolland and Conradt, 2010). Il a, par exemple, été mis en évidence que Bax joue un rôle critique dans la fragmentation du réseau mitochondrial qui survient au cours de l'apoptose (Brooks *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2001).

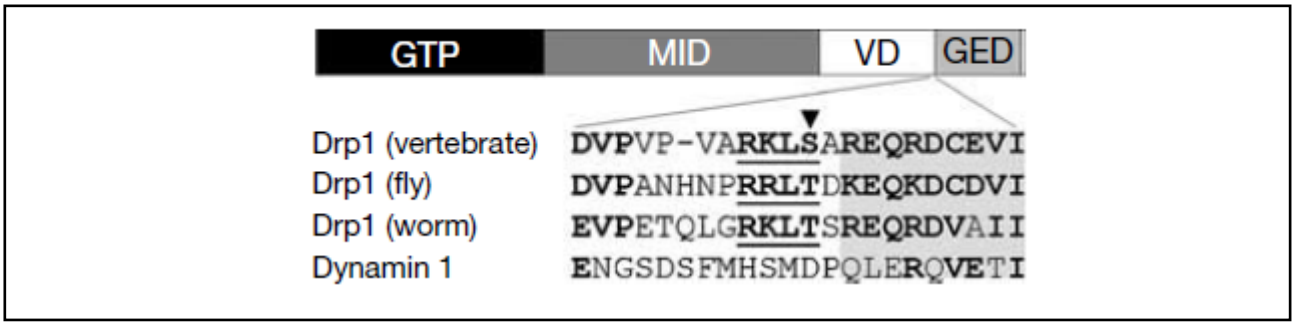


Figure n°66 : Drp1 présente un site consensus de phosphorylation par la PKA chez les métazoaires
Alignement des séquences de Drp1 de différentes espèces, à la frontière entre le domaine variable (VD) et le domaine effecteur de la GTPase (GED). La séquence consensus de phosphorylation par la PKA est soulignée.
Issu de Cribbs and Strack, 2007

3. Comment Debcl favorise t-il la fragmentation mitochondriale au cours d'un processus apoptotique ?

Nous avons pu mettre en évidence qu'au cours de l'apoptose induite par Rbf1, il y a un enrichissement de Drp1 à la mitochondrie dépendant de Debcl. De plus, dans un contexte de surexpression de *debcl*, les protéines Debcl et Drp1 interagissent physiquement. Cette interaction physique pourrait permettre de stabiliser Drp1 à la mitochondrie. On peut également envisager que cette interaction conduise à une activation de Drp1. Chez les mammifères, aucune interaction physique entre Drp1 et un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 n'a été mise en évidence mais Bax participe à l'activation de Drp1 par d'autres moyens.

Au cours de l'apoptose, Bax et Drp1 colocalisent au niveau des sites de fission (Karbowski *et al.*, 2002). De façon intéressante, l'association durable de Drp1 avec la membrane externe mitochondriale survenant au cours de la mort cellulaire est dépendante de Bax et Bak (Wasiak *et al.*, 2007). Plus précisément, Bax et Bak stimulent la SUMOylation de Drp1 et cette modification post-traductionnelle est corrélée au recrutement stable de Drp1 à la mitochondrie (Wasiak *et al.*, 2007). Par ailleurs, Bax, en induisant une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, permet la libération dans le cytosol de la protéine DDP/TIMM8a. Cette dernière peut interagir avec Drp1 (Arnoult *et al.*, 2005) ce qui permet une stabilisation de Drp1 à la mitochondrie où il induit une fragmentation du réseau mitochondrial. Ainsi, par différents mécanismes, Bax stimule le recrutement de Drp1 à la mitochondrie. Ces données laissent entrevoir le fait que des modifications post-traductionnelles de Drp1 peuvent réguler sa fonction.

Chez les mammifères, Drp1 est sujet à de nombreuses modifications post-traductionelles (phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation, S-nitrosylation) qui vont réguler sa fonction (Chan, 2012; Chang and Blackstone, 2010; Ugarte-Uribe and Garcia-Saez, 2014). Il serait intéressant de déterminer si, chez la drosophile, Drp1 est la cible de modifications post-traductionnelles et, le cas échéant, si ces modifications interfèrent, d'une part, avec sa capacité à induire une fission mitochondriale et d'autre part, avec sa fonction pro-apoptotique. La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus décrite de Drp1 chez les mammifères. La kinase PKA phosphoryle Drp1 (humain) sur la sérine en position 637. Cette phosphorylation a pour conséquence une inhibition de l'activité GTPase de Drp1, un blocage du processus de fission mitochondriale et une résistance à l'apoptose induite par divers stimuli (Chang and Blackstone, 2007a; Chang and Blackstone, 2007b; Cribbs and Strack, 2007; Jahani-Asl and Slack, 2007). A l'inverse, la déphosphorylation de Drp1 en position 637 par la calcineurin permet l'activation de Drp1 et sensibilise les cellules à la mort cellulaire (Cereghetti *et al.*, 2008). Ainsi, le statut de phosphorylation de Drp1 sur la sérine 637 semble être un point de contrôle important pour la régulation de la fonction pro-apoptotique de Drp1. De façon intéressante, ce site de phosphorylation est conservé au sein de tous les orthologues de Drp1 chez les métazoaires (Cribbs and Strack, 2007). En effet, il existe un site consensus de phosphorylation par la PKA (cAMP-dependent protein kinase) contenant une thréonine à proximité du domaine effecteur de la GTPase au sein de la séquence de Drp1 chez la drosophile (**Figure 66**). Etant donné la forte conservation de ce site, il apparait important de déterminer si le statut de phosphorylation de

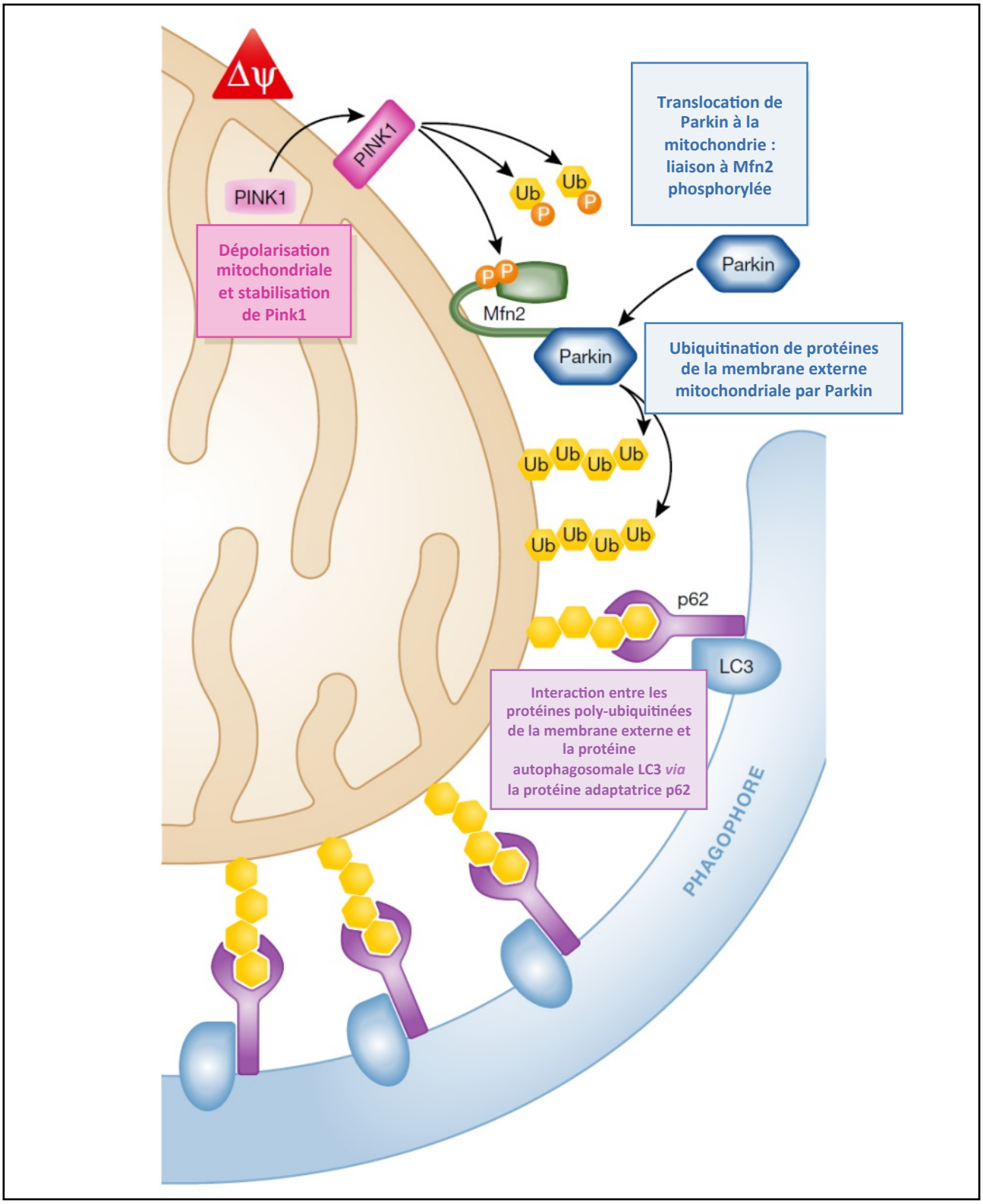
Drp1 varie au cours de l'apoptose induite par Rbf1, et le cas échéant, d'identifier la kinase et/ou la phosphatase responsable de ces variations.

Il est également envisageable que les fonctions de Drp1, notamment au cours de processus apoptotiques, soient modulées par ubiquitination. Au cours de l'apoptose induite par Rbf1, Drp1 est stabilisée à la mitochondrie, de façon dépendante de Debcl, et se retrouve ainsi à proximité de nombreuses ubiquitine ligases et de différentes enzymes de conjugaison de l'ubiquitine. En effet, l'E3 ubiquitine ligase Diap1 est retrouvée localisée à la mitochondrie au cours des processus apoptotiques (Freel *et al.*, 2008; Sandu *et al.*, 2010). Les enzymes E2 impliquées dans l'ubiquitination de Diap1 pourraient donc également être mitochondriales. De plus, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre la protéine mitochondriale Debcl et la protéine à boite F Slimb ((Colin *et al.*, 2014), voir article en Annexe). Ainsi, il existe une forte concentration d'enzymes impliquées dans les processus d'ubiquitination au niveau de la mitochondrie ce qui pourrait favoriser l'ubiquitination de Drp1. On peut envisager différentes conséquences de l'ubiquitination éventuelle de Drp1 en fonction du type d'ubiquitination et de l'enzyme impliquée. Cela pourrait induire la dégradation de Drp1 par la voie ubiquitine protéasome, et donc, s'opposer à la fission mitochondriale et au déclenchement de la mort cellulaire, ou cela pourrait affecter l'oligomérisation de Drp1, et donc, stimuler, ou au contraire réprimer, la fission mitochondriale. En outre, cela pourrait fournir un motif d'interaction avec une protéine mitochondriale, interaction qui serait à l'origine du maintien de la localisation mitochondriale de Drp1.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la surexpression de *diap1* bloque le remodelage du réseau mitochondrial qui survient au cours de la mort des cellules nourricières pendant l'ovogenèse en réponse à une privation de nutriment (Tanner *et al.*, 2011). Ces données laissent penser que la diminution du niveau de transcrits de *diap1*, en réponse à la surexpression de *rbf1*, pourrait conduire à une modification de la dynamique mitochondriale. On peut donc envisager que la répression transcriptionnelle de *buffy* et l'activation de *how* coopèrent pour induire une fragmentation du réseau mitochondriale et ainsi induire une voie de mort mitochondriale.

4. La fragmentation mitochondriale induite par Rbf1 ou Debcl est-elle associée à de la mitophagie ?

De nombreuses études montrent qu'une fragmentation mitochondriale associée à une perte du potentiel de membrane mitochondriale précède la mitophagie (Gomes *et al.*, 2011; Rambold *et al.*, 2011; Twig *et al.*, 2008). La mitophagie est une forme d'autophagie au cours de laquelle les mitochondries sont spécifiquement adressées à la dégradation par les autophagolysosomes. Différentes données de la littérature nous laisse penser que la mort cellulaire induite par Rbf1 et Debcl pourrait être associée à de la mitophagie. En effet, une étude indique que Debcl et Drp1 sont, tous les deux, requis d'une part, pour la mort cellulaire qui survient au cours de l'ovogenèse en réponse à une privation de nutriment et d'autre part, pour le remodelage



<u>Figure n°67</u> : Mécanisme moléculaire de la mitophagie dépendante de Parkin

Pink1 est stabilisée au niveau de mitochondries endommagées et/ou dépolarisées. Cette stabilisation permet la phosphorylation de Mfn2 et le recrutement de Parkin. La poly-ubiquitination de différentes protéines de la membrane externe mitochondriale par Parkin initie le processus de mitophagie qui conduira *in fine* à la dégradation lysosomale.

Adapté de Dorn, 2015

mitochondrial observé au cours de ce processus de mort cellulaire (Tanner *et al.*, 2011). Des données de cette étude indiquent que ce remodelage est associé à de la mitophagie, ce qui permet d'envisager un lien entre Debcl, Drp1 et mitophagie.

Par ailleurs, le mécanisme de mitophagie peut impliquer les protéines Pink1 et Parkin (Pickrell and Youle, 2015; Youle and Narendra, 2011). Le mode d'action de ces deux protéines est assez bien décrit chez les mammifères (**Figure 67**). Pink1 est une sérine/thréonine kinase qui s'accumule au niveau de la membrane externe mitochondriale en réponse à une dépolarisation (Narendra *et al.*, 2012; Narendra *et al.*, 2010). Pink1 phosphoryle la protéine pro-fusion Mfn2 qui une fois phosphorylée sert de récepteur au niveau de la membrane externe mitochondriale pour l'E3 ubiquitine ligase Parkin (Chen and Dorn, 2013). Ainsi, la protéine cytosolique Parkin est recrutée au niveau des mitochondries endommagées (Pallanck, 2013). Parkin ubiquitine un certain nombre de substrats au niveau de la membrane externe mitochondriale dont Mfn2, Mfn1, VDAC et Miro (Chan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011a; Youle and Narendra, 2011). On suppose que cette ubiquitination crée un site d'ancrage pour des protéines impliquées dans la formation d'autophagosomes. De façon intéressante, il existe, chez la drosophile, des interactions génétiques entre *drp1*, *pink1* et *parkin*. Les drosophiles mutantes pour *pink1* ou *parkin* ont une durée de vie réduite, une sensibilité augmentée à différents stress environnementaux et présentent une dégénérescence des muscles du vol (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Les cellules des muscles du vol présentent une morphologie anormale qui peut être supprimée par la surexpression de *drp1* ou la déplétion de *marf* (Deng *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Au vue de ces interactions génétiques, il apparait important de tester l'implication de Pink1 et Parkin dans la fragmentation mitochondriale et la mort cellulaire induite par Rbf1 et Debcl.

En outre, le mécanisme de mitophagie peut également impliquer la protéine BNIP3 (Boland *et al.*, 2013b). BNIP3 est une molécule adaptatrice qui sert de signal pour la formation des autophagosomes. BNIP3 induit la translocation de Drp1 à la mitochondrie et l'expression d'un dominant négatif de *drp1* inhibe la fragmentation mitochondriale et la mitophagie induite par BNIP3 (Lee *et al.*, 2011c). De façon intéressante, *bnip3* est un gène cible de pRb (Tracy *et al.*, 2007) et BNIP3 induit des dysfonctionnements mitochondriaux et de la mort cellulaire par l'intermédiaire des protéines Bax et Bak (Kubli *et al.*, 2007). On pourrait donc envisager de tester si Rbf1 régule l'expression de *cg5059* (homologue de BNIP3 chez la drosophile).

D'après l'ensemble de ces données, il serait intéressant d'étudier si un processus mitophagique survient en réponse à la surexpression de *rbf1* ou suite à la surexpression de *debcl* et, si c'est le cas, de déterminer son implication éventuelle dans l'apoptose induite par ces deux gènes en réalisant des tests d'interaction génétique avec les composants de la machinerie autophagique tels que *atg8a*.

C. Rôle du stress oxydant mitochondrial dans la mort cellulaire induite par Rbf1

1. Implication des EAO mitochondriaux dans les processus apoptotiques

Les données que nous avons obtenues soulignent un rôle important des EAO dans l'apoptose induite par Rbf1 ou Debcl. Des expériences de cytométrie en flux utilisant du MitoSOX ont permis de montrer que la surexpression de *rbf1* ou de *debcl* conduit à une augmentation du pourcentage de cellules présentant un niveau élevé d'EAO. De façon intéressante, l'expression de *sod2*, codant pour une superoxide dismutase mitochondriale, s'oppose à cette augmentation du niveau d'EAO et à l'apoptose induite par Rbf1 ce qui suggère que les EAO participent à l'induction d'apoptose. De même, différentes études réalisées chez la drosophile montrent une corrélation entre un niveau élevé d'EAO et une activation des caspases conduisant au déclenchement de la mort cellulaire (Gupta *et al.*, 2010; Siddique *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'expression neuronale d'un ARNi dirigé contre *sod2* conduit à une augmentation du niveau d'EAO associé à la perte des neurones dopaminergiques. Cette perte peut être sauvée par la délétion *H99* à l'état hétérozygote (délétion qui élimine les trois gènes pro-apoptotiques *rpr*, *hid* et *grim*) ce qui suggère que la présence d'un taux élevé d'EAO conduit à l'apoptose des neurones dopaminergiques par une voie dépendante des RHG (Oka *et al.*, 2015). En outre, la perte de fonction de *selD*, un gène impliqué dans la biosynthèse des sélénoprotéines, conduit à une accumulation d'EAO à l'origine de l'apoptose des cellules du disque imaginal d'œil (Morey *et al.*, 2003). Le mécanisme de l'induction de cette mort par les EAO a été caractérisé. En effet, un niveau élevé d'EAO conduit à une stabilisation de la protéine Dmp53 et à la transcription du gène pro-apoptotique *rpr*. A la vue de ces données, il serait intéressant de réaliser des tests d'interaction génétiques pour déterminer l'implication de Dmp53 dans la mort cellulaire induite par Rbf1 et Debcl. Par conséquent, les résultats que nous avons obtenus associés à ceux décris dans la littérature indiquent que les EAO peuvent participer à l'induction d'apoptose chez la drosophile.

2. L'altération de la dynamique mitochondriale pourrait être responsable de la production d'EAO

La production d'EAO cellulaires est en partie due à une fuite d'électrons au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. Dans des conditions normales, les EAO sont rapidement éliminés par des enzymes antioxydantes telles que les SODs ou les catalases. Une dérégulation de la chaine de transport d'électrons peut conduire à une forte accumulation d'EAO. Dans ces conditions, le système de détoxification n'est plus assez efficace et la présence d'un niveau élevé d'EAO peut avoir des conséquences néfastes pour la survie cellulaire comme nous venons de la voir. Les données que nous avons obtenues dans un contexte de surexpression de *rbf1* suggèrent qu'une perturbation de la dynamique mitochondriale pourrait stimuler l'accumulation d'EAO mitochondriaux. Une telle perturbation de la dynamique mitochondriale peut altérer la chaine de transport d'électrons, ce qui fournirait une explication pour l'augmentation du niveau d'EAO observée.

L'idée qu'une altération de la dynamique mitochondriale puisse créer un stress oxydant à l'origine de l'apoptose est soutenue par des données de la littérature. Ainsi, la perte de fonction d'*opa1* (un gène pro-fusion) conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial associée à une production d'EAO au sein des cellules du disque imaginal d'œil (Tang *et al.*, 2009; Yarosh *et al.*, 2008). Par ailleurs, la surexpression de *twins* (homologue du gène *ppp2r2b* impliqué dans la pathogenèse de l'ataxie spinocérébelleuse de type 12) induit une fragmentation mitochondriale qui s'accompagne d'une augmentation du niveau d'EAO et de l'activité des caspases (Wang *et al.*, 2011b). La coexpression de *sod2*, qui réduit le niveau d'EAO associées à l'expression de *twins* réduit également l'activité des caspases.

De façon intéressante, au cours de la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile, des EAO mitochondriaux sont générés. Ces EAO induisent une fragmentation mitochondriale dépendante de Drp1 qui permet une activation des caspases à l'origine de la délamination des cellules (Muliyil and Narasimha, 2013). Cela suggère qu'une boucle de rétrocontrôle positive pourrait exister au cours de l'apoptose induite par Rbf1 : Drp1 induit une fragmentation mitochondriale ce qui conduirait à une augmentation du niveau d'EAO. Ce niveau élevé d'EAO pourrait lui-même conduire à une fragmentation du réseau mitochondrial, l'ensemble de ces événements participerait à une forte induction d'apoptose.

3. Les EAO mitochondriaux déclencheraient l'activation de la voie JNK

Les données que nous avons obtenues suggèrent que les EAO sont requis pour l'activation de la voie JNK. Ce résultat n'est pas étonnant étant donné que les EAO constituent un des stimuli majeurs d'activation des voies MAPKs (Son *et al.*, 2013). De façon intéressante, une voie proche de celle que nous avons identifiée a été mise en évidence au sein de cellules neuronales. En effet, la présence de défauts mitochondriaux induits par la perte de fonction de *marf* conduit à une augmentation du niveau d'EAO ce qui déclenche l'activation de la voie JNK elle-même à l'origine de la dégénérescence des neurones (Liu *et al.*, 2015). Ainsi, il semblerait qu'une perturbation de la dynamique mitochondriale, dans différents types cellulaires, soit associée à une accumulation d'EAO permettant d'activer la voie JNK. A l'heure actuelle, on ne sait pas exactement comment les EAO stimulent l'activation de cette voie de signalisation.

Un mécanisme possible d'activation de la voie JNK par les EAO a été identifié dans des fibroblastes de souris (Kamata *et al.*, 2005). La voie JNK est régulée négativement par différentes phosphatases. La présence d'EAO convertit la cystéine catalytique de ces phosphatases en acide sulfonique ce qui rend ces enzymes inactives. L'inhibition de ces phosphatases conduit indirectement à l'activation de la voie JNK. Si ce mécanisme est conservé chez la drosophile, il permettrait d'expliquer comment les EAO stimulent l'activation de la voie JNK pour induire la mort cellulaire. Toutefois, Puc (une phosphatase capable d'inactiver la voie JNK chez la drosophile) déphosphoryle et inactive la JNK Bsk. Par conséquent, une inhibition de Puc par les EAO conduirait à une activation de la voie directement au niveau de la JNK Bsk. Cela n'expliquerait donc pas l'implication des JNKKKs

dMekk1 et dTak1, dans l'apoptose induite par Rbf1 que l'on détecte par des tests d'interaction génétique. On ne peut pas exclure que la voie JNK soit activée à différents niveaux en réponse à la surexpression de *rbf1*. Cette voie pourrait, d'une part, être activée par les EAO au niveau de Bsk et d'autre part, au niveau de dTak1 et de dMekk1 par un mécanisme indépendant des EAO. Il est intéressant de noter qu'une activation de Mekk1 par les EAO a été décrite chez les mammifères (Nakano *et al.*, 2006). On pourrait donc envisager une activation de la voie JNK par les EAO à de multiples niveaux.

III. La voie JNK : une voie de signalisation aux effets pléiotropes

A. Qu'est ce qui détermine la spécificité de réponse de la voie JNK ?

La voie JNK peut être activée par de très nombreux stimuli et régule, suite à son activation, de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la morphogenèse et l'apoptose (Davis, 2000; Igaki, 2009; Rios-Barrera and Riesgo-Escovar, 2013; Weston and Davis, 2007). Chez la drosophile, il existe un grand nombre de protéines susceptibles d'activer directement ou non la kinase Bsk. Un des challenges des recherches menées actuellement est de déterminer la base moléculaire de la spécificité de réponse de la voie JNK suite à un stimulus particulier. Par le biais de l'étude du rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire chez la drosophile, nous avons pu mettre en évidence un rôle de la petite GTPase Rac1 et des JNKKKs dTak1 et dMekk1 dans l'activation de la voie JNK conduisant à une induction d'apoptose. De plus, nos résultats indiquent que la protéine adaptatrice dTRAF1 et la JNKKK Slipper sont requises pour la prolifération en réponse à l'apoptose induite par Rbf1. Nos données soulignent donc le fait que l'activation de la kinase Bsk par des effecteurs différents en amont de la voie JNK conduit à des conséquences différentes.

Des analyses génétiques réalisées avec différents organismes modèles et des études biochimiques effectuées en culture cellulaire ont révélé que des réponses différentes de la voie JNK nécessitent sélectivement différentes protéines JNKKKs (Chen *et al.*, 2002; Cronan *et al.*, 2012; Cuevas *et al.*, 2007; Stronach, 2005). L'étude que nous avons réalisée vient conforter cette idée. Toutefois, il ne semble pas qu'on puisse en faire une généralité. En effet, on ne peut pas affirmer que le fait d'activer la voie JNK par l'intermédiaire de Slipper, dans un autre modèle, aura forcément pour conséquence de stimuler la prolifération cellulaire comme nous l'avons observé dans le cas de la prolifération en réponse à l'apoptose induite par Rbf1. Par exemple, une activation de la voie JNK *via* Slipper peut également conduire à une modification de la forme des cellules, notamment au cours de la fermeture dorsale de l'embryon (Polaski *et al.*, 2006; Stronach and Perrimon, 2002). De plus, Slipper peut induire une activation de la voie JNK, avec pour conséquence, une modulation du temps de développement permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire en réponse à l'apoptose (Demay *et al.*, 2014). De même, bien que plusieurs études indiquent un rôle de la voie JNK dans les processus apoptotiques dépendant de dTak1 (Cha *et al.*, 2003; Geuking *et al.*, 2005; Igaki *et al.*, 2002a; Mihaly *et al.*, 2001; Takatsu *et al.*, 2000; Yang and Su, 2011),

cette JNKKK peut également réguler la réponse immunitaire innée chez la drosophile en activant la voie JNK (Buchon *et al.*, 2014; Fernando *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2003). En outre, il est intéressant de noter que les JNKKKs dTak1 et Slipper qui assurent des rôles différents dans la réponse cellulaire et tissulaire à la surexpression de *rbf1*, peuvent coopérer dans la réparation des blessures au sein de l'épiderme larvaire chez la drosophile (Lesch *et al.*, 2010). Une étude récente indique que les domaines kinases de dTak1 et Slipper ne sont pas fonctionnellement équivalents. L'expression de ST^{K} qui code pour une forme chimérique de Slipper au sein de laquelle le domaine kinase de Slipper a été remplacé par celui de dTak1, ne permet pas de sauver des défauts embryonnaires associés à la perte de fonction de *slipper* contrairement à l'expression de la forme sauvage de *slipper* (Stronach *et al.*, 2015). Cela laisse penser que les domaines kinases contribuent à la spécificité inhérente aux protéines et à la voie dans laquelle elle fonctionne.

A la vue de l'ensemble de ces données, il ne semble pas que la JNKKK impliquée dans l'activation de la voie JNK soit la seule responsable de la spécificité de réponse. On peut envisager que ce soit la combinaison des différents acteurs en amont de Bsk, et non uniquement la JNKKK, qui détermine les conséquences de l'activation de la voie JNK. Il est par exemple possible, que lorsque Slipper est impliqué dans l'activation de la voie JNK en aval de dTRAF1 cela conduise à de la prolifération cellulaire alors que l'action de Slipper en aval d'une autre protéine adaptatrice aurait des conséquences différentes. La compréhension des différentes combinaisons d'acteurs en amont de Bsk pourrait être la clé pour expliquer la spécificité de réponse de la voie JNK à un stimulus donné.

B. La voie JNK joue un rôle important dans le processus de prolifération compensatoire

1. La voie JNK joue un rôle crucial dans la prolifération en réponse à l'apoptose

Bien que différents signaux de stress induisent un fort niveau d'apoptose au sein des tissus, les organismes possèdent souvent la capacité de compenser cette perte cellulaire par un mécanisme de prolifération déclenché en réponse à l'apoptose (AiP). Lors de cette réponse, les cellules apoptotiques stimulent la prolifération de leurs voisines (Bergantinos *et al.*, 2010b; Bergmann and Steller, 2010; Fan and Bergmann, 2008a; Kashio *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2009; Mollereau *et al.*, 2013; Morata *et al.*, 2011; Ryoo and Bergmann, 2012). Un nombre important d'études indiquent un rôle crucial de la voie JNK dans le processus d'AiP (Bergantinos *et al.*, 2010a; Fan *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2013; Perez-Garijo *et al.*, 2009; Suissa *et al.*, 2011; Sun and Irvine, 2011; Warner and Longmore, 2010). Nos résultats démontrent l'importance de la voie JNK et notamment des protéines dTRAF1 et Slipper dans l'induction d'AiP et sont donc en accord avec les données de la littérature.

Récemment, les composants de la voie JNK impliqués dans l'induction d'AiP en présence de cellules « undead » ont été identifiés (Fan *et al.*, 2014). Dans cette étude, menée au sein du disque imaginal d'œil, la

surexpression de *hid* dans les cellules antérieures au sillon morphogénique induit de l'apoptose, mais l'exécution du programme de mort est bloquée par la coexpression de *p35*. Dans ces conditions, une augmentation de la taille de la tête est observée du fait de l'induction de prolifération en réponse à l'apoptose. L'équipe d'Andreas Bergmann a pu montrer, par la réalisation de tests d'interaction génétique, une implication des JNKKs Hep et Mkk4, de la JNKKK dTak1 et de la protéine adaptatrice dTRAF2 dans l'AiP, en présence de cellules « undead », dans le disque imaginal d'œil (Fan *et al.*, 2014). Les composants de la voie JNK impliqués dans l'AiP en présence de cellules « undead » sont différents de ceux que nous avons identifiés pour l'AiP en présence de cellules apoptotiques induite par Rbf1. Il serait intéressant de déterminer si cette différence est due aux cellules « undead » ou si elle dépend du signal à l'origine de l'induction d'apoptose. On peut également envisager l'existence d'un mécanisme spécifique du tissu considéré. En d'autres termes, il apparait important de tester si Slipper et dTRAF1 sont requis de façon systématique pour les processus d'AiP en présence de cellules apoptotiques « authentiques » en testant par exemple leur implication dans l'AiP en présence de cellules apoptotiques induite par irradiation.

Il est intéressant de noter qu'en dehors de son rôle dans l'induction d'AiP, en réponse à un dommage tissulaire, la voie JNK induit également un retard de développement larvaire pour maintenir les animaux dans une phase de croissance (le stade larvaire) et ainsi permettre une compensation de la perte cellulaire (Bergantinos *et al.*, 2010a; Colombani *et al.*, 2012; Garelli *et al.*, 2012; Worley *et al.*, 2012). La petite GTPase Rac1 et la kinase Slipper ont été décrite comme importante pour l'activation de la voie JNK permettant un retard de développement en réponse à l'apoptose induite par l'expression ectopique de la *presinilin* dans les cellules du disque imaginal d'aile (Demay *et al.*, 2014). Il serait intéressant de déterminer si l'apoptose induite par Rbf1 est associée à un retard de développement et, si c'est le cas, de vérifier si les effecteurs de la voie JNK impliqués sont les mêmes que ceux identifiés par Demay *et al.*

2. Quels sont les facteurs en aval de la voie JNK responsables de la prolifération en réponse à l'apoptose ?

Concernant le rôle de la voie JNK vis-à-vis de l'AiP un certain nombre de questions subsistent. Par exemple, les facteurs en aval de la voie JNK impliqués dans l'induction de prolifération en réponse à l'apoptose ne sont pas clairement identifiés. Toutefois, il existe dans la littérature des pistes de réponses possibles.

Un mécanisme possible pour expliquer l'AiP est que les cellules qui meurent émettent un signal diffusible pour activer la prolifération des cellules voisines. L'utilisation de cellules « undead » a permis de mettre en évidence une expression ectopique des morphogènes *wg* et *dpp*, à l'origine d'une hyperplasie tissulaire (Huh *et al.*, 2004a; Kondo *et al.*, 2006; Morata *et al.*, 2011; Perez-Garijo *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2005; Ryoo *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2006). Ces données ont aboutit à un modèle attractif où les facteurs Wg et Dpp sécrétés par les cellules apoptotiques stimuleraient la prolifération des cellules voisines pour compenser la perte de

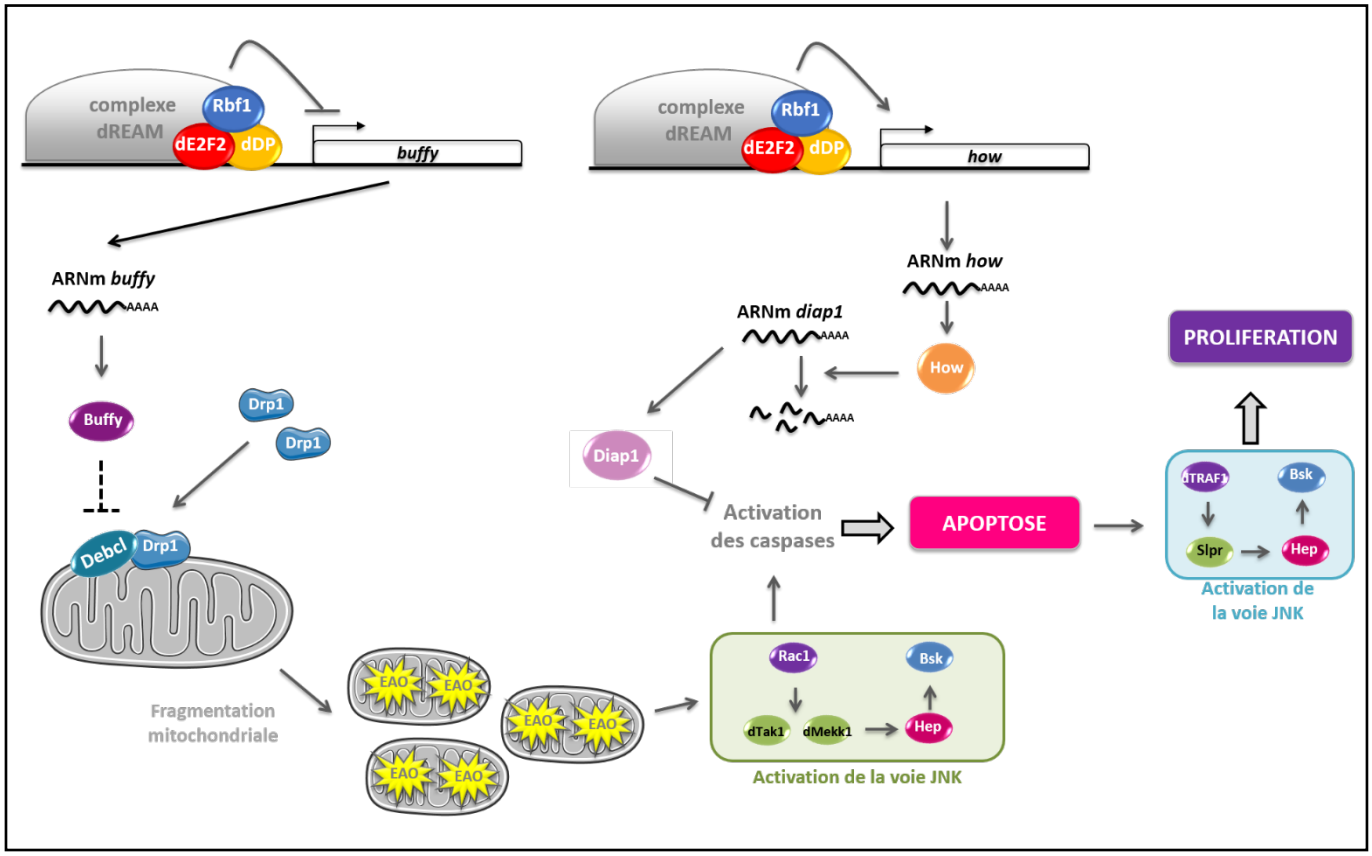
cellules. Ce modèle est soutenu par le fait qu'une expression ectopique de ces facteurs est également observée dans les cellules apoptotiques « authentiques » (Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004; Smith-Bolton *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2015). Toutefois, en dépit de cette expression, des données indiquent que Wg et Dpp ne seraient pas requis pour la prolifération compensatoire (Herrera *et al.*, 2013; Perez-Garijo *et al.*, 2009). De façon cohérente avec ces données, des tests d'interaction génétique réalisés au laboratoire indiquent que *wg* n'est pas impliqué dans le phénotype d'hyperplasie tissulaire induite par la surexpression de $rbf1^{D253A}$ ((Milet *et al.*, 2014), *cf* article en Annexe). Les données actuellement disponibles dans la littérature n'accordent donc par un rôle important aux morphogènes Wg et Dpp dans le processus de prolifération compensatoire.

Une implication du facteur Yorkie peut également être envisagée en aval de la voie JNK pour expliquer la prolifération observée en réponse à l'apoptose induite par Rbf1. Yorkie (homologue de drosophile de la protéine de mammifère YAP) est un facteur de transcription requis pour la croissance normale des tissus. Une surexpression de *yorkie* conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire (Huang *et al.*, 2005). Yorkie est inactivé par les kinases de la voie de signalisation Hippo. L'induction d'apoptose au sein du disque imaginal d'aile stimule l'activation de Yorkie dans les cellules survivantes voisines. Cette activation dépend de la voie JNK et conduit au déclenchement de la prolifération en réponse à la mort cellulaire (Du Toit, 2013; Sun and Irvine, 2011; Sun and Irvine, 2013). Il est donc tout à fait envisageable que Yorkie soit responsable de la prolifération dépendante de la voie JNK que l'on observe en réponse à l'induction d'apoptose par Rbf1 au sein du disque imaginal d'aile.

L'intestin de drosophile est un bon modèle pour l'étude des processus impliqués dans la régénération d'un épithélium (Andriatsilavo *et al.*, 2013). Lorsque les entérocytes sont endommagés chimiquement ou suite à une infection, les cellules sécrètent les ligands de la voie JAK/STAT (Upd, Upd2, Upd3) et les ligands de la voie EGFR (Keren et Spitz) suite à l'activation de la voie JNK (Buchon *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011). Les voies de signalisation JAK/STAT et EGFR sont donc induites dans les cellules souches intestinales ce qui permet d'induire une prolifération homéostatique (Buchon *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Il a été récemment mis en évidence un rôle de la voie EGFR en aval de la voie JNK dans le phénomène d'AiP (Fan *et al.*, 2014). A la vue de ces données, il apparait intéressant de tester l'implication des voies de signalisation JAK/STAT et EGFR dans la prolifération qui survient en réponse à l'apoptose induite par Rbf1.

3. Comment la voie JNK est-elle activée pour induire l'AiP ?

Bien que la voie JNK joue un rôle important dans l'AiP, on ne sait pas encore aujourd'hui précisément comment cette voie est activée pour induire de la prolifération cellulaire. Des analyses génétiques et biochimiques ont permis de mettre en évidence que la protéine Diap1 est impliquée dans la dégradation de la protéine dTRAF1 (Kuranaga *et al.*, 2002). En conséquent, la dégradation de Diap1 induite par la protéine pro-apoptotique Rpr, conduit à la stabilisation de dTRAF1 et ainsi induit l'activation de la voie JNK en aval de



<u>Figure n°68</u> : Modèle de l'apoptose induite par Rbf1 dans un tissu prolifératif

Rbf1 coopère avec dE2F2 et les membres du complexe chromatinien dREAM pour réprimer la transcription du facteur anti-apoptotique de *buffy*. Cette action transcriptionnelle de Rbf1 permet de déclencher une voie de mort mitochondriale aboutissant à l'activation de la voie JNK et à une activation des caspases. Rbf1 est également capable de stimuler la transcription de *how* ce qui conduit indirectement à lever l'inhibition exercée par Diap1 sur les caspases. L'apoptose induite par Rbf1 déclenche un processus de prolifération compensatoire dépendant de la voie JNK.

cette protéine. Il est donc envisageable que la diminution du niveau de Diap1 induite par Rbf1 soit le facteur déclenchant de la prolifération en réponse à l'apoptose par le biais d'une stabilisation de dTRAF1. Finalement, on peut se demander si l'activation de dTRAF1 survient dans les cellules apoptotiques et conduit, par un mécanisme inconnu, à l'activation de la voie JNK dans la cellule voisine déclenchant la prolifération, ou si dTRAF1 est activé dans la cellule voisine de la cellule apoptotique, pour induire sa prolifération. Dans l'optique de la seconde hypothèse, on peut envisager que dTRAF1 soit activée dans la cellule survivante par un signal extracellulaire impliquant un des couples de récepteurs ligands décrit comme agissant en amont de la voie JNK, à savoir Egr/Wgn, Grindelwald/Wgn, PVF/PVR et Wg/Fz (Andersen *et al.*, 2015; Igaki, 2009). Des tests d'interaction génétique utilisant des mutants ou des ARNi dirigés contre ces différents facteurs permettront de déterminer leur implication dans l'AiP observée suite à l'apoptose induite par Rbf1.

Enfin, on peut également envisager une implication des EAO dans l'AiP. Des données de la littérature indiquent des liens entre EAO, voie JNK et prolifération. En effet, des défauts mitochondriaux induisent une production d'EAO à l'origine d'une activation de la voie de signalisation JNK. L'activation de cette voie permet une augmentation d'Upd (un des ligands de la voie JAK/STAT). Une fois sécrété, Upd induit la prolifération des cellules voisines (Nakamura *et al.*, 2014; Ohsawa *et al.*, 2012). En outre, chez le poisson zèbre, une blessure conduit à une production d'EAO qui déclenche l'activation de la voie JNK. Cet évènement est impliqué dans la prolifération compensatoire qui permet la réparation de la blessure (Gauron *et al.*, 2013). Ainsi on peut envisager que les EAO soient l'élément de la voie d'apoptose responsable du déclenchement de l'AiP.

IV. Conclusion

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons construire un modèle pour expliquer la fonction pro-apoptotique de Rbf1 dans un tissu prolifératif (**Figure 68**). Suite à sa surexpression, Rbf1 coopère avec dE2F2 et d'autres composants du complexe dREAM pour réprimer la transcription du facteur anti-apoptotique *buffy* ce qui conduit indirectement à l'activation de Debcl. Ce facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2 participe à la stabilisation de la protéine pro-fission Drp1 à la mitochondrie. Une fragmentation du réseau mitochondrial survient au cours du processus apoptotique induit par Rbf1. Les EAO mitochondriaux, qui sont augmentées de façon dépendante de Debcl et de Drp1, participent à l'activation de la voie JNK. La petite GTPase Rac1 et les kinases dTak1 et dMekk1 sont impliquées dans l'activation successive des kinases Hep et Bsk. Finalement, cette voie de signalisation conduit à l'activation des caspases et donc au déclenchement de l'apoptose.

Rbf1 coopère également avec dE2F2 et le complexe dREAM pour stimuler la transcription de la protéine de liaison aux ARNm How. Cette protéine lie la région 3'UTR des transcrits *diap1* ce qui conduit à leur dégradation. Ainsi, indirectement, How permet l'activation des caspases. *In vivo*, au sein du disque imaginal d'aile, la voie mitochondriale de mort et l'inhibiteur de caspases Diap1 coopèrent pour activer les caspases et induire l'apoptose en réponse à la surexpression de Rbf1.

Par un mécanisme inconnu, le déclenchement de l'apoptose induite par Rbf1 conduit à l'activation de la voie JNK *via* la protéine adaptatrice dTRAF1 et la JNKKK Slipper. Ceci permet d'induire de la prolifération cellulaire pour compenser la perte de cellules induite par Rbf1.

Ces travaux soulignent donc l'importance d'une part de la régulation transcriptionnelle des gènes *how* et *buffy* et d'autre part, de l'induction d'une voie de mort mitochondriale dans la fonction pro-apoptotique de Rbf1. L'étude du rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire devrait aider à la compréhension du rôle suppresseur de tumeur de pRb.

Références Bibliographiques

Abdelwahid, E., Rolland, S., Teng, X., Conradt, B., Hardwick, J.M., and White, K. (2011). Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes. Biochim Biophys Acta *1813*, 597-607.

Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R.J., Balasundaram, S., Fowle, W.H., and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis. Dev Cell *12*, 793-806.

Acharya, P., Negre, N., Johnston, J., Wei, Y., White, K.P., Henry, R.W., and Arnosti, D.N. (2012). Evidence for autoregulation and cell signaling pathway regulation from genome-wide binding of the Drosophila retinoblastoma protein. G3 (Bethesda) *2*, 1459-1472.

Acharya, P., Raj, N., Buckley, M.S., Zhang, L., Duperon, S., Williams, G., Henry, R.W., and Arnosti, D.N. (2010). Paradoxical instability-activity relationship defines a novel regulatory pathway for retinoblastoma proteins. Mol Biol Cell *21*, 3890-3901.

Ahlander, J., and Bosco, G. (2009). Sqd interacts with the Drosophila retinoblastoma tumor suppressor Rbf. Biochem Biophys Res Commun *383*, 363-367.

Ahlander, J., Chen, X.B., and Bosco, G. (2008). The N-terminal domain of the Drosophila retinoblastoma protein Rbf1 interacts with ORC and associates with chromatin in an E2F independent manner. PLoS One *3*, e2831.

Aldridge, A.C., Benson, L.P., Siegenthaler, M.M., Whigham, B.T., Stowers, R.S., and Hales, K.G. (2007). Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and milton, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during Drosophila spermatogenesis. Fly (Austin) *1*, 38-46.

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G.*, et al.* (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet *26*, 211-215.

Alonso, C.R. (2002). Hox proteins: sculpting body parts by activating localized cell death. Curr Biol *12*, R776-778.

Ambrus, A.M., Islam, A.B., Holmes, K.B., Moon, N.S., Lopez-Bigas, N., Benevolenskaya, E.V., and Frolov, M.V. (2013). Loss of dE2F compromises mitochondrial function. Dev Cell *27*, 438-451.

An, B., and Dou, Q.P. (1996). Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. Cancer Res *56*, 438-442.

Andersen, D.S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Rothlisberger, M., Toggweiler, J., Basler, K., Mapelli, M., Hueber, A.O.*, et al.* (2015). The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. Nature.

Andriatsilavo, M., Gervais, L., Fons, C., and Bardin, A.J. (2013). [The Drosophila midgut as a model to study adult stem cells]. Med Sci (Paris) *29*, 75-81.

Antonucci, L.A., Egger, J.V., and Krucher, N.A. (2014). Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax. Cell Cycle *13*, 3611-3617.

Araki, K., Ahmad, S.M., Li, G., Bray, D.A., Jr., Saito, K., Wang, D., Wirtz, U., Sreedharan, S., O'Malley, B.W., Jr., and Li, D. (2008). Retinoblastoma RB94 enhances radiation treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res *14*, 3514-3519.

Arama, E., Agapite, J., and Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila. Dev Cell *4*, 687-697.

Arama, E., Bader, M., Srivastava, M., Bergmann, A., and Steller, H. (2006). The two Drosophila cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. Embo J *25*, 232-243.

Aravind, L., Dixit, V.M., and Koonin, E.V. (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. Trends Biochem Sci *24*, 47-53.

Arbeitman, M.N., Furlong, E.E., Imam, F., Johnson, E., Null, B.H., Baker, B.S., Krasnow, M.A., Scott, M.P., Davis, R.W., and White, K.P. (2002). Gene expression during the life cycle of Drosophila melanogaster. Science *297*, 2270-2275.

Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R.G., Seeburg, D.P., Estaquier, J., Sheng, M., and Blackstone, C. (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. Curr Biol *15*, 2112-2118.

Asano, M., Nevins, J.R., and Wharton, R.P. (1996). Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. Genes Dev *10*, 1422-1432.

Attardi, L.D., and Sage, J. (2013). RB goes mitochondrial. Genes & development *27*, 975-979.

Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. Embo J *23*, 4709-4716.

Baehrecke, E.H. (2002). How death shapes life during development. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 779-787.

Banerjee, S., and Chinthapalli, B. (2014). A proteomic screen with Drosophila Opa1-like identifies Hsc70-5/Mortalin as a regulator of mitochondrial morphology and cellular homeostasis. Int J Biochem Cell Biol *54*, 36-48.

Bangs, P., Franc, N., and White, K. (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. Cell Death Differ *7*, 1027-1034.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14arf links the tumour suppressors Rb and p53. Nature *395*, 124-125.

Baum, J.S., Arama, E., Steller, H., and McCall, K. (2007). The Drosophila caspases Strica and Dronc function redundantly in programmed cell death during oogenesis. Cell Death Differ *14*, 1508-1517.

Beall, E.L., Bell, M., Georlette, D., and Botchan, M.R. (2004). Dm-myb mutant lethality in Drosophila is dependent upon mip130: positive and negative regulation of DNA replication. Genes Dev *18*, 1667-1680.

Beall, E.L., Lewis, P.W., Bell, M., Rocha, M., Jones, D.L., and Botchan, M.R. (2007). Discovery of tMAC: a Drosophila testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B. Genes Dev *21*, 904-919.

Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S., and Botchan, M.R. (2002). Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. Nature *420*, 833-837.

Benevolenskaya, E.V., and Frolov, M.V. (2015). Emerging links between E2F control and mitochondrial function. Cancer Res *75*, 619-623.

Benevolenskaya, E.V., Murray, H.L., Branton, P., Young, R.A., and Kaelin, W.G., Jr. (2005). Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. Mol Cell *18*, 623-635.

Bergantinos, C., Corominas, M., and Serras, F. (2010a). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. Development *137*, 1169-1179.

Bergantinos, C., Vilana, X., Corominas, M., and Serras, F. (2010b). Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. Bioessays *32*, 207-217.

Bergmann, A. (2010). The role of ubiquitylation for the control of cell death in Drosophila. Cell Death Differ *17*, 61-67.

Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K., and Steller, H. (1998). The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. Cell *95*, 331-341.

Bergmann, A., and Steller, H. (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. Sci Signal *3*, re8.

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

Bergmann, A., Yang, A.Y., and Srivastava, M. (2003). Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper. Curr Opin Cell Biol *15*, 717-724.

Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. Oncogene *22*, 161-167.

Bertet, C., Li, X., Erclik, T., Cavey, M., Wells, B., and Desplan, C. (2014). Temporal patterning of neuroblasts controls Notch-mediated cell survival through regulation of Hid or Reaper. Cell *158*, 1173-1186.

Berthelet, J., and Dubrez, L. (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). Cells *2*, 163-187.

Bertin-Ciftci, J., Barre, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P., and Braun, F. (2013). pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. Cell death and differentiation *20*, 755-764.

Bhaskar, P.K., Surabhi, S., Tripathi, B.K., Mukherjee, A., and Mutsuddi, M. (2014). dLin52 is crucial for dE2F and dRBF mediated transcriptional regulation of pro-apoptotic gene hid. Biochim Biophys Acta *1839*, 800-812.

Bilak, A., and Su, T.T. (2009). Regulation of Drosophila melanogaster pro-apoptotic gene hid. Apoptosis *14*, 943-949.

Bilak, A., Uyetake, L., and Su, T.T. (2014). Dying cells protect survivors from radiation-induced cell death in Drosophila. PLoS Genet *10*, e1004220.

Biteau, B., Hochmuth, C.E., and 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., Karpac, J., Hwangbo, D., and Jasper, H. (2011). Regulation of Drosophila lifespan by JNK signaling. Exp Gerontol *46*, 349-354.

Bohla, D., Herold, M., Panzer, I., Buxa, M.K., Ali, T., Demmers, J., Kruger, M., Scharfe, M., Jarek, M., Bartkuhn, M.*, et al.* (2014). A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. PLoS One *9*, e107765.

Boichuk, S., Parry, J.A., Makielski, K.R., Litovchick, L., Baron, J.L., Zewe, J.P., Wozniak, A., Mehalek, K.R., Korzeniewski, N., Seneviratne, D.S.*, et al.* (2013). The DREAM complex mediates GIST cell quiescence and is a novel therapeutic target to enhance imatinib-induced apoptosis. Cancer Res *73*, 5120-5129.

Boland, K., Flanagan, L., and Prehn, J.H. (2013a). Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. Cell Death Dis *4*, e725.

Boland, M.L., Chourasia, A.H., and Macleod, K.F. (2013b). Mitochondrial dysfunction in cancer. Front Oncol *3*, 292.

Borges, H.L., Hunton, I.C., and Wang, J.Y. (2007). Reduction of apoptosis in Rb-deficient embryos via Abl knockout. Oncogene *26*, 3868-3877.

Boutillier, A.L., Trinh, E., and Loeffler, J.P. (2000). Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. Oncogene *19*, 2171-2178.

Bowen, C., Spiegel, S., and Gelmann, E.P. (1998). Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. Cancer Res *58*, 3275-3281.

Brachmann, C.B., Jassim, O.W., Wachsmuth, B.D., and Cagan, R.L. (2000). The *Drosophila bcl-2* family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. Curr Biol *10*, 547-550.

Braschi, E., Zunino, R., and McBride, H.M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. EMBO Rep *10*, 748-754.

Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. Nature *391*, 597-601.

Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M., and Abrams, J.M. (2000). *Drosophila* p53 binds a damage response element at the *reaper* locus. Cell *101*, 103-113.

Broemer, M., Tenev, T., Rigbolt, K.T., Hempel, S., Blagoev, B., Silke, J., Ditzel, M., and Meier, P. (2010). Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. Mol Cell *40*, 810-822.

Brook, A., Xie, J.E., Du, W., and Dyson, N. (1996). Requirements for dE2F function in proliferating cells and in post- mitotic differentiating cells. Embo J *15*, 3676-3683.

Brooks, C., Cho, S.G., Wang, C.Y., Yang, T., and Dong, Z. (2011). Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol *300*, C447-455.

Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.J., and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 11649-11654.

Brun, S., Rincheval, V., Gaumer, S., Mignotte, B., and Guenal, I. (2002). reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila. Oncogene *21*, 6458-6470.

Buchon, N., Broderick, N.A., Kuraishi, T., and Lemaitre, B. (2010). Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. BMC Biol *8*, 152.

Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster--from microbial recognition to whole-organism physiology. Nat Rev Immunol *14*, 796-810.

Bueler, H. (2010). Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. Apoptosis *15*, 1336-1353.

Bug, M., and Dobbelstein, M. (2011). Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms. Oncogene *30*, 3612-3624.

Burke, J.R., Hura, G.L., and Rubin, S.M. (2012). Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. Genes Dev *26*, 1156-1166.

Burkhart, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nat Rev Cancer *8*, 671-682.

Buttitta, L.A., Katzaroff, A.J., Perez, C.L., de la Cruz, A., and Edgar, B.A. (2007). A double-assurance mechanism controls cell cycle exit upon terminal differentiation in Drosophila. Dev Cell *12*, 631-643.

Cakouros, D., Daish, T.J., and Kumar, S. (2004). Ecdysone receptor directly binds the promoter of the Drosophila caspase dronc, regulating its expression in specific tissues. J Cell Biol *165*, 631-640.

Cao, Q., Xia, Y., Azadniv, M., and Crispe, I.N. (2004). The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. J Immunol *173*, 1111-1117.

Carnevale, J., Palander, O., Seifried, L.A., and Dick, F.A. (2012). DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. Mol Cell Biol *32*, 900-912.

Carr, S.M., Munro, S., Kessler, B., Oppermann, U., and La Thangue, N.B. (2011). Interplay between lysine methylation and Cdk phosphorylation in growth control by the retinoblastoma protein. Embo J *30*, 317-327.

Cassidy-Stone, A., Chipuk, J.E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M.J., Shaw, J.T., Hinshaw, J.E., Green, D.R.*, et al.* (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. Dev Cell *14*, 193-204.

Castanier, C., and Arnoult, D. (2010). [Mitochondrial dynamics during apoptosis]. Med Sci (Paris) *26*, 830-835.

Cayirlioglu, P., Bonnette, P.C., Dickson, M.R., and Duronio, R.J. (2001). Drosophila E2f2 promotes the conversion from genomic DNA replication to gene amplification in ovarian follicle cells. Development *128*, 5085-5098.

Cayirlioglu, P., Ward, W.O., Silver Key, S.C., and Duronio, R.J. (2003). Transcriptional repressor functions of Drosophila E2F1 and E2F2 cooperate to inhibit genomic DNA synthesis in ovarian follicle cells. Mol Cell Biol *23*, 2123-2134.

Cecchini, M.J., and Dick, F.A. (2011). The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. Biochem J *434*, 297-308.

Ceol, C.J., Stegmeier, F., Harrison, M.M., and Horvitz, H.R. (2006). Identification and classification of genes that act antagonistically to let-60 Ras signaling in Caenorhabditis elegans vulval development. Genetics *173*, 709-726.

Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 15803-15808.

Cha, G.H., Cho, K.S., Lee, J.H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S.B., and Chung, J. (2003). Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in Drosophila melanogaster mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. Mol Cell Biol *23*, 7982-7991.

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature *406*, 855-862.

Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.W., Li, W., Hay, B.A., and Shi, Y. (2003). Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. Nat Struct Biol *10*, 892-898. .

Challa, M., Malladi, S., Pellock, B.J., Dresnek, D., Varadarajan, S., Yin, Y.W., White, K., and Bratton, S.B. (2007). Drosophila Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. Embo J *26*, 3144-3156.

Chan, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. Annu Rev Genet *46*, 265-287.

Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. Hum Mol Genet *20*, 1726-1737.

Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007a). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. J Biol Chem *282*, 21583-21587.

Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007b). Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. EMBO Rep *8*, 1088-1089; author reply 1089-1090.

Chang, C.R., and Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Ann N Y Acad Sci *1201*, 34-39.

Chau, B.N., and Wang, J.Y. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. Nat Rev Cancer *3*, 130-138.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J Cell Biol *160*, 189-200.

Chen, H.Z., Tsai, S.Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. Nat Rev Cancer *9*, 785-797.

Chen, P., Ho, S.I., Shi, Z., and Abrams, J.M. (2004). Bifunctional killing activity encoded by conserved reaper proteins. Cell Death Differ *11*, 704-713.

Chen, P., Lee, P., Otto, L., and Abrams, J. (1996a). Apoptotic activity of REAPER is distinct from signaling by the tumor necrosis factor receptor 1 death domain. J Biol Chem *271*, 25735-25737.

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., and Abrams, J.M. (1996b). Grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. Genes Dev *10*, 1773-1782.

Chen, P., Rodriguez, A., Erskine, R., Thach, T., and Abrams, J.M. (1998). Dredd, a novel effector of the apoptosis activators Reaper, Grim, and Hid in *Drosophila*. Dev Biol *201*, 202-216.

Chen, P.L., Riley, D.J., Chen-Kiang, S., and Lee, W.H. (1996c). Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 465-469.

Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y., and Lee, W.H. (1996d). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. Genes Dev *10*, 2794-2804.

Chen, T., and Richard, S. (1998). Structure-function analysis of Qk1: a lethal point mutation in mouse quaking prevents homodimerization. Mol Cell Biol *18*, 4863-4871.

Chen, W., White, M.A., and Cobb, M.H. (2002). Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. J Biol Chem *277*, 49105-49110.

Chen, Y., and Dorn, G.W., 2nd (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. Science *340*, 471-475.

Cheng, W.C., Berman, S.B., Ivanovska, I., Jonas, E.A., Lee, S.J., Chen, Y., Kaczmarek, L.K., Pineda, F., and Hardwick, J.M. (2006). Mitochondrial factors with dual roles in death and survival. Oncogene *25*, 4697-4705.

Chew, S.K., Akdemir, F., Chen, P., Lu, W.J., Mills, K., Daish, T., Kumar, S., Rodriguez, A., and Abrams, J.M. (2004). The apical caspase dronc governs programmed and unprogrammed cell death in *Drosophila*. Dev Cell *7*, 897-907.

Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R.A., Narita, M., Zhang, M., and Lowe, S.W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. Cancer Cell *17*, 376-387.

Chinnam, M., and Goodrich, D.W. (2011). RB1, development, and cancer. Curr Top Dev Biol *94*, 129-169.

Chong, J.L., Wenzel, P.L., Saenz-Robles, M.T., Nair, V., Ferrey, A., Hagan, J.P., Gomez, Y.M., Sharma, N., Chen, H.Z., Ouseph, M.*, et al.* (2009). E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. Nature *462*, 930-934.

Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. Cell *128*, 1063-1076.

Christich, A., Kauppila, S., Chen, P., Sogame, N., Ho, S.I., and Abrams, J.M. (2002). The damage-responsive *Drosophila* gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from *reaper*, *grim* and *hid*. Curr Biol *12*, 137-140.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 15927-15932.

Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. Nature *441*, 1162-1166.

Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. Nature *359*, 328-330.

Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nat Rev Cancer *2*, 910-917.

Claudio, P.P., Tonini, T., and Giordano, A. (2002). The retinoblastoma family: twins or distant cousins? Genome Biol *3*, reviews3012.

Claveria, C., Albar, J.P., Serrano, A., Buesa, J.M., Barbero, J.L., Martinez, A.C., and Torres, M. (1998). *Drosophila grim* induces apoptosis in mammalian cells. Embo J *17*, 7199-7208.

Claveria, C., Caminero, E., Martinez, A.C., Campuzano, S., and Torres, M. (2002). GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. Embo J *21*, 3327-3336.

Claveria, C., Martinez, A.C., and Torres, M. (2004). A Bax/Bak-independent mitochondrial death pathway triggered by *Drosophila* Grim GH3 domain in mammalian cells. J Biol Chem *279*, 1368-1375.

Claveria, C., and Torres, M. (2003). Mitochondrial apoptotic pathways induced by *Drosophila* programmed cell death regulators. Biochem Biophys Res Commun *304*, 531-537.

Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene *24*, 2796-2809.

Colin, J., Garibal, J., Clavier, A., Rincheval-Arnold, A., Gaumer, S., Mignotte, B., and Guenal, I. (2014). The drosophila Bcl-2 family protein Debcl is targeted to the proteasome by the beta-TrCP homologue slimb. Apoptosis *19*, 1444-1456.

Collins, H., and Moon, N.S. (2013). The components of Drosophila histone chaperone dCAF-1 are required for the cell death phenotype associated with rbf1 mutation. G3 (Bethesda) *3*, 1639-1647.

Colombani, J., Andersen, D.S., and Leopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. Science *336*, 582-585.

Colon-Ramos, D.A., Shenvi, C.L., Weitzel, D.H., Gan, E.C., Matts, R., Cate, J., and Kornbluth, S. (2006). Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation. Nature structural & molecular biology *13*, 103-111.

Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H., and Kumar, S. (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. J Cell Biol *148*, 703-714.

Connell, P.P., and Weichselbaum, R.R. (2011). A downside to apoptosis in cancer therapy? Nat Med *17*, 780-782.

Connolly, P.F., Jager, R., and Fearnhead, H.O. (2014). New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. Front Physiol *5*, 149.

Cooper, D.M., Granville, D.J., and Lowenberger, C. (2009). The insect caspases. Apoptosis *14*, 247-256.

Copeland, J.M., Bosdet, I., Freeman, J.D., Guo, M., Gorski, S.M., and Hay, B.A. (2007). echinus, required for interommatidial cell sorting and cell death in the Drosophila pupal retina, encodes a protein with homology to ubiquitin-specific proteases. BMC Dev Biol *7*, 82.

Cosentino, K., and Garcia-Saez, A.J. (2014). Mitochondrial alterations in apoptosis. Chem Phys Lipids *181*, 62-75.

Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. EMBO Rep *8*, 939-944.

Cronan, M.R., Nakamura, K., Johnson, N.L., Granger, D.A., Cuevas, B.D., Wang, J.G., Mackman, N., Scott, J.E., Dohlman, H.G., and Johnson, G.L. (2012). Defining MAP3 kinases required for MDA-MB-231 cell tumor growth and metastasis. Oncogene *31*, 3889-3900.

Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. Oncogene *21*, 1359-1369.

Cryns, V., and Yuan, J. (1998). Proteases to die for. Genes and Dev *12*, 1551-1570.

Cuevas, B.D., Abell, A.N., and Johnson, G.L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. Oncogene *26*, 3159-3171.

D'Brot, A., Chen, P., Vaishnav, M., Yuan, S., Akey, C.W., and Abrams, J.M. (2013). Tango7 directs cellular remodeling by the Drosophila apoptosome. Genes Dev *27*, 1650-1655.

Daish, T.J., Mills, K., and Kumar, S. (2004). *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. Dev Cell *7*, 909-915.

Datar, S.A., Jacobs, H.W., de la Cruz, A.F., Lehner, C.F., and Edgar, B.A. (2000). The Drosophila cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. Embo J *19*, 4543-4554.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell *103*, 239-252.

de Bruin, A., Wu, L., Saavedra, H.I., Wilson, P., Yang, Y., Rosol, T.J., Weinstein, M., Robinson, M.L., and Leone, G. (2003). Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6546-6551.

Debattisti, V., and Scorrano, L. (2013). D. melanogaster, mitochondria and neurodegeneration: small model organism, big discoveries. Mol Cell Neurosci *55*, 77-86.

DeCaprio, J.A. (2014). Human papillomavirus type 16 E7 perturbs DREAM to promote cellular proliferation and mitotic gene expression. Oncogene *33*, 4036-4038.

DeCaprio, J.A., and Duensing, A. (2014). The DREAM complex in antitumor activity of imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors. Curr Opin Oncol *26*, 415-421.

DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. Curr Mol Med *6*, 739-748.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E*., et al.* (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet *26*, 207-210.

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

Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., and Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 14503-14508.

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

Denton, D., Aung-Htut, M.T., Lorensuhewa, N., Nicolson, S., Zhu, W., Mills, K., Cakouros, D., Bergmann, A., and Kumar, S. (2013b). UTX coordinates steroid hormone-mediated autophagy and cell death. Nat Commun *4*, 2916.

Denton, D., Shravage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D.L., Baehrecke, E.H., and Kumar, S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila. Curr Biol *19*, 1741-1746.

Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol *10*, 369-377.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. Oncogene *27*, 6245-6251.

Dichtel-Danjoy, M.L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafsi, H., Hainaut, P.*, et al.* (2013). Drosophila p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. Cell Death Differ *20*, 108-116.

Dick, F.A., and Dyson, N. (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. Mol Cell *12*, 639-649.

Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. Nature reviews Molecular cell biology *14*, 297-306.

Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V., and Dyson, N.J. (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. Genes Dev *17*, 2308-2320.

Ditzel, M., Broemer, M., Tenev, T., Bolduc, C., Lee, T.V., Rigbolt, K.T., Elliott, R., Zvelebil, M., Blagoev, B., Bergmann, A.*, et al.* (2008). Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation. Mol Cell *32*, 540-553.

Ditzel, M., Wilson, R., Tenev, T., Zachariou, A., Paul, A., Deas, E., and Meier, P. (2003). Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. Nat Cell Biol *5*, 467-473.

Dobens, L.L., Martin-Blanco, E., Martinez-Arias, A., Kafatos, F.C., and Raftery, L.A. (2001). Drosophila puckered regulates Fos/Jun levels during follicle cell morphogenesis. Development *128*, 1845-1856.

Dorn, G.W., 2nd (2015). Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. EMBO Mol Med.

Dorstyn, L., Colussi, P.A., Quinn, L.M., Richardson, H., and Kumar, S. (1999a). DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 4307-4312.

Dorstyn, L., and Kumar, S. (2006). A cytochrome c-free fly apoptosome. Cell Death Differ *13*, 1049-1051.

Dorstyn, L., and Kumar, S. (2008). A biochemical analysis of the activation of the Drosophila caspase DRONC. Cell Death Differ *15*, 461-470.

Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y., and Kumar, S. (2004). The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. J Cell Biol *167*, 405-410.

Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J.R., Hay, B.A., and Kumar, S. (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. J Cell Biol *156*, 1089-1098.

Dorstyn, L., Read, S.H., Quinn, L.M., Richardson, H., and Kumar, S. (1999b). DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. J Biol Chem *274*, 30778-30783.

Doumanis, J., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2007). Molecular determinants of the subcellular localization of the Drosophila Bcl-2 homologues DEBCL and BUFFY. Cell Death Differ *14*, 907-915.

Doumanis, J., Quinn, L., Richardson, H., and Kumar, S. (2001). STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. Cell Death Differ *8*, 387-394.

Draizen, T.A., Ewer, J., and Robinow, S. (1999). Genetic and hormonal regulation of the death of peptidergic neurons in the Drosophila central nervous system. J Neurobiol *38*, 455-465.

Du Toit, A. (2013). Cell signalling: Linking JNK and Hippo signalling. Nat Rev Mol Cell Biol *14*, 690.

Du, W. (2000). Suppression of the rbf null mutants by a de2f1 allele that lacks transactivation domain. Development *127*, 367-379.

Du, W., and Dyson, N. (1999). The role of RBF in the introduction of G1 regulation during Drosophila embryogenesis. Embo J *18*, 916-925.

Du, W., and Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. Oncogene *25*, 5190-5200.

Du, W., Vidal, M., Xie, J.E., and Dyson, N. (1996a). RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in Drosophila. Genes Dev *10*, 1206-1218.

Du, W., Xie, J.E., and Dyson, N. (1996b). Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the Drosophila eye. Embo J *15*, 3684-3692.

Duronio, R.J., Bonnette, P.C., and PH, O.F. (1998). Mutations of the *Drosophila* dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition [published erratum appears in Mol Cell Biol 1998 May;18(5):3101]. Mol Cell Biol *18*, 141-151.

Duronio, R.J., O'Farrell, P.H., Xie, J.E., Brook, A., and Dyson, N. (1995). The transcription factor E2F is required for S phase during Drosophila embryogenesis. Genes Dev *9*, 1445-1455.

Dynlacht, B.D., Brook, A., Dembski, M., Yenush, L., and Dyson, N. (1994). DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 6359-6363.

Dyson, N. (2003). Developmental biology: A twist in a mouse tale. Nature *421*, 903-904.

Elenbaas, J.S., Mouawad, R., Henry, R.W., Arnosti, D.N., and Payankaulam, S. (2015). Role of Drosophila retinoblastoma protein instability element in cell growth and proliferation. Cell Cycle *14*, 589-597.

Elkholi, R., Renault, T.T., Serasinghe, M.N., and Chipuk, J.E. (2014). Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? Cancer Metab *2*, 16.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., and Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila. Curr Biol *10*, 781-784.

Emili, A., and Ingles, C.J. (1995). Promoter-dependent photocross-linking of the acidic transcriptional activator E2F-1 to the TATA-binding protein. J Biol Chem *270*, 13674-13680.

Enderle, D., Beisel, C., Stadler, M.B., Gerstung, M., Athri, P., and Paro, R. (2011). Polycomb preferentially targets stalled promoters of coding and noncoding transcripts. Genome research *21*, 216-226.

Engelmann, D., and Putzer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. Drug Resist Updat *13*, 119-131.

Estaquier, J., and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. Cell Death Differ *14*, 1086-1094.

Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.L., and Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. Adv Exp Med Biol *942*, 157-183.

Evans, E.K., Kuwana, T., Strum, S.L., Smith, J.J., Newmeyer, D.D., and Kornbluth, S. (1997). Reaper-induced apoptosis in a vertebrate system. EMBO J *16*, 7372-7381.

Fan, Y., and Bergmann, A. (2008a). Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! Trends Cell Biol *18*, 467-473.

Fan, Y., and Bergmann, A. (2008b). Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the Drosophila eye. Dev Cell *14*, 399-410.

Fan, Y., Wang, S., Hernandez, J., Yenigun, V.B., Hertlein, G., Fogarty, C.E., Lindblad, J.L., and Bergmann, A. (2014). Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in Drosophila. PLoS Genet *10*, e1004131.

Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer *4*, 143-153.

Ferecatu, I., Le Floch, N., Bergeaud, M., Rodriguez-Enfedaque, A., Rincheval, V., Oliver, L., Vallette, F.M., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2009). Evidence for a mitochondrial localization of the retinoblastoma protein. BMC cell biology *10*, 50.

Fernando, M.D., Kounatidis, I., and Ligoxygakis, P. (2014). Loss of Trabid, a new negative regulator of the drosophila immune-deficiency pathway at the level of TAK1, reduces life span. PLoS Genet *10*, e1004117.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.J., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. Cell *85*, 549-561.

Firth, L.C., and Baker, N.E. (2005). Extracellular signals responsible for spatially regulated proliferation in the differentiating Drosophila eye. Dev Cell *8*, 541-551.

Fischer, M., Quaas, M., Wintsche, A., Muller, G.A., and Engeland, K. (2014). Polo-like kinase 4 transcription is activated via CRE and NRF1 elements, repressed by DREAM through CDE/CHR sites and deregulated by HPV E7 protein. Nucleic Acids Res *42*, 163-180.

Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ *10*, 76-100.

Fogal, V., Hsieh, J.K., Royer, C., Zhong, S., and Lu, X. (2005). Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. Embo J *24*, 2768-2782.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Dev Cell *1*, 515-525.

Fraser, A.G., and Evan, G.I. (1997). Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. Embo J *16*, 2805-2813.

Fraser, A.G., McCarthy, N.J., and Evan, G.I. (1997). drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. Embo J *16*, 6192-6199.

Freel, C.D., Richardson, D.A., Thomenius, M.J., Gan, E.C., Horn, S.R., Olson, M.R., and Kornbluth, S. (2008). Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. J Biol Chem *283*, 367-379.

Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B.*, et al.* (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. Cell *126*, 177-189.

Frolov, M.V., and Dyson, N.J. (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. J Cell Sci *117*, 2173-2181.

Frolov, M.V., Huen, D.S., Stevaux, O., Dimova, D., Balczarek-Strang, K., Elsdon, M., and Dyson, N.J. (2001). Functional antagonism between E2F family members. Genes Dev *15*, 2146-2160.

Frolov, M.V., Moon, N.S., and Dyson, N.J. (2005). dDP is needed for normal cell proliferation. Mol Cell Biol *25*, 3027-3039.

Frolov, M.V., Stevaux, O., Moon, N.S., Dimova, D., Kwon, E.J., Morris, E.J., and Dyson, N.J. (2003). G1 cyclin-dependent kinases are insufficient to reverse dE2F2-mediated repression. Genes Dev *17*, 723-728.

Galindo, K.A., Lu, W.J., Park, J.H., and Abrams, J.M. (2009). The Bax/Bak ortholog in Drosophila, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. Development *136*, 275-283.

Galko, M.J., and Krasnow, M.A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae. PLoS biology *2*, E239.

Gandre-Babbe, S., and van der Bliek, A.M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol Biol Cell *19*, 2402-2412.

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

Gauron, C., Rampon, C., Bouzaffour, M., Ipendey, E., Teillon, J., Volovitch, M., and Vriz, S. (2013). Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. Sci Rep *3*, 2084.

Georlette, D., Ahn, S., MacAlpine, D.M., Cheung, E., Lewis, P.W., Beall, E.L., Bell, S.P., Speed, T., Manak, J.R., and Botchan, M.R. (2007). Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the Drosophila Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. Genes & development *21*, 2880-2896.

Geuking, P., Narasimamurthy, R., and Basler, K. (2005). A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of Drosophila TAB2 as a functionally conserved component. Genetics *171*, 1683-1694.

Ginsberg, D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. FEBS Lett *529*, 122-125.

Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. Nat Cell Biol *13*, 589-598.

Goodrich, D.W. (2003). How the other half lives, the amino-terminal domain of the retinoblastoma tumor suppressor protein. J Cell Physiol *197*, 169-180.

Goodrich, D.W. (2006). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. Oncogene *25*, 5233-5243.

Gordon, G.M., and Du, W. (2011). Conserved RB functions in development and tumor suppression. Protein Cell *2*, 864-878.

Goyal, G., Fell, B., Sarin, A., Youle, R.J., and Sriram, V. (2007). Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in Drosophila melanogaster. Dev Cell *12*, 807-816.

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwieg, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila reaper*, *hid* and *grim* through inhibition of IAP function. Embo J *19*, 589-597.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science *305*, 626-629.

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

Griswold, A.J., Chang, K.T., Runko, A.P., Knight, M.A., and Min, K.T. (2008). Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 8673-8678.

Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in Drosophila melanogaster. Dev Biol *350*, 255-266.

Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. Cell *72*, 309-324.

Guo, M. (2012). Drosophila as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Guo, Z., Yikang, S., Yoshida, H., Mak, T.W., and Zacksenhaus, E. (2001). Inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor induces apoptosis protease-activating factor-1 dependent and independent apoptotic pathways during embryogenesis. Cancer Res *61*, 8395-8400.

Gupta, S.C., Mishra, M., Sharma, A., Deepak Balaji, T.G., Kumar, R., Mishra, R.K., and Chowdhuri, D.K. (2010). Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in Drosophila through generation of reactive oxygen species. Ecotoxicol Environ Saf *73*, 1415-1423.

Hagemeier, C., Cook, A., and Kouzarides, T. (1993). The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. Nucleic Acids Res *21*, 4998-5004.

Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. Embo J *24*, 3353-3359.

Haining, W.N., Carboy-Newcomb, C., Wei, C.L., and Steller, H. (1999). The proapoptotic function of *Drosophila* Hid is conserved in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 4936-4941.

Hales, K.G., and Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. Cell *90*, 121-129.

Halme, A., Cheng, M., and Hariharan, I.K. (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in Drosophila. Curr Biol *20*, 458-463.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57-70.

Hao, H., Dong, Y., Bowling, M.T., Gomez-Gutierrez, J.G., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. BMC Cancer *7*, 24.

Hao, X.F., Alphey, L., Bandara, L.R., Lam, E.W., Glover, D., and La, T.N. (1995). Functional conservation of the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F and its pathway of control in *Drosophila melanogaster*. J Cell Sci *108*, 2945-2954.

Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell *98*, 859-869.

Harden, N. (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in Drosophila. Differentiation *70*, 181-203.

Harrison, M.M., Ceol, C.J., Lu, X., and Horvitz, H.R. (2006). Some C. elegans class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 16782-16787.

Harvey, N.L., Daish, T., Mills, K., Dorstyn, L., Quinn, L.M., Read, S.H., Richardson, H., and Kumar, S. (2001). Characterization of the *Drosophila* caspase, damm. J Biol Chem *276*, 25342-25350.

Hawkins, C.J., Wang, S.L., and Hay, B.A. (1999). A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of Drosophila IAP1 as an inhibitor of the Drosophila caspase DCP-1. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 2885-2890.

Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y., and Hay, B.A. (2000). The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. J Biol Chem *275*, 27084-27093.

Hay, B.A. (2000). Understanding IAP function and regulation: a view from Drosophila. Cell Death Differ *7*, 1045-1056.

Hay, B.A., and Guo, M. (2006). Caspase-dependent cell death in Drosophila. Annu Rev Cell Dev Biol *22*, 623-650.

Hay, B.A., Huh, J.R., and Guo, M. (2004). The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. Nat Rev Genet *5*, 911-922.

Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. Cell *83*, 1253-1262.

Haynie, J., and Bryant, P. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics of Cells in the imagina wing disc of Drosophila melanogaster. Roux's Arch *183:85-100*.

Hays, R., Wickline, L., and Cagan, R. (2002). Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1. Nat Cell Biol *4*, 425-431.

Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E., and Fattaey, A. (1992). A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. Cell *70*, 337-350.

Henley, S.A., and Dick, F.A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. Cell Div *7*, 10.

Herman-Bachinsky, Y., Ryoo, H.D., Ciechanover, A., and Gonen, H. (2007). Regulation of the Drosophila ubiquitin ligase DIAP1 is mediated via several distinct ubiquitin system pathways. Cell Death Differ *14*, 861-871.

Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Sierra, J.M., and Rivera-Pomar, R. (2004). Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in Drosophila embryos. RNA *10*, 1783-1797.

Herrera, S.C., Martin, R., and Morata, G. (2013). Tissue homeostasis in the wing disc of Drosophila melanogaster: immediate response to massive damage during development. PLoS genetics *9*, e1003446.

Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. J Biol Chem *279*, 8627-8634.

Hershko, T., Korotayev, K., Polager, S., and Ginsberg, D. (2006). E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 and Wip1. J Biol Chem *281*, 31309-31316.

Hickman, E.S., Moroni, M.C., and Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. Curr Opin Genet Dev *12*, 60-66.

Hiebert, S.W. (1993). Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. Mol Cell Biol *13*, 3384-3391.

Hiebert, S.W., Packham, G., Strom, D.K., Haffner, R., Oren, M., Zambetti, G., and Cleveland, J.L. (1995). E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. Mol Cell Biol *15*, 6864-6874.

Hilgendorf, K.I., Leshchiner, E.S., Nedelcu, S., Maynard, M.A., Calo, E., Ianari, A., Walensky, L.D., and Lees, J.A. (2013). The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. Genes & development *27*, 1003-1015.

Hirose, F., Ohshima, N., Shiraki, M., Inoue, Y.H., Taguchi, O., Nishi, Y., Matsukage, A., and Yamaguchi, M. (2001). Ectopic expression of DREF induces DNA synthesis, apoptosis, and unusual morphogenesis in the Drosophila eye imaginal disc: possible interaction with Polycomb and trithorax group proteins. Mol Cell Biol *21*, 7231-7242.

Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. Nature *458*, 422-429.

Holley, C.L., Olson, M.R., Colon-Ramos, D.A., and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. Nat Cell Biol *4*, 439-444.

Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., and Karlstrom, O. (1998). E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. Oncogene *17*, 143-155.

Hong, F.D., Huang, H.-J.S., To, H., Young, L.-J.S., and Oro, A. (1989). Structure of the human retinoblastoma gene. Proc Natl Acad Sci USA *86*, 5502-5506.

Hou, D.X., Akimaru, H., and Ishii, S. (1997). Trans-activation by the Drosophila myb gene product requires a Drosophila homologue of CBP. FEBS Lett *413*, 60-64.

Hou, Y.C., Chittaranjan, S., Barbosa, S.G., McCall, K., and Gorski, S.M. (2008). Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during Drosophila melanogaster oogenesis. J Cell Biol *182*, 1127-1139.

Hsieh, J.K., Chan, F.S., O'Connor, D.J., Mittnacht, S., Zhong, S., and Lu, X. (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. Mol Cell *3*, 181-193.

Hsieh, J.K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. Genes Dev *11*, 1840-1852.

Hsieh, J.K., Yap, D., O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., and Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. Mol Cell Biol *22*, 78-93.

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

Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.C*., et al.* (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. Nat Med *17*, 860-866.

Huang, Q., Tang, X., Wang, G., Fan, Y., Ray, L., Bergmann, A., Belenkaya, T.Y., Ling, X., Yan, D., Lin, Y*., et al.* (2014). Ubr3 E3 ligase regulates apoptosis by controlling the activity of DIAP1 in Drosophila. Cell Death Differ *21*, 1961-1970.

Huh, J.R., Foe, I., Muro, I., Chen, C.H., Seol, J.H., Yoo, S.J., Guo, M., Park, J.M., and Hay, B.A. (2007). The Drosophila inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers. J Biol Chem *282*, 2056-2068.

Huh, J.R., Guo, M., and Hay, B.A. (2004a). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. Curr Biol *14*, 1262-1266.

Huh, J.R., Vernooy, S.Y., Yu, H., Yan, N., Shi, Y., Guo, M., and Hay, B.A. (2004b). Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. PLoS Biol *2*, E15. .

Huh, M.S., Parker, M.H., Scime, A., Parks, R., and Rudnicki, M.A. (2004c). Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. J Cell Biol *166*, 865-876.

Hunt, K.K., Deng, J., Liu, T.J., Wilson-Heiner, M., Swisher, S.G., Clayman, G., and Hung, M.C. (1997). Adenovirus-mediated overexpression of the transcription factor E2F-1 induces apoptosis in human breast and ovarian carcinoma cell lines and does not require p53. Cancer Res *57*, 4722-4726.

Hwa, J.J., Hiller, M.A., Fuller, M.T., and Santel, A. (2002). Differential expression of the Drosophila mitofusin genes fuzzy onions (fzo) and dmfn. Mech Dev *116*, 213-216.

Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. J Biol Chem *279*, 30830-30835.

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., and Lees, J.A. (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. Cancer Cell *15*, 184-194.

Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling. Apoptosis *14*, 1021-1028.

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

Igaki, T., Kanuka, H., Inohara, N., Sawamoto, K., Nunez, G., Okano, H., and Miura, M. (2000). Drob-1, a *Drosophila* member of the bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. Proc Natl Acad Sci USA *97*, 662-667.

Igaki, T., and Miura, M. (2004). Role of Bcl-2 family members in invertebrates. Biochim Biophys Acta *1644*, 73-81.

Igaki, T., and Miura, M. (2014). The Drosophila TNF ortholog Eiger: emerging physiological roles and evolution of the TNF system. Semin Immunol *26*, 267-274.

Igaki, T., Pagliarini, R.A., and Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in Drosophila. Curr Biol *16*, 1139-1146.

Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H., Takahashi, R., and Miura, M. (2007). Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila. Biochem Biophys Res Commun *356*, 993-997.

Igaki, T., Yamamoto-Goto, Y., Tokushige, N., Kanda, H., and Miura, M. (2002b). Down-regulation of DIAP1 triggers a novel *Drosophila* cell death pathway mediated by Dark and DRONC. J Biol Chem *277*, 23103-23106.

Inoue-Yamauchi, A., and Oda, H. (2012). Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun *421*, 81-85.

Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. J Cell Sci *117*, 6535-6546.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. Embo J *25*, 2966-2977.

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y.*, et al.* (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. Nat Cell Biol *11*, 958-966.

Ishii, T., Miyazawa, M., Onouchi, H., Yasuda, K., Hartman, P.S., and Ishii, N. (2013). Model animals for the study of oxidative stress from complex II. Biochim Biophys Acta *1827*, 588-597.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. (1992). Effects of an rb mutation in the mouse. Nature *359*, 295-300.

Jackson, J., Ramsay, G., Sharkov, N.V., Lium, E., and Katzen, A.L. (2001). The role of transcriptional activation in the function of the Drosophila myb gene. Blood Cells Mol Dis *27*, 446-455.

Jager, R., and Fearnhead, H.O. (2012). "Dead Cells Talking": The Silent Form of Cell Death Is Not so Quiet. Biochem Res Int *2012*, 453838.

Jahani-Asl, A., Cheung, E.C., Neuspiel, M., MacLaurin, J.G., Fortin, A., Park, D.S., McBride, H.M., and Slack, R.S. (2007). Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. J Biol Chem *282*, 23788-23798.

Jahani-Asl, A., and Slack, R.S. (2007). The phosphorylation state of Drp1 determines cell fate. EMBO Rep *8*, 912-913.

James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. J Biol Chem *278*, 36373-36379.

Janicke, R.U., Walker, P.A., Lin, X.Y., and Porter, A.G. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. Embo J *15*, 6969-6978.

Jiang, C., Lamblin, A.F., Steller, H., and Thummel, C.S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. Mol Cell *5*, 445-455.

Jiang, C.G., Baerhecke, E.H., and Thummel, C.S. (1997). Steroid regulated programmed cell deatn during *Drosophila* metamorphosis. Development *124*, 4673-4683.

Jiang, H., Patel, P.H., Kohlmaier, A., Grenley, M.O., McEwen, D.G., and Edgar, B.A. (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the Drosophila midgut. Cell *137*, 1343-1355.

Johnson, G.L., and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. Biochim Biophys Acta *1773*, 1341-1348.

Jones, G., Jones, D., Zhou, L., Steller, H., and Chu, Y. (2000). Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem *275*, 22157-22165.

Joza, N., Galindo, K., Pospisilik, J.A., Benit, P., Rangachari, M., Kanitz, E.E., Nakashima, Y., Neely, G.G., Rustin, P., Abrams, J.M.*, et al.* (2008). The molecular archaeology of a mitochondrial death effector: AIF in Drosophila. Cell Death Differ *15*, 1009-1018.

Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. Nat Rev Cancer *13*, 455-465.

Julian, L.M., Palander, O., Seifried, L.A., Foster, J.E., and Dick, F.A. (2008). Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRB and its implications for apoptotic regulation. Oncogene *27*, 1572-1579.

Kaiser, W.J., Vucic, D., and Miller, L.K. (1998). The *Drosophila* inhibitor of apoptosis D-IAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. FEBS Lett *440*, 243-248.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell *120*, 649-661.

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

Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., and Miura, M. (2011). Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 18977-18982.

Kanda, H., and Miura, M. (2004). Regulatory roles of JNK in programmed cell death. J Biochem *136*, 1-6.

Kang, J., Yeom, E., Lim, J., and Choi, K.W. (2014). Bar represses dPax2 and decapentaplegic to regulate cell fate and morphogenetic cell death in Drosophila eye. PLoS One *9*, e88171.

Kanuka, H., Hisahara, S., Sawamoto, K., Shoji, S., Okano, H., and Miura, M. (1999a). Proapoptotic activity of *Caenorhabditis elegans* CED-4 protein in *Drosophila*: implicated mechanisms for caspase activation. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 145-150.

Kanuka, H., Sawamoto, K., Inohara, N., Matsuno, K., Okano, H., and Miura, M. (1999b). Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/Ced-4-related caspase activator. Mol Cell *4*, 757-769.

Kaplan, Y., Gibbs-Bar, L., Kalifa, Y., Feinstein-Rotkopf, Y., and Arama, E. (2010). Gradients of a ubiquitin E3 ligase inhibitor and a caspase inhibitor determine differentiation or death in spermatids. Dev Cell *19*, 160-173.

Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. J Cell Biol *159*, 931-938.

Kashio, S., Obata, F., and Miura, M. (2014). Interplay of cell proliferation and cell death in Drosophila tissue regeneration. Dev Growth Differ *56*, 368-375.

Kauppila, S., Maaty, W.S., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, M.T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K*., et al.* (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. Oncogene *22*, 4860-4867.

Kaye, F.J., and Harbour, J.W. (2004). For whom the bell tolls: susceptibility to common adult cancers in retinoblastoma survivors. J Natl Cancer Inst *96*, 342-343.

Keller, S.A., Ullah, Z., Buckley, M.S., Henry, R.W., and Arnosti, D.N. (2005). Distinct developmental expression of Drosophila retinoblastoma factors. Gene Expr Patterns *5*, 411-421.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.

Khan, F.S., Fujioka, M., Datta, P., Fernandes-Alnemri, T., Jaynes, J.B., and Alnemri, E.S. (2008). The interaction of DIAP1 with dOmi/HtrA2 regulates cell death in Drosophila. Cell Death Differ *15*, 1073-1083.

Kiessling, S., and Green, D.R. (2006). Cell survival and proliferation in Drosophila S2 cells following apoptotic stress in the absence of the APAF-1 homolog, ARK, or downstream caspases. Apoptosis *11*, 497-507.

Kim, C.H., Paik, D., Rus, F., and Silverman, N. (2014). The caspase-8 homolog Dredd cleaves Imd and Relish but is not inhibited by p35. J Biol Chem *289*, 20092-20101.

Kim, H.Y., and Cho, Y. (1997). Structural similarity between the pocket region of retinoblastoma tumour suppressor and the cyclin-box. Nat Struct Biol *4*, 390-395.

Kleino, A., and Silverman, N. (2014). The Drosophila IMD pathway in the activation of the humoral immune response. Dev Comp Immunol *42*, 25-35.

Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nat Rev Neurosci *9*, 505-518.

Knudsen, E.S., and Knudsen, K.E. (2008). Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. Nat Rev Cancer *8*, 714-724.

Knudsen, E.S., Sexton, C.R., and Mayhew, C.N. (2006). Role of the retinoblastoma tumor suppressor in the maintenance of genome integrity. Curr Mol Med *6*, 749-757.

Knudsen, K.E., Weber, E., Arden, K.C., Cavenee, W.K., Feramisco, J.R., and Knudsen, E.S. (1999). The retinoblastoma tumor suppressor inhibits cellular proliferation through two distinct mechanisms: inhibition of cell cycle progression and induction of cell death. Oncogene *18*, 5239-5245.

Kolupaeva, V., and Janssens, V. (2012). PP1 and PP2A phosphatases--cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. FEBS J *280*, 627-643.

Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y., and Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. Mol Cell Biol *26*, 7258-7268.

Korenjak, M., and Brehm, A. (2005). E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. Curr Opin Genet Dev *15*, 520-527.

Korenjak, M., Kwon, E., Morris, R.T., Anderssen, E., Amzallag, A., Ramaswamy, S., and Dyson, N.J. (2014). dREAM co-operates with insulator-binding proteins and regulates expression at divergently paired genes. Nucleic Acids Res *42*, 8939-8953.

Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binne, U.K., Satterlee, J.S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., and Brehm, A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. Cell *119*, 181-193.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science *305*, 858-862.

Krieser, R.J., and White, K. (2009). Inside an enigma: do mitochondria contribute to cell death in Drosophila? Apoptosis *14*, 961-968.

Krivy, K., Bradley-Gill, M.R., and Moon, N.S. (2013). Capicua regulates proliferation and survival of RB-deficient cells in Drosophila. Biol Open *2*, 183-190.

Kubli, D.A., Ycaza, J.E., and Gustafsson, A.B. (2007). Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. Biochem J *405*, 407-415.

Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. Cell Death Differ *6*, 1060-1066.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ *14*, 32-43.

Kumar, S., and Colussi, P.A. (1999). Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. Trends Biochem Sci *24*, 1-4.

Kumar, S., and Doumanis, J. (2000). The fly caspases. Cell Death Differ *7*, 1039-1044.

Kurada, P., and White, K. (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating *hid*. Cell *95*, 319-329.

Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H., and Miura, M. (2002). Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. Nat Cell Biol *4*, 705-710.

Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S., and Miura, M. (2006). Drosophila IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. Cell *126*, 583-596.

Lackner, L.L., and Nunnari, J. (2010). Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. Chem Biol *17*, 578-583.

Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.C., Courilleau, D., Guillou, E*., et al.* (2010). OPA1 (dys)functions. Semin Cell Dev Biol *21*, 593-598.

Landes, T., and Martinou, J.C. (2011). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta *1813*, 540-545.

Lang, S.E., McMahon, S.B., Cole, M.D., and Hearing, P. (2001). E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. J Biol Chem *276*, 32627-32634.

Laundrie, B., Peterson, J.S., Baum, J.S., Chang, J.C., Fileppo, D., Thompson, S.R., and McCall, K. (2003). Germline cell death is inhibited by P-element insertions disrupting the dcp-1/pita nested gene pair in *Drosophila*. Genetics *165*, 1881-1888.

Le Floch, N., Rincheval, V., Ferecatu, I., Ali-Boina, R., Renaud, F., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2010). The p76(Rb) and p100(Rb) truncated forms of the Rb protein exert antagonistic roles on cell death regulation in human cell lines. Biochemical and biophysical research communications *399*, 173-178.

Lee, C., Chang, J.H., Lee, H.S., and Cho, Y. (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. Genes Dev *16*, 3199-3212.

Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. Nature *359*, 288-294.

Lee, G., Sehgal, R., Wang, Z., Nair, S., Kikuno, K., Chen, C.H., Hay, B., and Park, J.H. (2013). Essential role of grim-led programmed cell death for the establishment of corazonin-producing peptidergic nervous system during embryogenesis and metamorphosis in Drosophila melanogaster. Biol Open *2*, 283-294.

Lee, G., Wang, Z., Sehgal, R., Chen, C.H., Kikuno, K., Hay, B., and Park, J.H. (2010a). Drosophila caspases involved in developmentally regulated programmed cell death of peptidergic neurons during early metamorphosis. J Comp Neurol *519*, 34-48.

Lee, G., Wang, Z., Sehgal, R., Chen, C.H., Kikuno, K., Hay, B., and Park, J.H. (2011a). Drosophila caspases involved in developmentally regulated programmed cell death of peptidergic neurons during early metamorphosis. J Comp Neurol *519*, 34-48.

Lee, H., Ohno, K., Voskoboynik, Y., Ragusano, L., Martinez, A., and Dimova, D.K. (2010b). Drosophila RB proteins repress differentiation-specific genes via two different mechanisms. Molecular and cellular biology *30*, 2563-2577.

Lee, H., Ragusano, L., Martinez, A., Gill, J., and Dimova, D.K. (2012). A dual role for the dREAM/MMB complex in the regulation of differentiation-specific E2F/RB target genes. Mol Cell Biol *32*, 2110-2120.

Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Park, J., Lee, S.Y., Lee, S., and Chung, J. (2006). JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila. Cell Death Differ *13*, 1110-1122.

Lee, J.O., Russo, A.A., and Pavletich, N.P. (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. Nature *391*, 859-865.

Lee, T.V., Fan, Y., Wang, S., Srivastava, M., Broemer, M., Meier, P., and Bergmann, A. (2011b). Drosophila IAP1-mediated ubiquitylation controls activation of the initiator caspase DRONC independent of protein degradation. PLoS Genet *7*, e1002261.

Lee, Y., Lee, H.Y., Hanna, R.A., and Gustafsson, A.B. (2011c). Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol *301*, H1924-1931.

Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. Mol Biol Cell *15*, 5001-5011.

Lemaire, C., Godefroy, N., Costina-Parvu, I., Rincheval, V., Renaud, F., Trotot, P., Bouleau, S., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2005). Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. Oncogene *24*, 3297-3308.

Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A., and Nevins, J.R. (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. Mol Cell Biol *20*, 3626-3632.

Lesch, C., Jo, J., Wu, Y., Fish, G.S., and Galko, M.J. (2010). A targeted UAS-RNAi screen in Drosophila larvae identifies wound closure genes regulating distinct cellular processes. Genetics *186*, 943-957.

Leulier, F., Ribeiro, P.S., Palmer, E., Tenev, T., Takahashi, K., Robertson, D., Zachariou, A., Pichaud, F., Ueda, R., and Meier, P. (2006). Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the Drosophila cell death machinery. Cell Death Differ *13*, 1663-1674.

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. EMBO Rep *1*, 353-358.

Lewis, P.W., Beall, E.L., Fleischer, T.C., Georlette, D., Link, A.J., and Botchan, M.R. (2004). Identification of a Drosophila Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. Genes Dev *18*, 2929-2940.

Lewis, P.W., Sahoo, D., Geng, C., Bell, M., Lipsick, J.S., and Botchan, M.R. (2012). Drosophila lin-52 acts in opposition to repressive components of the Myb-MuvB/dREAM complex. Mol Cell Biol *32*, 3218-3227.

Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S., and Li, C.Y. (2010). Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci Signal *3*, ra13.

Li, X., Wang, J., and Shi, Y. (2011). Structural mechanisms of DIAP1 auto-inhibition and DIAP1-mediated inhibition of drICE. Nat Commun *2*, 408.

Lim, Y.M., Yamasaki, Y., and Tsuda, L. (2013). Ebi alleviates excessive growth signaling through multiple epigenetic functions in Drosophila. Genes Cells *18*, 909-920.

Lin, R., Angelin, A., Da Settimo, F., Martini, C., Taliani, S., Zhu, S., and Wallace, D.C. (2014). Genetic analysis of dTSPO, an outer mitochondrial membrane protein, reveals its functions in apoptosis, longevity, and Ab42-induced neurodegeneration. Aging Cell *13*, 507-518.

Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. Genes Dev *15*, 1833-1844.

Link, N., Kurtz, P., O'Neal, M., Garcia-Hughes, G., and Abrams, J.M. (2013). A p53 enhancer region regulates target genes through chromatin conformations in cis and in trans. Genes Dev *27*, 2433-2438.

Lipsick, J.S. (2004). synMuv verite--Myb comes into focus. Genes Dev *18*, 2837-2844.

Lisi, S., Mazzon, I., and White, K. (2000). Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. Genetics *154*, 669-678.

Litovchick, L., Florens, L.A., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and DeCaprio, J.A. (2011). DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. Genes Dev *25*, 801-813.

Litovchick, L., Sadasivam, S., Florens, L., Zhu, X., Swanson, S.K., Velmurugan, S., Chen, R., Washburn, M.P., Liu, X.S., and DeCaprio, J.A. (2007). Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. Mol Cell *26*, 539-551.

Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B.H., Quintana, A*., et al.* (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. Cell *160*, 177-190.

Liu, W., Acin-Perez, R., Geghman, K.D., Manfredi, G., Lu, B., and Li, C. (2011). Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 12920-12924.

Lohmann, I. (2003). Dissecting the regulation of the Drosophila cell death activator reaper. Gene Expr Patterns *3*, 159-163.

Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M., and McGinnis, W. (2002). The *Drosophila* Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. Cell *110*, 457-466.

Longworth, M.S., and Dyson, N.J. (2010). pRb, a local chromatin organizer with global possibilities. Chromosoma *119*, 1-11.

Longworth, M.S., Herr, A., Ji, J.Y., and Dyson, N.J. (2008). RBF1 promotes chromatin condensation through a conserved interaction with the Condensin II protein dCAP-D3. Genes Dev *22*, 1011-1024.

Loson, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. Mol Biol Cell *24*, 659-667.

Luo, R.X., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. Cell *92*, 463-473.

Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., and Jasper, H. (2007). Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. Embo J *26*, 380-390.

Ly, L.L., Suyari, O., Yoshioka, Y., Tue, N.T., Yoshida, H., and Yamaguchi, M. (2013). dNF-YB plays dual roles in cell death and cell differentiation during Drosophila eye development. Gene *520*, 106-118.

Ma, X., Huang, J., Yang, L., Yang, Y., Li, W., and Xue, L. (2012). NOPO modulates Egr-induced JNK-independent cell death in Drosophila. Cell Res *22*, 425-431.

Ma, X., Li, W., Yu, H., Yang, Y., Li, M., Xue, L., and Xu, T. (2014). Bendless modulates JNK-mediated cell death and migration in Drosophila. Cell Death Differ *21*, 407-415.

Ma, X., Shao, Y., Zheng, H., Li, M., Li, W., and Xue, L. (2013a). Src42A modulates tumor invasion and cell death via Ben/dUev1a-mediated JNK activation in Drosophila. Cell Death Dis *4*, e864.

Ma, X., Yang, L., Yang, Y., Li, M., Li, W., and Xue, L. (2013b). dUev1a modulates TNF-JNK mediated tumor progression and cell death in Drosophila. Dev Biol *380*, 211-221.

Macias, A., Romero, N.M., Martin, F., Suarez, L., Rosa, A.L., and Morata, G. (2004). PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the Drosophila male terminalia. Int J Dev Biol *48*, 1087-1094.

MacLellan, W.R., Xiao, G., Abdellatif, M., and Schneider, M.D. (2000). A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. Mol Cell Biol *20*, 8903-8915.

Macleod, K.F., Hu, Y., and Jacks, T. (1996). Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. EMBO J *15*, 6178-6188.

MacPherson, D., Sage, J., Kim, T., Ho, D., McLaughlin, M.E., and Jacks, T. (2004). Cell type-specific effects of Rb deletion in the murine retina. Genes Dev *18*, 1681-1694.

Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. Nature *391*, 601-605.

Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D.P., and La Thangue, N.B. (2006). DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. EMBO Rep *7*, 192-198.

Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martinez-Arias, A. (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. Genes Dev *12*, 557-570.

Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J.C., and Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 7888-7893.

Martin, F.A., Perez-Garijo, A., and Morata, G. (2009). Apoptosis in Drosophila: compensatory proliferation and undead cells. Int J Dev Biol.

Martinou, J.C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Developmental cell *21*, 92-101.

Mason-Richie, N.A., Mistry, M.J., Gettler, C.A., Elayyadi, A., and Wikenheiser-Brokamp, K.A. (2008). Retinoblastoma function is essential for establishing lung epithelial quiescence after injury. Cancer Res *68*, 4068-4076.

McCarthy, J.V., and Dixit, V.M. (1998). Apoptosis induced by *Drosophila reaper* and *grim* in a human system. Attenuation by inhibitor of apoptosis proteins (cIAPs). J Biol Chem *273*, 24009-24015.

McClellan, K.A., and Slack, R.S. (2007). Specific in vivo roles for E2Fs in differentiation and development. Cell Cycle *6*, 2917-2927.

McEwen, D.G., and Peifer, M. (2005). Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. Development *132*, 3935-3946.

McQuibban, G.A., Lee, J.R., Zheng, L., Juusola, M., and Freeman, M. (2006). Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects Drosophila lifespan and neuronal function. Curr Biol *16*, 982-989.

Meier, P., Silke, J., Leevers, S.J., and Evan, G.I. (2000). The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. EMBO J *19*, 598-611.

Meinander, A., Runchel, C., Tenev, T., Chen, L., Kim, C.H., Ribeiro, P.S., Broemer, M., Leulier, F., Zvelebil, M., Silverman, N.*, et al.* (2012). Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling. Embo J *31*, 2770-2783.

Mendes, C.S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H., and Mollereau, B. (2006). Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the Drosophila retina. EMBO Rep *7*, 933-939.

Meng, R.D., Phillips, P., and El-Deiry, W.S. (1999). p53-independent increase in E2f-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. Int J Oncol *14*, 5-14.

Mesquita, D., Dekanty, A., and Milan, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in Drosophila. PLoS Biol *8*, e1000566.

Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., and Horvitz, H.R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. Trends Genet *14*, 410-416.

Mignotte, B., Colin, J., Brun, S., and Guénal, I. (2005). Apoptosis: the fly point of view. In Apoptosis, A.I. Scovassi, ed. (Kerala, India, Research Signpost), pp. 169-186.

Mihaly, J., Kockel, L., Gaengel, K., Weber, U., Bohmann, D., and Mlodzik, M. (2001). The role of the *Drosophila* TAK homologue dTAK during development. Mech Dev *102*, 67-79.

Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA *94*, 5691-5696.

Miles, W.O., Korenjak, M., Griffiths, L.M., Dyer, M.A., Provero, P., and Dyson, N.J. (2014). Post-transcriptional gene expression control by NANOS is up-regulated and functionally important in pRb-deficient cells. Embo J *33*, 2201-2215.

Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Mignotte, B., and Guenal, I. (2010). The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. Cell Cycle *9*, 97-103.

Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Morieras, A., Clavier, A., Garrigue, A., Mignotte, B., and Guenal, I. (2014). Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis. PLoS One *9*, e102902.

Minton, K. (2014). Cell death: E2Ffects on mitochondria. Nat Rev Mol Cell Biol *15*, 6.

Mirth, C.K., and Shingleton, A.W. (2012). Integrating body and organ size in Drosophila: recent advances and outstanding problems. Front Endocrinol (Lausanne) *3*, 49.

Miyake, H., Hara, I., Arakawa, S., and Kamidono, S. (2000a). Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. J Cell Biochem *77*, 396-408.

Miyake, S., Sellers, W.R., Safran, M., Li, X., Zhao, W., Grossman, S.R., Gan, J., DeCaprio, J.A., Adams, P.D., and Kaelin, W.G., Jr. (2000b). Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. Mol Cell Biol *20*, 8889-8902.

Mollereau, B., Perez-Garijo, A., Bergmann, A., Miura, M., Gerlitz, O., Ryoo, H.D., Steller, H., and Morata, G. (2013). Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. Cell death and differentiation *20*, 181.

Monserrate, J.P., Chen, M.Y., and Brachmann, C.B. (2012). Drosophila larvae lacking the bcl-2 gene, buffy, are sensitive to nutrient stress, maintain increased basal target of rapamycin (Tor) signaling and exhibit characteristics of altered basal energy metabolism. BMC biology *10*, 63.

Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzel, E., Basanez, G., Meda, P.*, et al.* (2010). Membrane

remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. Cell *142*, 889-901.

Moon, N.S., Di Stefano, L., and Dyson, N. (2006). A gradient of epidermal growth factor receptor signaling determines the sensitivity of rbf1 mutant cells to E2F-dependent apoptosis. Mol Cell Biol *26*, 7601-7615.

Moon, N.S., Di Stefano, L., Morris, E.J., Patel, R., White, K., and Dyson, N.J. (2008). E2F and p53 induce apoptosis independently during Drosophila development but intersect in the context of DNA damage. PLoS Genet *4*, e1000153.

Moon, N.S., Frolov, M.V., Kwon, E.J., Di Stefano, L., Dimova, D.K., Morris, E.J., Taylor-Harding, B., White, K., and Dyson, N.J. (2005). Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. Dev Cell *9*, 463-475.

Morata, G., and Herrera, S.C. (2013). Eiger triggers death from afar. Elife *2*, e01388.

Morata, G., Shlevkov, E., and Perez-Garijo, A. (2011). Mitogenic signaling from apoptotic cells in Drosophila. Dev Growth Differ *53*, 168-176.

Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. Curr Biol *12*, 1263-1268.

Morey, M., Corominas, M., and Serras, F. (2003). DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of the selD/sps1 homolog in *Drosophila*. J Cell Sci *116*, 4597-4604.

Morishita, J., Kang, M.J., Fidelin, K., and Ryoo, H.D. (2013). CDK7 regulates the mitochondrial localization of a tail-anchored proapoptotic protein, Hid. Cell Rep *5*, 1481-1488.

Morris, E.J., and Dyson, N.J. (2001). Retinoblastoma protein partners. Adv Cancer Res *82*, 1-54.

Muliyil, S., and Narasimha, M. (2013). Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing. Dev Cell *28*, 239-252.

Munger, K. (2003). Clefts, grooves, and (small) pockets: the structure of the retinoblastoma tumor suppressor in complex with its cellular target E2F unveiled. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 2165-2167.

Munro, S., Carr, S.M., and La Thangue, N.B. (2012). Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? Oncogene *31*, 4343-4352.

Muro, I., Berry, D.L., Huh, J.R., Chen, C.H., Huang, H., Yoo, S.J., Guo, M., Baehrecke, E.H., and Hay, B.A. (2006). The Drosophila caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. Development *133*, 3305-3315.

Muro, I., Hay, B.A., and Clem, R.J. (2002). The *Drosophila* DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC. J Biol Chem *277*, 49644-49650.

Muro, I., Monser, K., and Clem, R.J. (2004). Mechanism of Dronc activation in Drosophila cells. J Cell Sci *117*, 5035-5041.

Nachtrab, G., and Poss, K.D. (2009). Genetic DISC-section of regeneration in Drosophila. Dev Cell *16*, 777-778.

Nakamura, M., Ohsawa, S., and Igaki, T. (2014). Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in Drosophila. Nat Commun *5*, 5264.

Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J.H., Xue, X., and Okumura, K. (2006). Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. Cell Death Differ *13*, 730-737.

Narendra, D., Walker, J.E., and Youle, R. (2012). Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*.

Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol *8*, e1000298.

Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. Cell *93*, 1183-1193.

Nguyen, D.X., and McCance, D.J. (2005). Role of the retinoblastoma tumor suppressor protein in cellular differentiation. J Cell Biochem *94*, 870-879.

Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ *6*, 1028-1042.

Nor Rashid, N., Yusof, R., and Watson, R.J. (2011). Disruption of repressive p130-DREAM complexes by human papillomavirus 16 E6/E7 oncoproteins is required for cell-cycle progression in cervical cancer cells. J Gen Virol *92*, 2620-2627.

Nordstrom, W., Chen, P., Steller, H., and Abrams, J.M. (1996). Activation of the *reaper* gene during ectopic cell killing in *Drosophila*. Dev Biol *180*, 213-226.

Noselli, S., and Agnes, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis. Curr Opin Genet Dev *9*, 466-472.

Novitch, B.G., Spicer, D.B., Kim, P.S., Cheung, W.L., and Lassar, A.B. (1999). pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. Curr Biol *9*, 449-459.

Ohsawa, S., Sato, Y., Enomoto, M., Nakamura, M., Betsumiya, A., and Igaki, T. (2012). Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in Drosophila. Nature *490*, 547-551.

Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1994). Functional properties of a *Drosophila* homolog of the E2F1 gene. Mol Cell Biol *14*, 1603-1612.

Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. Mol Cell Biol *15*, 2612-2624.

Oka, S., Hirai, J., Yasukawa, T., Nakahara, Y., and Inoue, Y.H. (2015). A correlation of reactive oxygen species accumulation by depletion of superoxide dismutases with age-dependent impairment in the nervous system and muscles of Drosophila adults. Biogerontology.

Okada, M., Akimaru, H., Hou, D.X., Takahashi, T., and Ishii, S. (2002). Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the *Drosophila* eye imaginal disc. Embo J *21*, 675-684.

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

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. J Biol Chem *278*, 7743-7746.

Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P*., et al.* (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. FEBS Lett *523*, 171-176.

Olson, M.R., Holley, C.L., Gan, E.C., Colon-Ramos, D.A., Kaplan, B., and Kornbluth, S. (2003a). A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. J Biol Chem *278*, 44758-44768. .

Olson, M.R., Holley, C.L., Yoo, S.J., Huh, J.R., Hay, B.A., and Kornbluth, S. (2003b). Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. J Biol Chem *278*, 4028-4034.

Otera, H., Ishihara, N., and Mihara, K. (2013). New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta *1833*, 1256-1268.

Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. J Cell Biol *191*, 1141-1158.

Pallanck, L. (2013). Mitophagy: mitofusin recruits a mitochondrial killer. Curr Biol *23*, R570-572.

Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. EMBO Rep *12*, 565-573.

Park, J., Kim, Y., Choi, S., Koh, H., Lee, S.H., Kim, J.M., and Chung, J. (2010). Drosophila Porin/VDAC affects mitochondrial morphology. PLoS One *5*, e13151.

Park, J., Lee, G., and Chung, J. (2009). The PINK1-Parkin pathway is involved in the regulation of mitochondrial remodeling process. Biochem Biophys Res Commun *378*, 518-523.

Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M*., et al.* (2006). Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. Nature *441*, 1157-1161.

Park, J.M., Brady, H., Ruocco, M.G., Sun, H., Williams, D., Lee, S.J., Kato, T., Jr., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F*., et al.* (2004). Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in Drosophila. Genes Dev *18*, 584-594.

Parone, P.A., James, D.I., Da Cruz, S., Mattenberger, Y., Donze, O., Barja, F., and Martinou, J.C. (2006). Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. Mol Cell Biol *26*, 7397-7408.

Pearson, A., and Greenblatt, J. (1997). Modular organization of the E2F1 activation domain and its interaction with general transcription factors TBP and TFIIH. Oncogene *15*, 2643-2658.

Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E*., et al.* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. Nat Cell Biol *5*, 552-558.

Perez-Garijo, A., Fuchs, Y., and Steller, H. (2013). Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. Elife *2*, e01004.

Perez-Garijo, A., Martin, F.A., and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in Drosophila. Development *131*, 5591-5598.

Perez-Garijo, A., Martin, F.A., Struhl, G., and Morata, G. (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 17664-17669.

Perez-Garijo, A., Shlevkov, E., and Morata, G. (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc. Development *136*, 1169-1177.

Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2006). Translation, interrupted. Nat Struct Mol Biol *13*, 98-99.

Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., and Vousden, K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F- 1. Genes Dev *11*, 1853-1863.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. Mol Cell *4*, 771-781.

Pickrell, A.M., and Youle, R.J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. Neuron *85*, 257-273.

Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I.B., Russell, J.L., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (1999). E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. Mol Cell Biol *19*, 6408-6414.

Pilkinton, M., Sandoval, R., and Colamonici, O.R. (2007). Mammalian Mip/LIN-9 interacts with either the p107, p130/E2F4 repressor complex or B-Myb in a cell cycle-phase-dependent context distinct from the Drosophila dREAM complex. Oncogene *26*, 7535-7543.

Pilotte, J., Larocque, D., and Richard, S. (2001). Nuclear translocation controlled by alternatively spliced isoforms inactivates the QUAKING apoptotic inducer. Genes Dev *15*, 845-858.

Polaski, S., Whitney, L., Barker, B.W., and Stronach, B. (2006). Genetic analysis of slipper/mixed lineage kinase reveals requirements in multiple Jun-N-terminal kinase-dependent morphogenetic events during Drosophila development. Genetics *174*, 719-733.

Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., and Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 1638-1643.

Powers, J.T., Hong, S., Mayhew, C.N., Rogers, P.M., Knudsen, E.S., and Johnson, D.G. (2004). E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. Mol Cancer Res *2*, 203-214.

Pruschy, M., Wirbelauer, C., Glanzmann, C., Bodis, S., and Krek, W. (1999). E2F-1 has properties of a radiosensitizer and its regulation by cyclin A kinase is required for cell survival of fibrosarcoma cells lacking p53. Cell Growth Differ *10*, 141-146.

Qin, X.Q., Chittenden, T., Livingston, D.M., and Kaelin, W.G., Jr. (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. Genes Dev *6*, 953-964.

Quinn, L., Coombe, K.M., Tasman, D., Colussi, P., Kumar, S., and Richardson, H. (2003). Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. EMBO J *22*, 3568-3579.

Quinn, L.M., Dorstyn, L., Mills, K., Colussi, P.A., Chen, P., Coombe, M., Abrams, J., Kumar, S., and Richardson, H. (2000). An essential role for the caspase dronc in developmentally programmed cell death in *Drosophila*. J Biol Chem *275*, 40416-40424.

Racek, T., Buhlmann, S., Rust, F., Knoll, S., Alla, V., and Putzer, B.M. (2008). Transcriptional repression of the prosurvival endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BIP by E2F1. J Biol Chem *283*, 34305-34314.

Raj, N., Zhang, L., Wei, Y., Arnosti, D.N., and Henry, R.W. (2012a). Rbf1 degron dysfunction enhances cellular DNA replication. Cell Cycle *11*, 3731-3738.

Raj, N., Zhang, L., Wei, Y., Arnosti, D.N., and Henry, R.W. (2012b). Ubiquitination of retinoblastoma family protein 1 potentiates gene-specific repression function. J Biol Chem *287*, 41835-41843.

Rambold, A.S., Kostelecky, B., Elia, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 10190-10195.

Real, P.J., Sanz, C., Gutierrez, O., Pipaon, C., Zubiaga, A.M., and Fernandez-Luna, J.L. (2006). Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. FEBS Lett *580*, 5905-5909.

Reuveny, A., Elhanany, H., and Volk, T. (2009). Enhanced sensitivity of midline glial cells to apoptosis is achieved by HOW(L)-dependent repression of Diap1. Mechanisms of development *126*, 30-41.

Rios-Barrera, L.D., and Riesgo-Escovar, J.R. (2013). Regulating cell morphogenesis: the Drosophila Jun N-terminal kinase pathway. Genesis *51*, 147-162.

Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. Nat Genet *25*, 338-342.

Robinow, S., Draizen, T.A., and Truman, J.W. (1997). Genes that induce apoptosis: transcriptional regulation in identified doomed neurons of the *Drosophila* CNS. Dev Biol *190*, 206-213.

Robinson, R. (2010). Protein keeps adjacent tissues growing in synchrony. PLoS Biol *8*, e1001006.

Rodriguez, A., Chen, P., Oliver, H., and Abrams, J.M. (2002). Unrestrained caspase-dependent cell death caused by loss of Diap1 function requires the Drosophila Apaf-1 homolog, Dark. Embo J *21*, 2189-2197.

Rodriguez, A., Oliver, H., Zou, H., Chen, P., Wang, X., and Abrams, J.M. (1999). Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. Nat Cell Biol *1*, 272-279.

Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. Mol Cell Biol *24*, 2968-2977.

Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. J Cell Sci *115*, 1663-1674.

Rolland, S.G., and Conradt, B. (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. Curr Opin Cell Biol *22*, 852-858.

Rousset, R., Bono-Lauriol, S., Gettings, M., Suzanne, M., Speder, P., and Noselli, S. (2010). The Drosophila serine protease homologue Scarface regulates JNK signalling in a negative-feedback loop during epithelial morphogenesis. Development *137*, 2177-2186.

Rovani, M.K., Brachmann, C.B., Ramsay, G., and Katzen, A.L. (2012). The dREAM/Myb-MuvB complex and Grim are key regulators of the programmed death of neural precursor cells at the Drosophila posterior wing margin. Dev Biol *372*, 88-102.

Royzman, I., Whittaker, A.J., and Orr-Weaver, T.L. (1997). Mutations in Drosophila DP and E2F distinguish G1-S progression from an associated transcriptional program. Genes Dev *11*, 1999-2011.

Rubin, S.M. (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. Trends Biochem Sci *38*, 12-19.

Ryoo, H.D., and Bergmann, A. (2012). The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*, a008797.

Ryoo, H.D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., and Steller, H. (2002). Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. Nat Cell Biol *4*, 432-438.

Ryoo, H.D., Gorenc, T., and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. Dev Cell *7*, 491-501.

Sabapathy, K. (2012). Role of the JNK pathway in human diseases. Prog Mol Biol Transl Sci *106*, 145-169.

Sadasivam, S., Duan, S., and DeCaprio, J.A. (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. Genes Dev *26*, 474-489.

Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. Science *293*, 1651-1653.

Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. Embo J *18*, 717-726.

Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B., and Tansey, W.P. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 3118-3123.

Sandoval, H., Yao, C.K., Chen, K., Jaiswal, M., Donti, T., Lin, Y.Q., Bayat, V., Xiong, B., Zhang, K., David, G.*, et al.* (2014). Mitochondrial fusion but not fission regulates larval growth and synaptic development through steroid hormone production. Elife *3*.

Sandu, C., Ryoo, H.D., and Steller, H. (2010). Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. The Journal of cell biology *190*, 1039-1052.

Sauvanet, C., Arnaune-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., and Rojo, M. (2010). [Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanisms and functions]. Med Sci (Paris) *26*, 823-829.

Sawado, T., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Ohno, K., Sakaguchi, K., and Matsukage, A. (1998). dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in Drosophila melanogaster. Biochem Biophys Res Commun *251*, 409-415.

Schertel, C., and Conradt, B. (2007). C. elegans orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. Development *134*, 3691-3701.

Schmit, F., Korenjak, M., Mannefeld, M., Schmitt, K., Franke, C., von Eyss, B., Gagrica, S., Hanel, F., Brehm, A., and Gaubatz, S. (2007). LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. Cell Cycle *6*, 1903-1913.

Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, E.R., Hengartner, M., Schedl, T., and Gartner, A. (2005). Translational repression of C. elegans p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis. Cell *120*, 357-368.

Scorrano, L., and Liu, D. (2009). The SUMO arena goes mitochondrial with MAPL. EMBO Rep *10*, 694-696.

Senoo-Matsuda, N., Igaki, T., and Miura, M. (2005). Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in Drosophila. Embo J *24*, 2700-2713.

Sevrioukov, E.A., Burr, J., Huang, E.W., Assi, H.H., Monserrate, J.P., Purves, D.C., Wu, J.N., Song, E.J., and Brachmann, C.B. (2007). Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. Genesis *45*, 184-193.

Shan, B., and Lee, W.-H. (1994). Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. Mol Cell Biol *14*, 8166-8173.

Shapiro, P.J., Hsu, H.H., Jung, H., Robbins, E.S., and Ryoo, H.D. (2008). Regulation of the Drosophila apoptosome through feedback inhibition. Nat Cell Biol *10*, 1440-1446.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. Science *274*, 1672-1677.

Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res *60*, 3689-3695.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell *2*, 103-112.

Shi, C.S., and Kehrl, J.H. (2003). Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). J Biol Chem *278*, 15429-15434.

Shim, J., Park, H.S., Kim, M.J., Park, J., Park, E., Cho, S.G., Eom, S.J., Lee, H.W., Joe, C.O., and Choi, E.J. (2000). Rb protein down-regulates the stress-activated signals through inhibiting c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. J Biol Chem *275*, 14107-14111.

Siddique, H.R., Gupta, S.C., Mitra, K., Bajpai, V.K., Mathur, N., Murthy, R.C., Saxena, D.K., and Chowdhuri, D.K. (2008). Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic Drosophila melanogaster: role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis. J Appl Toxicol *28*, 734-748.

Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R.L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., and Maniatis, T. (2003). Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1. J Biol Chem *278*, 48928-48934.

Sim, C.K., Perry, S., Tharadra, S.K., Lipsick, J.S., and Ray, A. (2012). Epigenetic regulation of olfactory receptor gene expression by the Myb-MuvB/dREAM complex. Genes Dev *26*, 2483-2498.

Simon, R., Aparicio, R., Housden, B.E., Bray, S., and Busturia, A. (2014). Drosophila p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. Apoptosis *19*, 1430-1443.

Simonson, S.J., Wu, Z.H., and Miyamoto, S. (2007). CYLD: a DUB with many talents. Dev Cell *13*, 601-603.

Simpson, M.T., MacLaurin, J.G., Xu, D., Ferguson, K.L., Vanderluit, J.L., Davoli, M.A., Roy, S., Nicholson, D.W., Robertson, G.S., Park, D.S*., et al.* (2001). Caspase 3 deficiency rescues peripheral nervous system defect in retinoblastoma nullizygous mice. J Neurosci *21*, 7089-7098.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. Mol Biol Cell *12*, 2245-2256.

Smith-Bolton, R.K., Worley, M.I., Kanda, H., and Hariharan, I.K. (2009). Regenerative growth in Drosophila imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. Dev Cell *16*, 797-809.

Snipas, S.J., Drag, M., Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (2008). Activation mechanism and substrate specificity of the Drosophila initiator caspase DRONC. Cell death and differentiation *15*, 938-945.

Son, Y., Kim, S., Chung, H.T., and Pae, H.O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. Methods Enzymol *528*, 27-48.

Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., and Alnemri, E.S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. J Biol Chem *275*, 36152-36157.

Srinivasula, S.M., Datta, P., Kobayashi, M., Wu, J.W., Fujioka, M., Hegde, R., Zhang, Z., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y*., et al.* (2002). sickle, a novel Drosophila death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. Curr Biol *12*, 125-130.

Srivastava, M., Scherr, H., Lackey, M., Xu, D., Chen, Z., Lu, J., and Bergmann, A. (2007). ARK, the Apaf-1 related killer in Drosophila, requires diverse domains for its apoptotic activity. Cell Death Differ *14*, 92-102.

Stanelle, J., and Putzer, B.M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. Trends Mol Med *12*, 177-185.

Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., and Putzer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. Nucleic Acids Res *30*, 1859-1867.

Stevaux, O., Dimova, D., Frolov, M.V., Taylor-Harding, B., Morris, E., and Dyson, N. (2002). Distinct mechanisms of E2F regulation by Drosophila RBF1 and RBF2. Embo J *21*, 4927-4937.

Stevaux, O., Dimova, D.K., Ji, J.Y., Moon, N.S., Frolov, M.V., and Dyson, N.J. (2005). Retinoblastoma family 2 is required in vivo for the tissue-specific repression of dE2F2 target genes. Cell Cycle *4*, 1272-1280.

Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. Nat Cell Biol *5*, 401-409.

Stirzaker, C., Millar, D.S., Paul, C.L., Warnecke, P.M., Harrison, J., Vincent, P.C., Frommer, M., and Clark, S.J. (1997). Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. Cancer Res *57*, 2229-2237.

Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. EMBO Rep *1*, 347-352.

Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T., and Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the Drosophila NF-kappaB factor Relish. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 5991-5996.

Stronach, B. (2005). Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. Dev Dyn *232*, 575-584.

Stronach, B., Lennox, A.L., and Garlena, R.A. (2015). Domain specificity of MAP3K family members, MLK and Tak1, for JNK signaling in Drosophila. Genetics *197*, 497-513.

Stronach, B., and Perrimon, N. (2002). Activation of the JNK pathway during dorsal closure in Drosophila requires the mixed lineage kinase, slipper. Genes Dev *16*, 377-387.

Suen, D.F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes Dev *22*, 1577-1590.

Sugioka, R., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. J Biol Chem *279*, 52726-52734.

Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., and Pan, H. (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. Cancer Lett *344*, 174-179.

Suissa, Y., Ziv, O., Dinur, T., Arama, E., and Gerlitz, O. (2011). The NAB-Brk signal bifurcates at JNK to independently induce apoptosis and compensatory proliferation. J Biol Chem *286*, 15556-15564.

Sun, G., and Irvine, K.D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. Dev Biol *350*, 139-151.

Sun, G., and Irvine, K.D. (2013). Ajuba family proteins link JNK to Hippo signaling. Sci Signal *6*, ra81.

Suzuki, M., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. J Mol Biol *334*, 445-458.

Tain, L.S., Chowdhury, R.B., Tao, R.N., Plun-Favreau, H., Moisoi, N., Martins, L.M., Downward, J., Whitworth, A.J., and Tapon, N. (2009). Drosophila HtrA2 is dispensable for apoptosis but acts downstream of PINK1 independently from Parkin. Cell Death Differ *16*, 1118-1125.

Tait, S.W., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*.

Tait, S.W., Werner, A.B., de Vries, E., and Borst, J. (2004). Mechanism of action of Drosophila Reaper in mammalian cells: Reaper globally inhibits protein synthesis and induces apoptosis independent of mitochondrial permeability. Cell Death Differ *11*, 800-811.

Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M.C., Matsumoto, K., O'Connor, M.B., Shibuya, H., and Ueno, N. (2000). TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during Drosophila development. Mol Cell Biol *20*, 3015-3026.

Talluri, S., and Dick, F.A. (2012). Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere. Cell Cycle *11*, 3189-3198.

Tamori, Y., and Deng, W.M. (2014). Compensatory cellular hypertrophy: the other strategy for tissue homeostasis. Trends Cell Biol *24*, 230-237.

Tan, X., Martin, S.J., and Wang, J.Y.J. (1997). Degradation of Retinoblastoma protein in Tumor Necrosis Factor- and CD95-induced Cell Death. J Biol Chem *272*, 9613-9616.

Tan, Y., Yamada-Mabuchi, M., Arya, R., St Pierre, S., Tang, W., Tosa, M., Brachmann, C., and White, K. (2011). Coordinated expression of cell death genes regulates neuroblast apoptosis. Development *138*, 2197-2206.

Tanaka-Matakatsu, M., Xu, J., Cheng, L., and Du, W. (2009). Regulation of apoptosis of rbf mutant cells during Drosophila development. Dev Biol *326*, 347-356.

Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (2002). E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. Mol Cell *9*, 1017-1029.

Tang, S., Le, P.K., Tse, S., Wallace, D.C., and Huang, T. (2009). Heterozygous mutation of Opa1 in Drosophila shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. PLoS One *4*, e4492.

Tanner, E.A., Blute, T.A., Brachmann, C.B., and McCall, K. (2011). Bcl-2 proteins and autophagy regulate mitochondrial dynamics during programmed cell death in the Drosophila ovary. Development *138*, 327-338.

Tanner, E.A., and McCall, K. (2011). Mitochondrial regulation of cell death in the Drosophila ovary. Autophagy *7*, 793-794.

Taylor-Harding, B., Binne, U.K., Korenjak, M., Brehm, A., and Dyson, N.J. (2004). p55, the Drosophila ortholog of RbAp46/RbAp48, is required for the repression of dE2F2/RBF-regulated genes. Mol Cell Biol *24*, 9124-9136.

Tenev, T., Ditzel, M., Zachariou, A., and Meier, P. (2007). The antiapoptotic activity of insect IAPs requires activation by an evolutionarily conserved mechanism. Cell Death Differ *14*, 1191-1201.

Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Ditzel, M., and Meier, P. (2005). IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. Nat Cell Biol *7*, 70-77.

Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Paul, A., and Meier, P. (2002). Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1. Embo J *21*, 5118-5129.

Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C., and Hinds, P.W. (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. Mol Cell *8*, 303-316.

Thomenius, M., Freel, C.D., Horn, S., Krieser, R., Abdelwahid, E., Cannon, R., Balasundaram, S., White, K., and Kornbluth, S. (2011). Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate Drosophila programmed cell death. Cell Death Differ *18*, 1640-1650.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. Science *281*, 1312-1316.

Thress, K., Evans, E.K., and Kornbluth, S. (1999). Reaper-induced dissociation of a Scythe-sequestered cytochrome c-releasing activity. EMBO J *18*, 5486-5493.

Thress, K., Henzel, W., Shillinglaw, W., and Kornbluth, S. (1998). Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. EMBO J *17*, 6135-6143.

Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P., and Macleod, K.F. (2007). BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. Mol Cell Biol *27*, 6229-6242.

Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L., and Jacks, T. (1998). Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. Mol Cell *2*, 293-304.

Tschop, K., Conery, A.R., Litovchick, L., Decaprio, J.A., Settleman, J., Harlow, E., and Dyson, N. (2011). A kinase shRNA screen links LATS2 and the pRB tumor suppressor. Genes Dev *25*, 814-830.

Tsubouchi, A., Tsuyama, T., Fujioka, M., Kohda, H., Okamoto-Furuta, K., Aigaki, T., and Uemura, T. (2009). Mitochondrial protein Preli-like is required for development of dendritic arbors and prevents their regression in the Drosophila sensory nervous system. Development *136*, 3757-3766.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G*., et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. Embo J *27*, 433-446.

Udayakumar, T., Shareef, M.M., Diaz, D.A., Ahmed, M.M., and Pollack, A. (2010). The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. Semin Radiat Oncol *20*, 258-266.

Ugarte-Uribe, B., and Garcia-Saez, A.J. (2014). Membranes in motion: mitochondrial dynamics and their role in apoptosis. Biol Chem *395*, 297-311.

Ullah, Z., Buckley, M.S., Arnosti, D.N., and Henry, R.W. (2007). Retinoblastoma protein regulation by the COP9 signalosome. Mol Biol Cell *18*, 1179-1186.

Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., and Prives, C. (2004). p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. Genes Dev *18*, 3041-3054.

Van Bortle, K., and Corces, V.G. (2012). tDNA insulators and the emerging role of TFIIIC in genome organization. Transcription *3*, 277-284.

van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 713-724.

van der Bliek, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*.

Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R., and Abrams, J.M. (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. J Cell Biol *144*, 701-710.

Varshavsky, A. (2003). The N-end rule and regulation of apoptosis. Nat Cell Biol *5*, 373-376.

Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. Protein Sci.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 287-297.

Vazquez-Pianzola, P., Hernandez, G., Suter, B., and Rivera-Pomar, R. (2007). Different modes of translation for hid, grim and sickle mRNAs in Drosophila. Cell Death Differ *14*, 286-295.

Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions. Neuron *47*, 365-378.

Vo, N., Horii, T., Yanai, H., Yoshida, H., and Yamaguchi, M. (2014). The Hippo pathway as a target of the Drosophila DRE/DREF transcriptional regulatory pathway. Sci Rep *4*, 7196.

Volk, T., Israeli, D., Nir, R., and Toledano-Katchalski, H. (2008). Tissue development and RNA control: "HOW" is it coordinated? Trends Genet *24*, 94-101.

Vucic, D., Kaiser, W.J., Harvey, A.J., and Miller, L.K. (1997a). Inhibition of *reaper*-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 10183-10188.

Vucic, D., Kaiser, W.J., and Miller, L.K. (1998). Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. Mol Cell Biol *18*, 3300-3309.

Vucic, D., Seshagiri, S., and Miller, L.K. (1997b). Characterization of *reaper*- and FADD-induced apoptosis in a lepidopteran cell line. Mol Cell Biol *17*, 667-676.

Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. J Cell Biol *186*, 805-816.

Waldhuber, M., Emoto, K., and Petritsch, C. (2005). The Drosophila caspase DRONC is required for metamorphosis and cell death in response to irradiation and developmental signals. Mech Dev *122*, 914-927.

Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Muller, H.A., and Hay, B.A. (1999). The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. Cell *98*, 453-463.

Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2011a). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. Cell *147*, 893-906.

Wang, Y., Ray, S.K., Hinds, P.W., and Leiter, A.B. (2007). The retinoblastoma protein, RB, is required for gastrointestinal endocrine cells to exit the cell cycle, but not for hormone expression. Dev Biol *311*, 478-486.

Wang, Y.C., Lee, C.M., Lee, L.C., Tung, L.C., Hsieh-Li, H.M., Lee-Chen, G.J., and Su, M.T. (2011b). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12). J Biol Chem *286*, 21742-21754.

Warner, S.J., and Longmore, G.D. (2010). Context-dependent compensatory proliferation in epithelial homeostasis and tumorigenesis. Cell Cycle *9*, 4037-4038.

Warner, S.J., Yashiro, H., and Longmore, G.D. (2010). The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. Curr Biol *20*, 677-686.

Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. J Cell Biol *177*, 439-450.

Wei, N., Serino, G., and Deng, X.W. (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. Trends Biochem Sci *33*, 592-600.

Wells, B.S., and Johnston, L.A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in Drosophila by p53. Dev Biol *361*, 263-276.

Wells, B.S., Yoshida, E., and Johnston, L.A. (2006). Compensatory proliferation in Drosophila imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. Curr Biol *16*, 1606-1615.

Wen, H., Andrejka, L., Ashton, J., Karess, R., and Lipsick, J.S. (2008). Epigenetic regulation of gene expression by Drosophila Myb and E2F2-RBF via the Myb-MuvB/dREAM complex. Genes Dev *22*, 601-614.

Weng, L., Zhu, C., Xu, J., and Du, W. (2003). Critical role of active repression by E2F and Rb proteins in endoreplication during Drosophila development. Embo J *22*, 3865-3875.

Wenzel, P.L., Wu, L., de Bruin, A., Chong, J.L., Chen, W.Y., Dureska, G., Sites, E., Pan, T., Sharma, A., Huang, K.*, et al.* (2007). Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population. Genes Dev *21*, 85-97.

Weston, C.R., and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Genet Dev *12*, 14-21.

Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Cell Biol *19*, 142-149.

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. Science *264*, 677-683.

White, K., Tahaoglu, E., and Steller, H. (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene *reaper*. Science *271*, 805-807.

Wichmann, A., Uyetake, L., and Su, T.T. (2010). E2F1 and E2F2 have opposite effects on radiation-induced p53-independent apoptosis in Drosophila. Dev Biol *346*, 80-89.

Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D.A., Agapite, J., Steller, H., and Meier, P. (2002). The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. Nat Cell Biol *4*, 445-450.

Wing, J.P., Karres, J.S., Ogdahl, J.L., Zhou, L., Schwartz, L.M., and Nambu, J.R. (2002a). *Drosophila* sickle is a novel grim-reaper cell death activator. Curr Biol *12*, 131-135.

Wing, J.P., Schreader, B.A., Yokokura, T., Wang, Y., Andrews, P.S., Huseinovic, N., Dong, C.K., Ogdahl, J.L., Schwartz, L.M., White, K.*, et al.* (2002b). *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. Nat Cell Biol *4*, 451-456.

Wing, J.P., Schwartz, L.M., and Nambu, J.R. (2001). The RHG motifs of Drosophila Reaper and Grim are important for their distinct cell death-inducing abilities. Mech Dev *102*, 193-203.

Wing, J.P., Zhou, L., Schwartz, L.M., and Nambu, J.R. (1998). Distinct cell killing properties of the *Drosophila reaper*, *head involution defective*, and *grim* genes. Cell Death Differ *5*, 930-939.

Worley, M.I., Setiawan, L., and Hariharan, I.K. (2012). Regeneration and transdetermination in Drosophila imaginal discs. Annual review of genetics *46*, 289-310.

Wu, J.N., Nguyen, N., Aghazarian, M., Tan, Y., Sevrioukov, E.A., Mabuchi, M., Tang, W., Monserrate, J.P., White, K., and Brachmann, C.B. (2010). grim promotes programmed cell death of Drosophila microchaete glial cells. Mechanisms of development *127*, 407-417.

Wu, J.W., Cocina, A.E., Chai, J., Hay, B.A., and Shi, Y. (2001). Structural analysis of a functional DIAP1 fragment bound to grim and hid peptides. Mol Cell *8*, 95-104.

Wu, L., de Bruin, A., Saavedra, H.I., Starovic, M., Trimboli, A., Yang, Y., Opavska, J., Wilson, P., Thompson, J.C., Ostrowski, M.C.*, et al.* (2003). Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. Nature *421*, 942-947.

Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., Ali-Khan, N., Mittnacht, S., Broceno, C., Burghammer, M., Perrakis, A., Marmorstein, R., and Gamblin, S.J. (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 2363-2368.

Xin, S., Weng, L., Xu, J., and Du, W. (2002). The role of RBF in developmentally regulated cell proliferation in the eye disc and in Cyclin D/Cdk4 induced cellular growth. Development *129*, 1345-1356.

Xu, D., Li, Y., Arcaro, M., Lackey, M., and Bergmann, A. (2005). The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in Drosophila. Development *132*, 2125-2134.

Xu, D., Wang, Y., Willecke, R., Chen, Z., Ding, T., and Bergmann, A. (2006). The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in Drosophila. Cell Death Differ *13*, 1697-1706.

Xu, D., Woodfield, S.E., Lee, T.V., Fan, Y., Antonio, C., and Bergmann, A. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in Drosophila. Fly (Austin) *3*, 78-90.

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

Xue, L., Igaki, T., Kuranaga, E., Kanda, H., Miura, M., and Xu, T. (2007). Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila. Dev Cell *13*, 446-454.

Yacobi-Sharon, K., Namdar, Y., and Arama, E. (2013). Alternative germ cell death pathway in Drosophila involves HtrA2/Omi, lysosomes, and a caspase-9 counterpart. Developmental cell *25*, 29-42.

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. Cell *85*, 537-548.

Yan, N., Huh, J.R., Schirf, V., Demeler, B., Hay, B.A., and Shi, Y. (2006). Structure and activation mechanism of the Drosophila initiator caspase Dronc. J Biol Chem *281*, 8667-8674.

Yan, N., Wu, J.W., Chai, J., Li, W., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. Nat Struct Mol Biol *11*, 420-428.

Yanai, H., Yoshioka, Y., Yoshida, H., Nakao, Y., Plessis, A., and Yamaguchi, M. (2014). Drosophila myeloid leukemia factor acts with DREF to activate the JNK signaling pathway. Oncogenesis *3*, e98.

Yang, L., and Yu, J. (2009). A comparative analysis of divergently-paired genes (DPGs) among Drosophila and vertebrate genomes. BMC Evol Biol *9*, 55.

Yang, S.A., and Su, M.T. (2011). Excessive Dpp signaling induces cardial apoptosis through dTAK1 and dJNK during late embryogenesis of Drosophila. J Biomed Sci *18*, 85.

Yang, X., Menon, S., Lykke-Andersen, K., Tsuge, T., Di, X., Wang, X., Rodriguez-Suarez, R.J., Zhang, H., and Wei, N. (2002). The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. Curr Biol *12*, 667-672.

Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., and Lu, B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 10793-10798.

Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H., and Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 7070-7075.

Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J.J., Tse, S., Le, P.K., Nguyen, K., Brachmann, C.B., Wallace, D.C., and Huang, T. (2008). The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in Drosophila model and prospects for antioxidant treatment. PLoS Genet *4*, e6.

Yeh, T.C., and Bratton, S.B. (2013). Caspase-dependent regulation of the ubiquitin-proteasome system through direct substrate targeting. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 14284-14289.

Yeh, T.C., and Bratton, S.B. (2014). DrICE resurrects Grim to antagonize DIAP1. Cell Cycle *13*, 685-686.

Yi, C.H., Sogah, D.K., Boyce, M., Degterev, A., Christofferson, D.E., and Yuan, J. (2007). A genome-wide RNAi screen reveals multiple regulators of caspase activation. J Cell Biol *179*, 619-626.

Yin, V.P., and Thummel, C.S. (2004). A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 8022-8027.

Yin, V.P., Thummel, C.S., and Bashirullah, A. (2007). Down-regulation of inhibitor of apoptosis levels provides competence for steroid-triggered cell death. J Cell Biol *178*, 85-92.

Yokokura, T., Dresnek, D., Huseinovic, N., Lisi, S., Abdelwahid, E., Bangs, P., and White, K. (2004). Dissection of DIAP1 functional domains via a mutant replacement strategy. J Biol Chem *279*, 52603-52612.

Yoo, S.J. (2005). Grim stimulates Diap1 poly-ubiquitination by binding to UbcD1. Mol Cells *20*, 446-451.

Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S.L., Feldman, R.M., Clem, R.J., Muller, H.A., and Hay, B.A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. Nat Cell Biol *4*, 416-424.

Yoshida, H., Inoue, Y.H., Hirose, F., Sakaguchi, K., Matsukage, A., and Yamaguchi, M. (2001). Over-expression of DREF in the Drosophila wing imaginal disc induces apoptosis and a notching wing phenotype. Genes Cells *6*, 877-886.

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol *12*, 9-14.

Yu, S.Y., Yoo, S.J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B.A., and Baker, N.E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing Drosophila eye. Development *129*, 3269-3278.

Yu, X., Wang, L., Acehan, D., Wang, X., and Akey, C.W. (2006). Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the Drosophila Apaf-1 related killer. J Mol Biol *355*, 577-589.

Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Dorstyn, L., Kumar, S., Ludtke, S.J., and Akey, C.W. (2011). Structure of the Drosophila apoptosome at 6.9 a resolution. Structure *19*, 128-140.

Zachariou, A., Tenev, T., Goyal, L., Agapite, J., Steller, H., and Meier, P. (2003). IAP-antagonists exhibit non-redundant modes of action through differential DIAP1 binding. Embo J *22*, 6642-6652.

Zacksenhaus, E., Bremner, R., Phillips, R.A., and Gallie, B.L. (1993). A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biologic activity. Mol Cell Biol *13*, 4588-4599.

Zhang, B., Xu, Z., Zhang, Y., Shao, X., Xu, X., Cheng, J., and Li, Z. (2015). Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in Drosophila S2 cells. Pestic Biochem Physiol *119*, 81-89.

Zhang, H., Huang, Q., Ke, N., Matsuyama, S., Hammock, B., Godzik, A., and Reed, J.C. (2000). *Drosophila* pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. J Biol Chem *275*, 27303-27306.

Zhang, L., Wei, Y., Pushel, I., Heinze, K., Elenbaas, J., Henry, R.W., and Arnosti, D.N. (2014). Integrated stability and activity control of the Drosophila Rbf1 retinoblastoma protein. J Biol Chem *289*, 24863-24873.

Zhang, Y., Lin, N., Carroll, P.M., Chan, G., Guan, B., Xiao, H., Yao, B., Wu, S.S., and Zhou, L. (2008). Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression in Drosophila embryos. Dev Cell *14*, 481-493.

Zhao, X., and Day, M.L. (2001). RB activation and repression of C-MYC transcription precede apoptosis of human prostate epithelial cells. Urology *57*, 860-865.

Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E.T., and Yu, Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 16090-16095.

Zhou, L. (2005). The 'unique key' feature of the Iap-binding motifs in RHG proteins. Cell Death Differ *12*, 1148-1151.

Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L.M., Steller, H., and Nambu, J.R. (1997). Cooperative functions of the *reaper* and *head involution defective* genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. Proc Natl Acad Sci USA *94*, 5131-5136.

Zhou, l., Song, Z., Tittel, J., and Steller, H. (1999). HAC-1, a *Drosophila* homolog of Apaf-1 and Ced-4, functions in developmental and radiation-induced apoptosis. Mol Cell *4*, 745-755.

Zhou, L., and Steller, H. (2003). Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in Drosophila embryos. Dev Cell *4*, 599-605.

Zimmermann, K.C., Ricci, J.E., Droin, N.M., and Green, D.R. (2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. J Cell Biol *156*, 1077-1087.

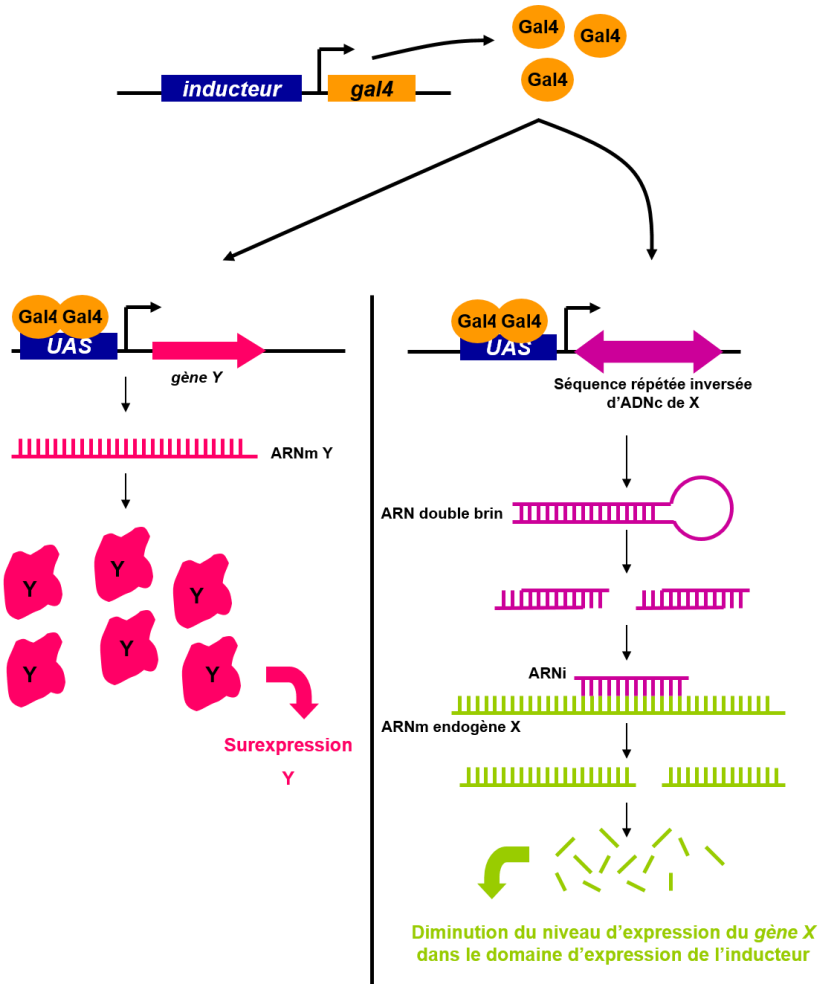
Zimmermann, M., Kugler, S.J., Schulz, A., and Nagel, A.C. (2015). Loss of putzig Activity Results in Apoptosis during Wing Imaginal Development in Drosophila. PLoS One *10*, e0124652.

Annexes

I. Annexe 1 : Présentation du système UAS/Gal4

A. Le gène *gal4* est placé sous contrôle d'un inducteur. Ainsi la protéine Gal4 est produite uniquement dans le domaine d'expression de l'inducteur. Gal4 est un facteur de transcription qui se fixe sous forme de dimères sur les séquences UAS et induit l'activation transcriptionnel du gène placé en aval (gène Y). On peut donc grâce au système UAS-Gal4 surexprimer un gène d'intérêt Y selon un profil spatio-temporel choisi.

B. Ce système peut également être utilisé pour restreindre l'expression d'un gène d'intérêt noté X. Un transgène constitué de répétitions inversées d'un fragment du gène X à inactiver est placé sous contrôle de séquence UAS. La fixation de Gal sur ces séquences permet d'activer la transcription. Du fait de la complémentarité de séquence, on obtient un ARN double brin, qui va être pris en charge par la machinerie d'ARN interférence de la cellule. On obtient finalement un court fragment complémentaire d'une portion de l'ARNm X endogène. L'hybridation de l'ARNi sur l'ARNm X conduit à sa dégradation par clivage. On diminue ainsi spécifiquement le niveau d'expression du gène X dans le domaine d'expression de l'inducteur.



II. Annexe 2 : Une mutation de Rbf1 augmente son activité pro-apoptotique et permet de dévoiler un nouveau rôle vis-à-vis de l'homéostasie tissulaire

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Mutating RBF Can Enhance Its Pro-Apoptotic Activity and Uncovers a New Role in Tissue Homeostasis

Cécile Milet, Aurore Rincheval-Arnold, Angéline Moriéras, Amandine Clavier, Alexandrine Garrigue, Bernard Mignotte, Isabelle Guénal*

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire - EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montigny-le-Bretonneux, France

Abstract

The tumor suppressor retinoblastoma protein (pRb) is inactivated in a wide variety of cancers. While its role during cell cycle is well characterized, little is known about its properties on apoptosis regulation and apoptosis-induced cell responses. pRb shorter forms that can modulate pRB apoptotic properties, resulting from cleavages at caspase specific sites are observed in several cellular contexts. A bioinformatics analysis showed that a putative caspase cleavage site (TELD) is found in the Drosophila homologue of pRb (RBF) at a position similar to the site generating the p76Rb form in mammals. Thus, we generated a punctual mutant form of RBF in which the aspartate of the TELD site is replaced by an alanine. This mutant form, RBF^{D253A}, conserved the JNK-dependent pro-apoptotic properties of RBF but gained the ability of inducing overgrowth phenotypes in adult wings. We show that this overgrowth is a consequence of an abnormal proliferation in wing imaginal discs, which depends on the JNK pathway activation but not on wingless (wg) ectopic expression. These results show for the first time that the TELD site of RBF could be important to control the function of RBF in tissue homeostasis *in vivo*.

Citation: Milet C, Rincheval-Arnold A, Moriéras A, Clavier A, Garrigue A, et al. (2014) Mutating RBF Can Enhance Its Pro-Apoptotic Activity and Uncovers a New Role in Tissue Homeostasis. PLoS ONE 9(8): e102902. doi:10.1371/journal.pone.0102902

Editor: Srinivasa M. Srinivasula, IISER-TVM, India

Received January 4, 2014; **Accepted** June 24, 2014; **Published** August 4, 2014

Copyright: © 2014 Milet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer and the Ligue Nationale Contre le Cancer. Cécile Milet held successive fellowships from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Ecole Pratique des Hautes Etudes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: isabelle.guenal@uvsq.fr

Introduction

The Retinoblastoma gene, *Rb*, was first identified as the tumor suppressor gene mutated in a rare childhood eye cancer, and its product (pRb) is often functionally inactivated in many human cancers by mutation or hyperphosphorylation [1,2]. pRb is a member of the pocket protein family. These proteins possess specific A and B domains that form the pocket domain, required for their interactions with many transcription factors or co-factors in order to modulate the transcription of various genes (reviewed in [3,4]). One of the major roles of pRb is to inhibit cell cycle progression by repressing the transcription of genes required for the G1-S transition, such as *cyclin E* or genes necessary for DNA synthesis, through binding and regulation of the E2F/DP transcription factors [5]. In addition, Rb has also been involved in chromosome dynamics during the M phase (rewieved in [6]).

Besides its roles on cell cycle, pRb regulates a variety of cellular processes, including angiogenesis, senescence, differentiation and apoptosis [7,8]. In opposition to its well-established effects on cell cycle regulation, pRb role in apoptosis appears to be complex. Indeed, on the one hand pRb inactivation, partly by increasing free E2F1 DNA binding activity can induce cell cycle S phase entry and apoptosis, involving p53-dependent or –independent pathways [9,10], which shows that pRb can be anti-apoptotic. On the other hand, several studies have shown that pRb can also be pro-apoptotic in several cellular contexts [11,12,13,14,15,16,17]. Although it has been shown that pRb localizes to mitochondria [18] where it induces apoptosis directly [19], little is known about the mechanisms that regulate pRb apoptotic functions. Many studies in mammals cells have shown that the pRb protein can be cleaved at several sites during apoptosis [20,21,22,23,24]. A cleavage at the C-terminus of pRb generates the $p100^{Rb}$ form [25], and a more internal cleavage generates two forms: $p48^{Rb}$ and $p68^{Rb}$ [26]. These cleavages are realized by specific caspases at consensus cleavage sites ending by an aspartate [25,26]. In addition, we previously described another cleavage of pRb by caspase 9 at a LExD site, which generates the $p76^{Rb}$ form [13]. These cleavages are certainly part of a poorly understood regulation process of pRb functions. Indeed, pRb cleavage can often be observed when apoptosis is induced by different ways, and impairing pRb C-terminus cleavage reduces apoptosis [23,27]. We have shown that $p76^{Rb}$ is pro-apoptotic in several human cell lines [28] but possesses anti-apoptotic properties in rat embryonic fibroblasts [13]. This discrepancy could be related to a differential regulation of apoptotic genes by pRb in human versus rodent cells [29]. Altogether, these results show that cleavage of pRb can exert specific activities on the control of apoptosis.

Drosophila is a powerful model for genetic studies, which can be used to better understand apoptosis regulation by pocket proteins, and modes of regulation of these proteins *in vivo*. Components of the E2F/pRb pathway are highly conserved and simpler in

Drosophila than in mammals. In *Drosophila*, only one DP (dDP), two E2F proteins (dE2F1, dE2F2) and two pRb family proteins (RBF, RBF2) have been described [30,31]. As in mammals, RBF binds to and inhibits the transcription factor dE2F1 [32], thus impairing its ability to induce transcription of genes whose products are necessary for cell cycle progression, like *cyclin E* [33]. In *Drosophila*, loss of function clones for *RBF* display an increased sensitivity to irradiation-induced apoptosis [34,35,36], and an increased level of apoptosis is observed in $RBF^{-/-}$ embryos [37]. According to these studies, RBF has an anti-apoptotic role in *Drosophila*. Despite this prevalent view, we have recently shown that RBF can also exert a pro-apoptotic effect in proliferating cells, in a caspase-dependent manner [38], which is more in acquaintance with its tumor-suppressor role. Thus, the complexity of pRb effects on apoptosis is conserved in *Drosophila*.

In this paper, we identified a TELD site in RBF sequence, which is most probably equivalent to the LExD site of mammalian pRb. In order to determine if RBF TELD site can modulate RBF properties on apoptosis, we generated a mutant form of RBF, RBF^{D253A}, in which the aspartate of the cleavage site, which is necessary for caspase recognition, is switched into an alanine. We observed that RBF^{D253A} expression remains pro-apoptotic in proliferating cells of the wing imaginal disc, the adult wing primordium, and that this process depends on the activation of JNK pathway. Interestingly, RBF^{D253A} expression also induces ectopic proliferation and overgrowth in the wing tissue, which also depend on the JNK pathway but not on *wg* ectopic expression. This overgrowth was never observed when *RBF* was expressed. Therefore, mutating the TELD caspase cleavage site modulates the properties of RBF and affects tissue homeostasis. This result indicates that RBF cleavage by caspases *in vivo* could be important to control its effects on cell fate during development.

Materials and Methods

Fly stocks and breeding conditions

Flies were raised on standard medium. The *UAS-RBF* and *vg-Gal4* strains were generous gifts from J. Silber. The *en-Gal4*, *ptc-Gal4* and *UAS-EGFP* strains were generous gifts from L. Théodore. The *C96-Gal4 strain* was a generous gift from F. Agnes. The *UAS-bsk-RNAi* strain was a generous gift from S. Netter. The *UAS-mtGFP*, *UAS-p35* and the hep^{r75} strains come from the Bloomington stock center, and the *UAS-wg-RNAi* strain comes from the Vienna Drosophila Resource Center. A Canton S w^{1118} line was used as the reference strain. All crosses using the Canton S w^{1118}, *UAS-RBF* and $UAS\text{-}RBF^{D253A}$*(B18)* strains were performed at 25°C and all crosses using the $UAS\text{-}RBF^{D253A}$*(B2.3)* were performed at 21°C to induce production of similar protein levels. In these conditions both lines exhibit similar phenotypes.

Generation of transgenic flies

The *rbf* full-length cDNA was provided by N. Dyson. We generated the non-cleavable form of RBF by changing the aspartate 253 to an alanine. Mutagenesis was conducted with the Quikchange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagen #200518) by using sens RBFmut903 5′CTGGACGGAG-CTG**GCA**TTTCGTCACAATCCG3′ and antisens RBFmut903 5′CGGATTGTGACGAAA**TGC**CAGCTCCGTCCAG3′ primers. The Not1/Kpn1 insert was then subcloned into the pUAST vector to produce the pUAST-RBF^{D253A} vector and sequenced to verify its integrity. The pUAST-RBF^{D253A} construct was injected into Canton S w^{1118} fly embryos following standard procedures to obtain transgenic *Drosophila* strains. Independent transgenic lines were characterized and used for further experiments.

TUNEL staining of imaginal discs

C96-Gal4, *vg-Gal4* and *ptc-Gal4* females were crossed with w^{1118}, *UAS-RBF*, $UAS\text{-}RBF^{D253A}$ or *UAS-bsk-RNAi* males for apoptosis detection. Wing imaginal discs of the progeny were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/formaldehyde 3.7%, washed three times for 20 min in PBT (1X PBS, 0.5% Triton). Discs were then dissected, TUNEL staining was performed following manufacturer's instructions (ApopTag Red *in situ* apoptosis detection kit, Chemicon), and discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley) and observed with a conventional Leica DMRHC research microscope using the N2.1 filter. For quantification experiments, discs were observed with a Leica SPE upright confocal microscope. White patches in the wing pouch were counted for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha<5\%$.

Histochemistry

The following antibodies were used: anti-RBF (rabbit polyclonal anti-RBF, 1:500, Custom antibody), anti-Wg (mouse monoclonal antibody, DSHB, clone number 4D4, 1:100), anti-Ⓟ-JNK (rabbit polyclonal antibody, 1:500, Promega number V7931). Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/3.7% formaldehyde, washed three times for 20 min each in PBT (1X PBS, 0.3% Triton) and incubated with the primary antibody overnight at 4°C in PBT/FCS (1X PBS, 0.3% Triton, 10% FCS). Incubation with the secondary antibody was carried in PBT/FCS for 2 hours at room temperature. Larvae were then washed thrice in PBT and placed in PBS/glycerol (1:1) overnight at 4°C. Finally, discs were mounted in Citifluor™ (Biovalley) and observed with a conventional Leica DMRHC research microscope, using the L5 filter to detect green fluorescence, the N2.1 filter for the red fluorescence.

BrdU labeling of wing discs

ptc-GAL4 or *en-GAL4* females were crossed with *UAS-RBF* and $UAS\text{-}RBF^{D253A}$ males, and with w^{1118} males for the control. Larvae were fed for 2 h on medium supplemented with 1 mg/ml BrdU. They were then dissected in 1X PBS pH 7.6, and fixed in PBT/formaldehyde (PBS 1X/5% formaldehyde/0.3% Triton X-100) for 20 min at room temperature, washed three times for 31min in PBT, denatured in 2.2 N HCl/0.1% Triton X-100 by two 15 minute-long incubations, neutralized with 100 mM sodium tetraborate (Borax) by two 5 minute-long incubations. For immunohistochemistry, larvae were blocked by incubation in PBT/10% fetal calf serum (FCS) for 45 min, incubated with mouse anti-BrdU monoclonal antibody (1: 200, DSHB) overnight at 4°C and washed thrice in PBT/FCS. Discs were then incubated with anti-mouse IgG-FITC (1: 200, Jackson Immuno Research) and washed thrice in PBT. Discs were mounted in Citifluor™ and observed with a Leica SP2 upright confocal microscope.

Results

Generation of RBF^{D253A}, a mutant form of RBF affecting a consensus conserved caspase cleavage site

We have used the CASVM web server [39] to scan the full length RBF for potential caspase cleavage sites predicted by the support vector machines (SVM) algorithm [40]. This was done with the P14P10′ window (tetrapeptide cleavage sites with ten additional upstream and downstream flanking sequences) which

has the highest accuracy. Using this window, only one caspase cleavage site was found in RBF (Figure S1A in File S1). This unique conserved cleavage site, TELD, fulfills the criteria of substrate specificity reported for Dronc, the *Drosophila* homologue of Caspase 9 [41,42]. Furthermore, the TELD sequence is located in position 253 of RBF in the region containing the LExD site that leads to the generation of the p76Rb form in mammals [13] and a consensus caspase cleavage site, LEND, can also been found in the *C. elegans* homolog at the same position (Figure S1B in File S1). The conservation of a caspase cleavage site through evolution suggests a physiological role for RBF cleavage in this region including in *Drosophila*.

Using western blot analysis we were unable to consistently observe a band at the expected apparent molecular weight of the cleaved form. We explain this difficulty by the incapacity of the only available antibody to reveal cleaved forms. To by-pass this problem, vectors allowing the expression of C-terminal HA-tagged forms of RBF and RBF^{p76}, the C-terminal part of *RBF* expected to result from a cleavage at the putative caspase site were transfected into S2 cells. Western blot experiments reveal the presence of cleaved forms of RBF (Figure S1C in File S1). One of these has the expected size of RBF^{p76}. This result shows that RBF can be cleaved in the TELD region.

As caspases recognize specific motifs ending by an aspartate, we generated a mutant form of RBF, RBF^{D253A}, in which aspartate 253 is switched into an alanine. This mutation should impair a cleavage of the RBF protein at the TELD site by caspases. This kind of approach was successfully conducted in mammals to generate a cleavage-resistant form of pRb at a C-terminus consensus cleavage site by caspases [25]. Indeed, the expression of the HA-tagged form of RBF^{D253A} in S2 cells does not seem to generate the cleaved form (Figure S1C in File S1). In order to determine if the RBF consensus caspase cleavage site could have a physiological relevance in regulating RBF functions *in vivo*, we generated several independent transgenic fly strains carrying the RBF^{D253A} mutant form under control of the *UAS* transcription regulating sequence.

Expression of RBF or RBF^{D253A} induces different phenotypes

To determine if the mutation of the TELD site modifies RBF activity, we tested if expression of *RBF* and RBF^{D253A} could result in different adult phenotypes. Since the random insertion locus of transgenes in *Drosophila* transgenic strains can induce different expression rates of a same transgene in independent transgenic strains, we have studied two independent RBF^{D253A} transgenic strains. The phenotypes were similar for both transgenic lines (data not shown). To compare *RBF* and RBF^{D253A} effects, we first verified by RT-qPCR and western blot that *RBF* mRNA level and full-length RBF protein rates were similar in RBF and RBF^{D253A} transgenic strains (Figure S2 in File S1).

Since our previous results have shown that RBF expression is pro-apoptotic in cycling cells whereas it is not in post-mitotic cells [38], we used various wing specific drivers allowing an expression in cycling or non-cycling cells of the wing imaginal disc. In agreement with our previous results, we observed that RBF expression in non-cycling cells of the dorso-ventral boundary (ZNC) did not affect wing development, as adult *C96>RBF* wings showed wild type phenotype similar to *C96-Gal4/+* control wings (Fig. 1, A, B). On the contrary, $C96>RBF^{D253A}$ wings presented notches at their margin (Fig. 1 C, asterisks) that resulted from tissue loss. Thus, the mutant and wild-type forms of RBF display different properties in non-cycling cells, which indicates that mutating the TELD site modifies RBF properties in these cells.

We have previously shown that *RBF* expression in cycling cells, under *vg-Gal4* driver, generates notches in the wing margin, which result from RBF induced-apoptosis during third larval instar in the *vg-Gal4* expression domain of the wing imaginal disc. To test the effects of RBF^{D253A} expression in proliferating wing cells, we also used the *vg-Gal4* driver. Expression of *RBF* under control of the *vg-Gal4* driver led to notches at the wing margin (Fig. 1E, asterisks) and RBF^{D253A} conserved this property (Fig. 1 F). Strikingly, using several independent transgenic strains, we also observed a phenotype of ectopic tissue next to the hinge of the wing, in up to 30% of the $vg>RBF^{D253A}$ flies (Fig. 1F, arrow). This phenotype is probably the consequence of abnormal cell proliferation and is specific of the RBF^{D253A} form as it was never observed when wild type *RBF* was expressed at equivalent levels.

Finally, we tested the effects of ubiquitous expression of *RBF* and RBF^{D253A} under control of the *da-Gal4* driver. Such expression of *RBF* at 25°C induced notches on the wing margin (data not shown). Ubiquitous expression of RBF^{D253A} was lethal when flies were raised at 25°C as well as at lower temperature (21°C) to reduce RBF^{D253A} quantity. In contrast, *RBF* ubiquitous expression never revealed lethal, even at higher levels when flies were raised at 29°C.

Altogether, these results show that RBF^{D253A} properties differ from RBF properties, both in cycling and non-cycling cells during development. Therefore, a cleavage of RBF at the TELD site may be important to regulate its functions in different cellular contexts.

RBF^{D253A} induces more apoptosis than RBF in the wing imaginal disc

We have previously shown that *RBF* expression in proliferative cells induces apoptosis, including in the wing tissue. To check if RBF^{D253A}-induced notch phenotype was also correlated with apoptosis induction, we performed TUNEL staining on larvae wing imaginal discs expressing *UAS-RBF* or $UAS\text{-}RBF^{D253A}$ under the control of *C96-Gal4* or *vg-Gal4* drivers (Fig. 2). The expression domains of these drivers were visualized in control wing discs by inducing *UAS-mtGFP* (Fig. 2A,E). In *C96-Gal4* and *vg-Gal4* control discs (Fig. 2B and F), developmental apoptosis was rare (few white bright dots). In *C96>RBF* wing discs (Fig 2 C), TUNEL staining was similar to control discs, which shows that RBF does not induce apoptosis in cells of the ZNC, in acquaintance with the absence of notches in *C96>RBF* adult wings (Fig 1 B). On the contrary, in $C96>RBF^{D253A}$ wing discs, some cells located at the center of the pouch in the zone corresponding to the ZNC were TUNEL labeled (Fig 2 D, arrows). Similar results were observed using Acridine Orange (AO) staining (Figure S3 in File S1) indicating that RBF^{D253A} expression induces apoptosis in this region, leading to the appearance of notches in adult wings (Fig 1 C). In *vg>RBF* and $vg>RBF^{D253A}$ wing discs, apoptotic cells were observed within the driver expression domains (Fig. 2 G, H white arrows). Interestingly, RBF did not induce apoptosis at the center of the pouch in *vg>RBF* discs (Fig 2 G, arrow head) whereas RBF^{D253A} is pro-apoptotic in this area that includes the ZNC. These observations are coherent with the fact that, contrarily to RBF, RBF^{D253A} is pro-apoptotic in non-proliferating cells as observed with the *C96-Gal4* driver.

We also tested the effects of *RBF* and RBF^{D253A} expression in cycling cells in a different and more restricted expression domain. Using *ptc-Gal4* we drove *RBF* and RBF^{D253A} expression at the antero-posterior boundary of the wing imaginal disc. Similar experiments on *ptc>RBF* and $ptc>RBF^{D253A}$ wing discs also showed that *RBF* and RBF^{D253A} expression was associated with apoptosis (Figure S4 in File S1), confirming that both forms are pro-apoptotic in proliferating cells. In these experiments using *vg-*

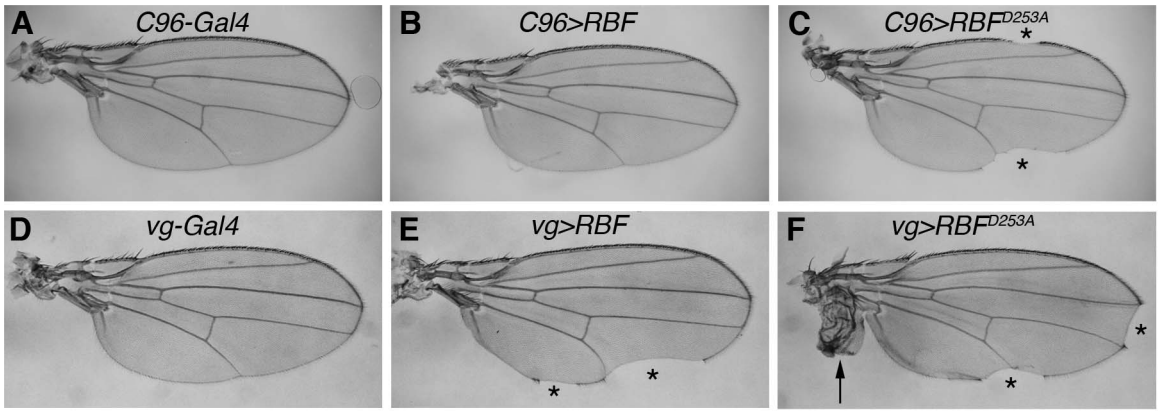


Figure 1. RBF and RBF^{D253A} induce different phenotypes in adult wings. Transgenes were expressed in non-proliferating cells of the ZNC during wing development (A–C) or proliferating cells along the dorso-ventral boundary (D–F). (A) *C96-Gal4/+* control wings show a continuous wing margin. (B) *C96-Gal4/UAS-RBF* adult wings are similar to control wings. (C) In *UAS-RBF^{D253A}/+; C96-Gal4/+* flies, *RBF^{D253A}* induces notches at the wing margin (asterisks). (D) *vg-Gal4/+* control wings display a continuous wing margin. (E) In *vg-Gal4/+; UAS-RBF/+* flies, *RBF* expression induces notches at the wing margin (asterisks). (F) In *vg-Gal4/UAS-RBF^{D253A}* flies, *RBF^{D253A}* expression provokes not only notches (asterisks) but also the apparition of hyperplastic tissue in the wing (arrow).
doi:10.1371/journal.pone.0102902.g001

Gal4 and *ptc-Gal4* to drive the expression of both RBF forms, it seemed that more cells were apoptotic in *RBF^{D253A}* -expressing discs. To test if RBF^{D253A} induced significantly more apoptosis than RBF, we have quantified TUNEL staining of *vg>RBF* or *vg>RBF^{D253A}* wing imaginal discs. Staining patches in the wing pouch were counted for at least 30 imaginal discs per genotype (Fig 3). We observed that RBF^{D253A} induced significantly more apoptosis than RBF ($\alpha<5\%$).

RBF^{D253A} induces increased proliferation of neighboring cells

In order to check if the overgrowth observed in wings of RBF^{D253A} expressing flies was due to an enhanced proliferation, we performed a BrdU incorporation assay to label cells in the S phase of the cell cycle in wing imaginal discs. As this tissue is highly proliferative, BrdU incorporation occurred throughout the whole disc. Only a small population of cells is arrested in the cell cycle and forms the ZNC, which is situated at the center of the wing pouch (Fig. 4A,G, white arrows). We used the *en-Gal4* driver to express *RBF* forms in the posterior part of the discs, allowing the use of the anterior compartment as an internal control. Over-expression of *RBF* and *RBF^{D253A}* was visualized by RBF staining (red) (Fig. 4B, C). The BrdU incorporation profile was similar in both *RBF*-expressing and control discs (Fig. 4A,B and D,E). On the contrary, a more intense BrdU staining was observed in the most posterior part of discs expressing *RBF^{D253A}*, but also in cells located near the antero-posterior border, a region that did not express *RBF^{D253A}* in these discs (Fig. 4C, see arrowheads).

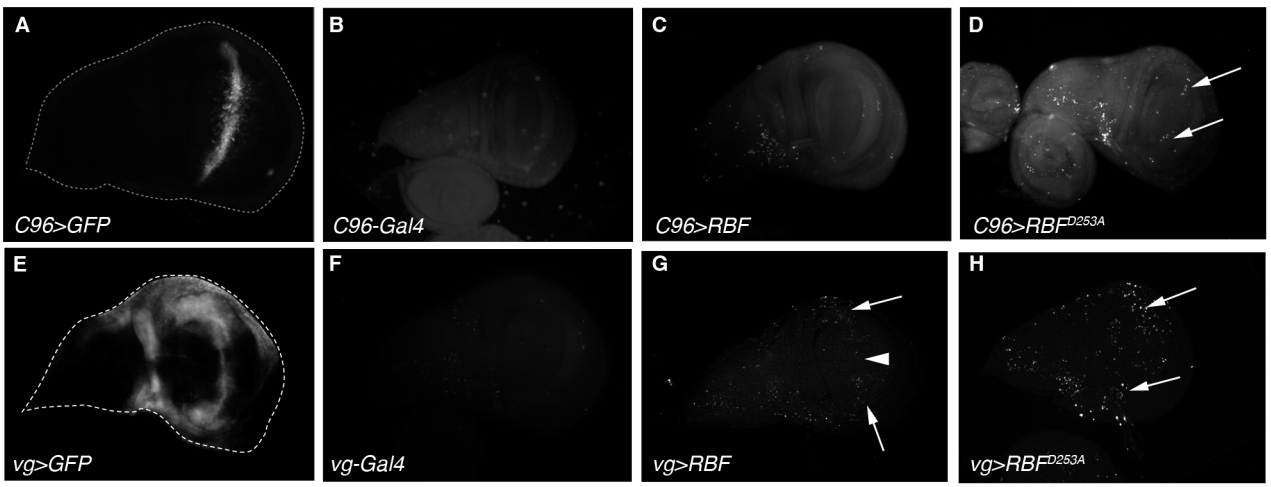


Figure 2. RBF^{D253A} is pro-apoptotic in the ZNC and induces more apoptosis than RBF in third instar larvae wing imaginal discs. (A, E) *C96-Gal4* and *vg-Gal4* expression patterns are visualized by *UAS-mtGFP* expression in third instar larvae wing imaginal discs. (B-D, F-H) Apoptotic cells are labeled by TUNEL in wing imaginal discs; specific staining of apoptotic cells corresponds to bright white patches. (B, F) *C96-Gal4/+* and *vg-Gal4/+* control discs have few apoptotic cells. (C) *C96-Gal4/UAS-RBF* wing discs are similar to control. (D) Some apoptotic cells are observed within the *C96-Gal4* expression domain in *UAS-RBF^{D253A}/X; C96-Gal4/+* discs (white arrow). (G, H) Apoptotic cells are observed within the *vg-Gal4* expression domain in *vg-Gal4/+; UAS-RBF/+* and *UAS-RBF^{D253A}/X; vg-Gal4/+* wing discs (white arrows). (G) The white arrowhead indicates a zone at the center of the pouch where cells are not TUNEL-labeled in *vg-Gal4/+; UAS-RBF/+* wing discs. All discs are shown with posterior to the top.
doi:10.1371/journal.pone.0102902.g002

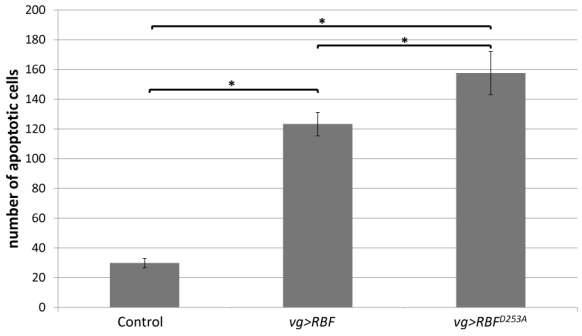


Figure 3. RBF^{D253A} is more pro-apoptotic than RBF in third instar larvae wing imaginal discs. Apoptotic cells were visualized by TUNEL staining of wing imaginal discs of *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF/+* or *vg-Gal4/UAS-RBF^{D253A}* genotypes. TUNEL positive cells in the wing pouch were quantified. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's test, p<0,05).
doi:10.1371/journal.pone.0102902.g003

Therefore, *RBF^{D253A}* expression specifically induces abnormal proliferation of cells in a non-autonomous way.

As *en-Gal4* is expressed throughout the whole posterior part of the discs, we used the *ptc-Gal4* driver to reduce possible alterations of the disc morphology when *RBF^{D253A}* is expressed. In *ptc>RBF^{D253A}* discs, *RBF^{D253A}* is expressed along the antero-posterior boundary that crosses the ZNC at its center. Non-cycling cells of the ZNC do not incorporate BrdU, thus abnormal BrdU staining in these cells is easy to detect. In *ptc>RBF* wing discs, BrdU staining was similar to control discs (Fig. 4G,H). None of the cells of the ZNC, whether they expressed *RBF* or not, displayed abnormal staining (Fig. 4J,K boxed areas showing the intersection of the ZNC with the antero-posterior boundary). On the contrary, in *ptc>RBF^{D253A}* discs, we observed BrdU-labeled cells within the ZNC in the posterior side. This abnormal proliferation was adjacent to RBF^{D253A}-expressing cells (Fig. 4 I,L boxed area). We observed that these cells localized in the posterior compartment along the antero-posterior boundary expressed ectopically the dorso-ventral boundary marker *wg*, and thus normally belong to the ZNC (Figure S5 in File S1). Therefore, these observations suggest that cells of the ZNC that do not express RBF^{D253A} are induced to proliferate when this mutant form is expressed along the antero-posterior border of the disc. These results confirm that RBF^{D253A} expression is able to induce abnormal proliferation of neighboring cells, even in a domain in which cells are normally arrested in the G1 phase of the cell cycle.

It is well established that cells undergoing apoptosis in a growing tissue promote proliferation of surrounding healthy cells [43], maintaining tissue homeostasis by a process named apoptosis-induced proliferation [44,45]. We have observed that both RBF and RBF^{D253A} could induce apoptosis in proliferating cells and that *RBF^{D253A}* induced more apoptosis than *RBF* when expressed at a similar rate. As RBF^{D253A} enhanced the proliferation rate of cells adjacent to its expression domains and subsequent wing tissue overgrowth, we wondered if the apparition of ectopic tissue in the wing was a specific effect of *RBF^{D253A}* expression, and not only a consequence of an increased apoptosis induced by this mutant form. For this reason, we tested if enhancing RBF-induced apoptosis could result in tissue overgrowth. As the UAS/Gal4 system efficiency depends on temperature, we increased the breeding temperature of *vg>RBF* flies from 25°C to 29°C to enhance *RBF* expression. We also elevated the dose of *UAS-RBF* by expressing two independent *p[UAS-RBF]* transgene insertions in the same flies. Under these conditions, the strength of the notch phenotype and the level of AO staining in wing discs were increased to the same level as what was observed with the RBF^{D253A} construct, but we never observed ectopic tissue in the wings (data not shown). Thus, the effect of RBF^{D253A} on proliferation is specific of this mutant form, which reinforces the view that RBF cleavage could be necessary to control its activities *in vivo*. It suggests that RBF^{D253A} amplifies an apoptosis-induced proliferation mechanism, leading to an excessive proliferation in response to apoptosis.

Activity of the JNK pathway is necessary for RBF- and RBF^{D253A}-induced apoptosis and for RBF^{D253A}-induced overgrowth

The JNK pathway is implicated in both apoptotic and proliferation processes (reviewed in [46]). Among these processes, compensatory proliferation allows injured tissues to recover their original size by inducing ectopic proliferation of surviving cells. Moreover, in models involving cells induced to die by apoptosis but kept alive by the caspase inhibitor p35, the so-called ''undead cells'' emit persistent mitogen signaling that promotes overgrowth under control of the JNK pathway [43]. We thus tested if the JNK pathway was required for RBF- and RBF^{D253A}-induced apoptosis and for RBF^{D253A}-induced ectopic proliferation. The active form of the *Drosophila* JNK Bsk was stained with an anti-Ⓟ-JNK antibody in *ptc>RBF* and *ptc>RBF^{D253A}* wing discs. In *ptc-Gal4/+* control discs, we did not detect any specific staining in the *ptc* domain, which indicates that the JNK pathway is not activated in this domain during normal development (Fig. 5 A). On the contrary, in *ptc>RBF* and *ptc>RBF^{D253A}* discs, we observed JNK activation in the *ptc-Gal4* expression domain, *i.e.* at the antero-posterior border of the discs (Fig. 5 B, C). This activation was strong in young third instar larvae, and decreased when larvae got older (data not shown).

To test if the JNK pathway was required for RBF-dependent apoptosis, we used a *p[UAS-bsk-RNAi]* transgene to disrupt the JNK pathway. Under *vg-Gal4*, the number and size of notches present at the wing margin is correlated with the amount of apoptosis [38]. We classified the wing phenotypes into four categories (wild type, weak, intermediate and strong) according to the number and size of notches (Fig. 5D, asterisks). In a control experiment, we verified that wings were wild type in *vg>bsk-RNAi* flies (data not shown). We assayed for the strength of the notch phenotype in wings of *vg>RBF* flies in presence or absence of *UAS-bsk-RNAi* (Fig. 5D). When *bsk-RNAi* was co-expressed with *RBF*, distribution of the phenotypes significantly shifted toward weaker phenotypes when compared to the expression of *RBF* alone (Wilcoxon test, $\alpha < 10^{-15}$, n = 540) (Fig. 5D). We also disrupted the JNK pathway by using the *hep^{r75}* mutant and observed that distribution of the RBF-induced notch phenotype was weaker in the *hep^{r75}* mutant background (data not shown). These results clearly show that the JNK pathway is involved in RBF-induced apoptosis.

We also tested if the JNK pathway activation was required for RBF^{D253A}-induced apoptosis and ectopic tissue. We counted the number of *vg>RBF^{D253A}* flies presenting ectopic tissue in the wing in the presence or absence of *UAS-bsk-RNAi* and observed a strong decrease of their frequency: from 22.1% of *vg>RBF^{D253A}* flies to only 1.9% of *vg>RBF^{D253A}, bsk-RNAi* flies displaying overgrowth (Chi^2 test, $\alpha = 8.8E\text{-}15$) (Fig. 5E). We obtained similar results with *vg>RBF^{D253A}* flies in a *hep^{r75}* heterozygous background (data not shown). In parallel, we performed TUNEL staining in *vg>RBF^{D253A}* wing imaginal discs in the presence or absence of *UAS-bsk-RNAi* (Fig. 5F), and detected less apoptotic cells when *bsk-RNAi* was co-expressed. Thus, similarly to RBF,

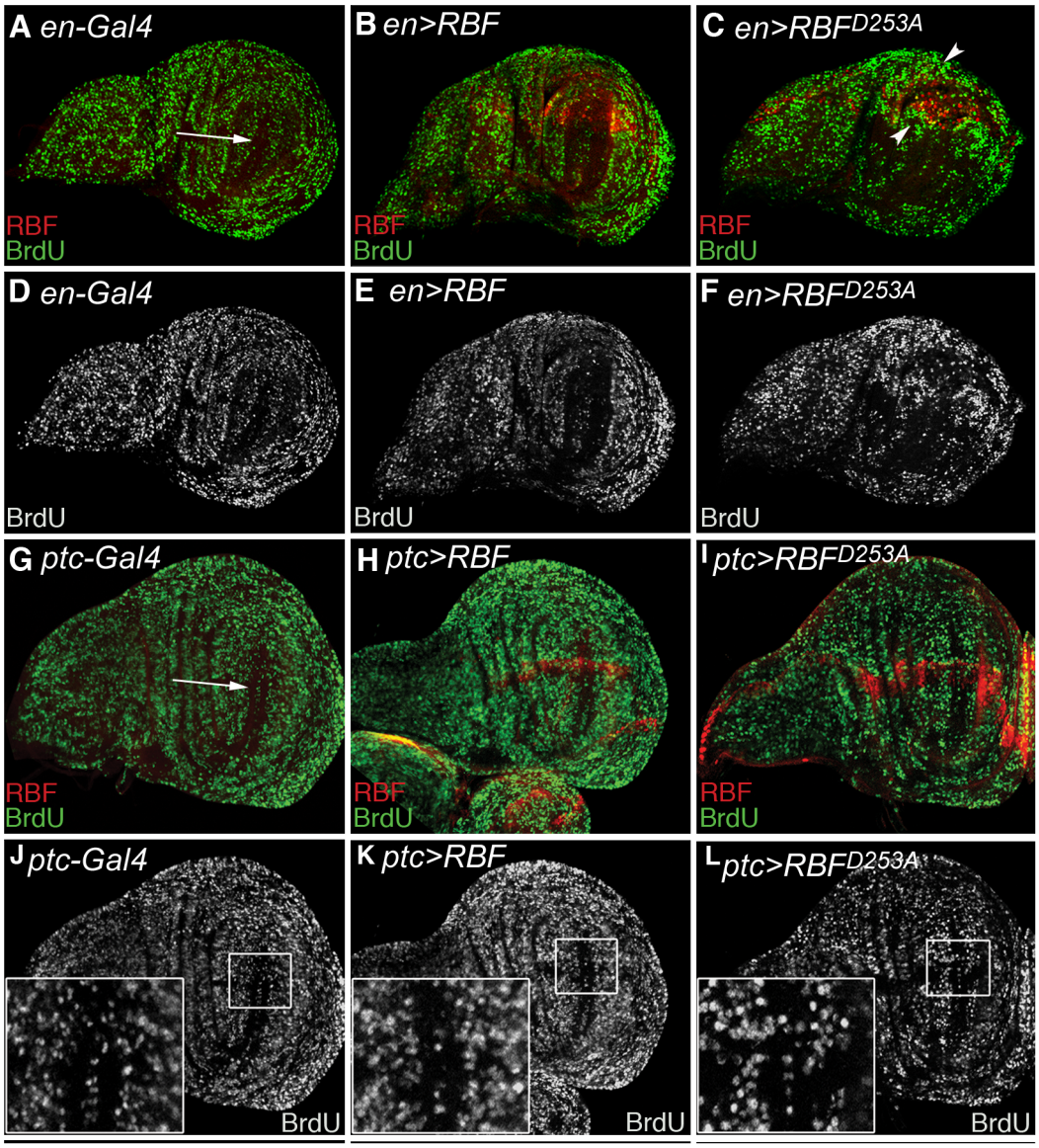


Figure 4. *RBF^{D253A}* expression induces proliferation of neighboring cells. (A–F) From left to right, phenotypes of the larvae are: *en-Gal4/+*, *en-Gal4/+*; *UAS-RBF/+* and *UAS-RBF^{D253A}X; en-Gal4/+*. (A–C) S phase staining by BrdU (green), and RBF immuno-staining (red). (D–F) BrdU staining (white) of the discs shown in (A–C). (B, E) In RBF expressing discs, as in the control disc shown in (A,D), BrdU staining is homogeneous in the whole disc, except in the ZNC (Zone of Non-proliferating Cells) (white arrow). (C–F) In RBF^{D253A} expressing discs, cells surrounding the strong RBF staining exhibit an enhanced BrdU staining, indicating that these cells have an increased proliferation rate. (G–L) From left to right, genotypes of the larvae are: *ptc-Gal4/+*, *ptc-Gal4/UAS-RBF*, and *UAS-RBF^{D253A}* X; *ptc-Gal4/+*. (G–I) S phase staining by BrdU (green), and RBF staining (red). (J–L) BrdU staining (white) of the discs shown in (G–I) with enlarged view of boxed area. (G, J) BrdU staining is homogeneous in the whole disc, except in the ZNC (white arrow). (I–L) In *ptc>RBF^{D253A}* discs, cells within the ZNC that are adjacent to RBF^{D253A} expressing cells are labeled with BrdU, indicating an abnormal proliferation of these cells. All discs are shown with posterior to the top.
doi:10.1371/journal.pone.0102902.g004

RBF^{D253A}-induced apoptosis depends on the activity of the JNK pathway.

In conclusion, we demonstrated that RBF and RBF^{D253A} activate the JNK pathway, that this pathway mediates both RBF and RBF^{D253A} -induced apoptosis, and is responsible for RBF^{D253A}-induced overgrowth.

RBF^{D253A}-induced overgrowth does not depend on wg ectopic expression

As previously indicated, the JNK pathway is essential to both RBF^{D253A}-induced overgrowth, and over-proliferation induced by "undead cells". Its over-activation in "undead cells" leads to ectopic synthesis and secretion of the mitogenic proteins Wg and Dpp in a long lasting manner, leading to an over-proliferation of neighboring cells and overgrowth phenotypes [43]. Since RBF^{D253A}-induced overgrowth depends on JNK pathway activation, we wondered if this process was provoked by a similar mechanism. We thus co-expressed *RBF* and *p35* in wing discs to generate undead cells depending on RBF-induced apoptosis, and compare the *wg* expression pattern in these discs to *wg* expression in RBF^{D253A} expressing discs. In *vg>RBF, p35* flies raised at 25°C, only one wing observed displayed overgrowth out of 123

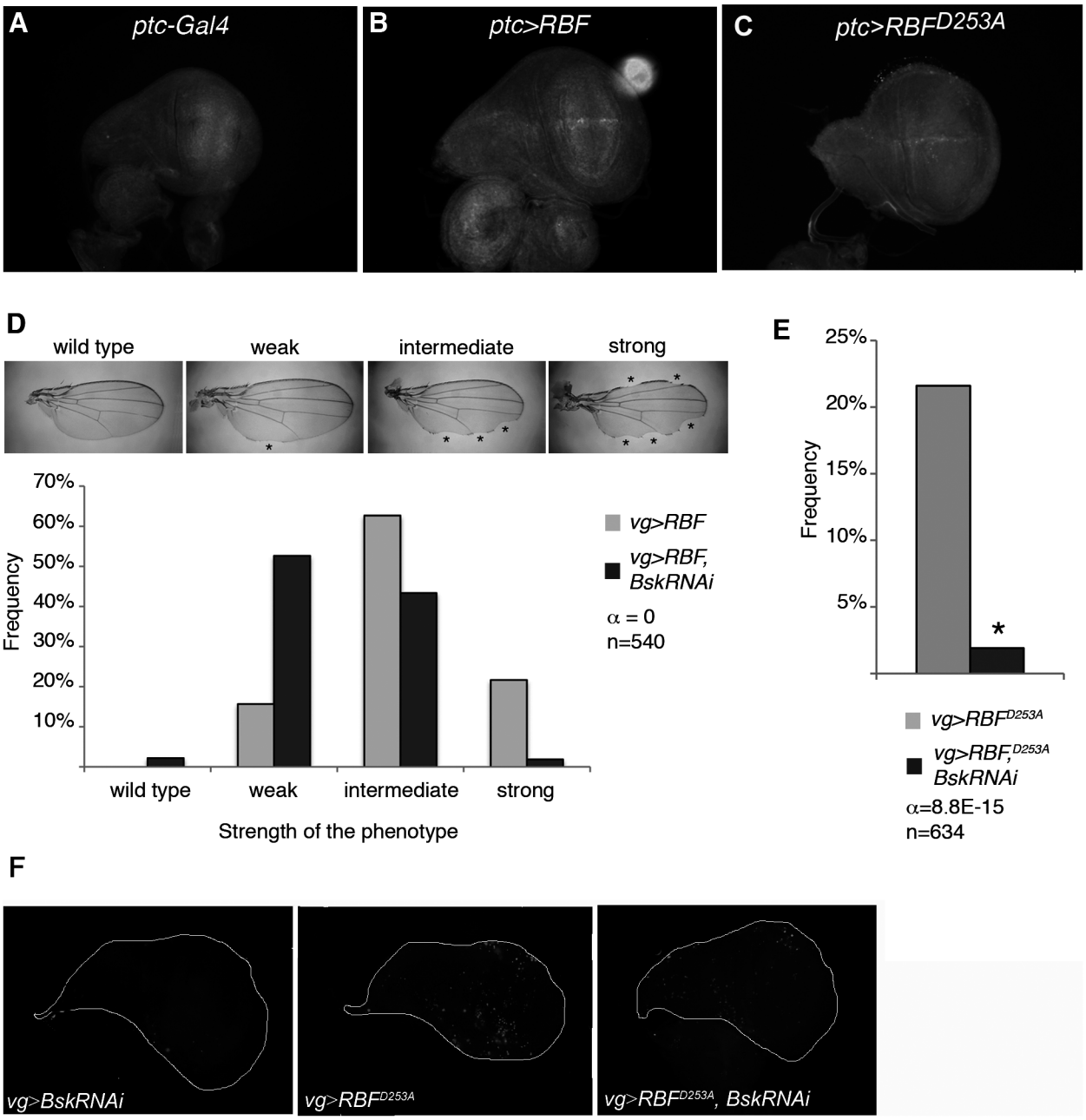


Figure 5. RBF- and RBF^{D253A}-induced apoptosis as well as RBF^{D253A}-induced overgrowth depend on the JNK pathway activity. (A–C) Anti-Ⓟ-JNK staining in young third instar larvae wing imaginal discs. (A) No staining is observed in *ptc-Gal4/+* control. (B, C) *UAS-RBF/ptc-Gal4* and *UAS-RBF^{D253A}/X; ptc-Gal4/+* discs present anti-Ⓟ-JNK staining at the dorso-ventral boundary. All discs are shown with posterior to the top. (D) Notch phenotypes in adult wings of *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF* and *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF/UAS-bsk-RNAi* flies are grouped into four categories (wild type, weak, intermediate and strong) according to the number and size of notches observed on the wing margin (asterisks). *Bsk-RNAi* partially suppresses *RBF*-induced notch phenotypes (Wilcoxon test, $\alpha < 10^{-15}$, n = 540). (E) The frequency of RBF^{D253A}-induced ectopic tissue growth is strongly decreased in *UAS-bsk-RNAi* co-expressing flies (Chi^2 test, $\alpha = 8.8\ 10^{-15}$). (F) TUNEL-labeling of apoptotic cells in wing imaginal discs; specific staining of apoptotic cells corresponds to bright patches in wing discs *of vg-Gal4/+*; *UAS-bsk-RNAi/+* (left panel), *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF^{D253A}/+* (center panel), *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF^{D253A}/UAS-bsk-RNAi* (right panel) *larvae*. RNAi-mediated knockdown of *bsk* strongly decreased RBF^{D253A}-induced apoptosis. All discs are shown with posterior to the top.

doi:10.1371/journal.pone.0102902.g005

flies counted. Therefore, even in the presence of p35, RBF does not seem to induce an overgrowth phenotype that would result from the presence of undead cells. However, at 29°C, more wings co-expressing RBF and p35 presented overgrowth phenotype (10 wings out of 35), but in such extreme conditions only few flies hatched. We tested if the Wg pattern was altered in these conditions as it has been observed in the presence of "undead cells". We used the *en-Gal4* driver and compared the Wg staining in the control anterior compartment and in the posterior compartment that expresses RBF. *en>RBF* wing discs displayed a wild type Wg pattern similar to what was observed in *en-Gal/+* control discs (data not shown). In *en>RBF, p35* wing discs, the

Wg pattern in the posterior compartment is altered when compared to control *en>p35* disc (Figure S6 panel D,E in File S1). Ectopic patches were observed outside the normal *wg* expression domain (Figure S6 panel E, white arrows in File S1) as was reported in studies of undead cells-induced overgrowth [47]. In *en>RBF*^{D253A} discs, the *wg* expression pattern is also altered, but is different from what is observed in *en>RBF*, p35 discs. We did not observe any ectopic Wg patch in *en>RBF*^{D253A} wing discs, but an enlargement of the Wg pattern in the posterior part of the disc (Figure S6 panel F in File S1). Thus, the *wg* expression pattern in *en>RBF, p35* and in *en>RBF*^{D253A} wing discs is clearly different.

We also tested if Wg was required for RBF^{D253A}-induced overgrowth by using a *UAS-wg-RNAi* construct. In *en>wg-RNAi* wing discs, the Wg staining observed after immuno-detection was strongly decreased in the posterior compartment, indicating that this *wg-RNAi* construct efficiently abolished *wg* translation (Fig. 6 A, B). We did not observe any significant difference in the frequency of overgrowth phenotype between *vg>RBF*^{D253A} and *vg>RBF*^{D253A}*, wg-RNAi* flies (Fig. 6 C). Taken together, these results show that co-expression of *RBF* and *p35* induces hyperplastic proliferation and *wg* ectopic expression as described previously for other pro-apoptotic genes in undead cells. In a distinct manner, RBF^{D253A} expression seems to induce overgrowth that would implicate the JNK pathway but not *wg* ectopic expression. These results suggest that a mutation of the TELD sequence of RBF deregulates apoptosis-induced proliferation, in a JNK-dependent and Wg-independent way.

Discussion

In this study, we have generated transgenic Drosophila strains expressing a *RBF*^{D253A} mutant form under control of the *UAS/* Gal4 system. We observed that this form has an increased pro-apoptotic activity compared to RBF and induces abnormal non-cell autonomous proliferation. This different effect of *RBF*^{D253A} cannot be explained by a modulation in level of the full-length RBF protein. In the wing imaginal disc, RBF^{D253A}, but not RBF, induces apoptosis in non-proliferative cells of the ZNC. One can hypothesize that RBF^{D253A} is more stable than RBF, and that an increased level of full-length protein in these cells is pro-apoptotic. In this model, excessive wild type RBF would be cleaved in cells of the ZNC in order to maintain a physiological level of this form, preventing an apoptotic effect of accumulated full-length protein. However, we have controlled by western blot that levels of RBF higher than RBF^{D253A} levels do not induce apoptosis in cells of the ZNC (data not shown) which rules out this hypothesis. Moreover, RBF^{D253A} ubiquitous expression is lethal whereas it is not the case even for higher levels of wild-type RBF. Therefore, these results suggest that the mutant form displays specific properties.

Mutation of the TELD site could modify the interactions between RBF and some of its partners and thus modulate its activity. This site is located in the N-terminal domain of the protein. The crystal structure of the Rb N-terminal domain (RbN) has revealed a globular entity formed by two rigidly connected cyclin-like folds [48]. By analogy, we can assume that the TELD sequence of RBF is located in a proteolytically labile linker important for its conformation and its binding to partners.

Furthermore, the effect of RBF^{D253A} on proliferative tissue differs from that of RBF, as it can induce abnormal non-cell autonomous proliferation. We observed that *vg>RBF*^{D253A} adult wings present an overgrowth phenotype that was never observed when RBF was expressed, even at high levels. This overgrowth was correlated to some excessive proliferation induced in wing imaginal discs by RBF^{D253A} expression.

We hypothesize that the lethality associated with RBF^{D253A} ubiquitous expression could be a consequence of this excessive proliferation. Altogether, our results show that the TELD site is important for RBF properties, in the control of both apoptosis and apoptosis-induced proliferation.

Our results suggest that the mechanism involved in the RBF^{D253A}-induced overgrowth phenotype depends on the JNK pathway as inhibition of this pathway by expressing *bsk-RNAi* or in a *hep*^{r75} heterozygous mutant background abrogated almost completely RBF^{D253A}-induced overgrowth. Nevertheless, a simple activation of the JNK pathway in the RBF^{D253A}-induced overgrowth phenotype is not sufficient to explain the different effects of RBF and RBF^{D253A} on proliferation, as RBF is also able to induce JNK activation but without any overgrowth phenotype. The JNK pathway is involved in both RBF- and RBF^{D253A}-induced apoptosis, thus we cannot exclude that the inhibition of RBF^{D253A}-induced overgrowth phenotype is a consequence of the

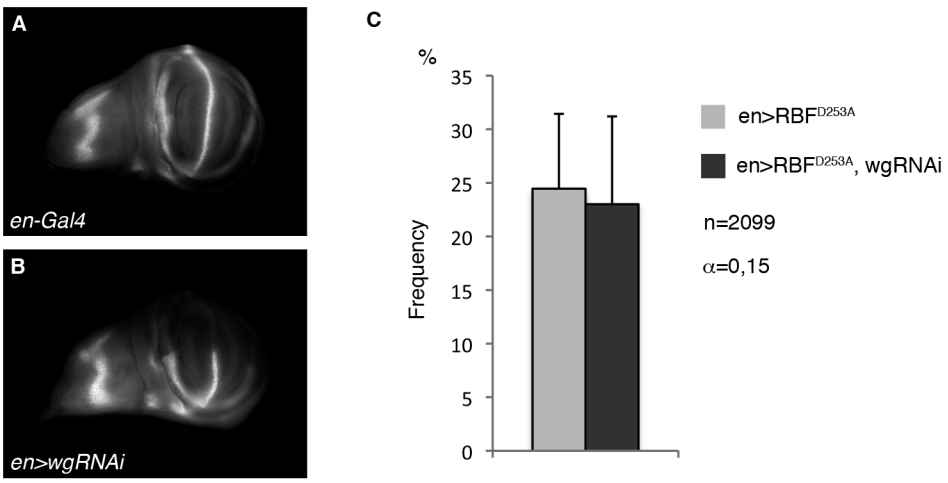


Figure 6. RBF^{D253A}-induced overgrowth does not depend on Wg. (A, B) Anti-Wg staining in wing imaginal discs of control (A) or *en-Gal4, UAS-wg-RNAi* third instar larvae (B). No staining is observed in the posterior compartment of discs that express *wg-RNAi*. (C) The frequency of RBF^{D253A}-induced ectopic tissue growth is not affected in *UAS-wg-RNAi* co-expressing flies (Chi^2 test, $\alpha = 0.15$). All discs are shown with posterior to the top.
doi:10.1371/journal.pone.0102902.g006

decrease of apoptosis in *bsk-RNAi* expressing and *hep*^{r75} contexts. Indeed, RBF^{D253A}-induced overgrowth phenotype could result from a misregulation of an apoptosis-induced proliferation process. But this cellular process, by which apoptotic cells promote proliferation of surrounding living cells, also depends on the JNK pathway. Similarly in the literature, "undead cells", which are kept alive by the caspase inhibitor p35 after induction of apoptosis by a pro-apoptotic gene, induce non-cell autonomous proliferation by a persistent activation of the JNK pathway [43,47,49,50,51]. Since the JNK pathway is essential for RBF^{D253A}-induced overgrowth, it is possible that this cleavage-resistant form of RBF possesses an increased ability to activate the JNK in a manner that could enhance the JNK non-apoptotic functions.

Further investigation will be necessary to clarify the consequences of the JNK pathway activation by RBF and RBF^{D253A}, and why this activation could lead to different phenotypes. One could also hypothesize that RBF and RBF^{D253A} do not activate the JNK pathway through the same upstream components, which could lead to different effects.

We showed that contrarily to what is observed in the presence of undead cells, RBF^{D253A}-induced overgrowth does not require Wg activity. In undead cells, the JNK pathway activation has been shown to lead to ectopic *wg* expression that is responsible for the observed overgrowth [43,47,49,52]. Moreover, the secretion of Wg is not limited to undead cells, but also occurs in "genuine" apoptotic cells [53]. We hypothesized that RBF^{D253A}-induced overgrowth could result from a misregulation of apoptosis-induced cell proliferation through Wg signaling. We rejected this hypothesis since the inhibition of *wg* expression with a *wg-RNAi* construct, that in our experiment completely abrogates the detection of wg protein, did not reduce overgrowth. Furthermore, the *wg* expression pattern in *en>RBF*^{D253A} wing discs was different form the pattern observed in *en>RBF, p35* discs that contained undead cells and displayed typical ectopic patches of *wg*-expressing cells. In *en>RBF*^{D253A} and *ptc>RBF*^{D253A} wing discs, more cells seemed to express *wg*, leading to an enlargement or a deformation of the pattern, but we did not observe ectopic patches of *wg* expression. This enlargement could be due to proliferation of *wg*-expressing cells in response to RBF^{D253A} expression, rather than being a cause of this proliferation as it is reported in the presence of undead cells. These results show that RBF^{D253A} is able to induce ectopic proliferation in a JNK-dependent manner that does not require *wg* ectopic expression and that is therefore different from the characterized mechanism induced by the presence of undead cells in a tissue.

Altogether, our data show that RBF^{D253A} expression misregulates tissue homeostasis by inducing hyper-proliferation and overgrowth, in a Wg-independent manner. It has been shown that regulation of tissue homeostasis by compensatory proliferation or proliferation in response to massive damage during development does not require *wg* expression [43,54]. One could hypothesize that RBF^{D253A}-associated overgrowth phenotype could be the reflection of a misregulation of the compensatory proliferation mechanism by strongly enhancing proliferation of neighboring cells. Thus, the identification of RBF^{D253A} partners could provide a new opportunity to discover regulators of compensatory proliferation, which molecular mechanisms have not yet been elucidated. Besides, understanding how RBF^{D253A} can lead to overgrowth could be of great interest to better characterize the tumor suppressor effect of the pocket protein family members.

Supporting Information

File S1 Figure S1 in File S1. RBF contains a consensus site of caspase cleavage. (A) RBF sequence was scanned for potential caspase cleavage site(s) using the CASVM web server (http://www.casbase.org/). This was done with the P14P10′ window (tetrapeptide cleavage sites with ten additional upstream and downstream flanking sequences) which have the highest accuracy. Only one predicted caspase cleavage site was found in RBF: TELD-253. (B) Amino acid sequences alignment of retinoblastoma protein homologs. Amino acid sequences of proteins from *H. sapiens* (top), *C. elegans* (middle), *D. melanogaster* (bottom) were aligned using the Clustal Omega program. Dashes represent gaps in the sequence. Amino acid sequences shown in boxes correspond to consensus caspase cleavage sites. (C) RBF and RBF cleaved forms analysed by Western Blot. Proteins extracts are made from S2 cells transfected with pActine Gal4 vector or pUAS RBF^{p76}-HA (RBF^{p76}-HA), pUAS RBF-HA (RBF-HA) or pUAS RBF^{D253A}-HA (RBF^{D253A}-HA) (Effecten kit, Quiagen). 2.10^6 cells were cryolysed in PBS pH 7.6 and homogenized in buffer containing 50 mM Tris-Cl pH = 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM DTT, AEBSF^{SC}. Proteins were separated in 4–12% Bis-Tris polyacrylamide gels according to the manufacturer's instructions (BioRad) and transferred onto PVDF membrane (Millipore). Blots were incubated with mouse anti-HA (HA.11, Covance) and rabbit polyclonal anti-Actin (1:500, Sigma). Arrow shows wholes RBF forms and dotted-line arrow shows RBF^{p76}. **Figure S2 in File S1. Quantification of RBF and RBF^{D253A} protein rates and *rbf* mRNA.** (A) RBF and RBF^{D253A} protein rates detected by Western blot analysis. Protein extracts were prepared from embryos carrying the *da-Gal4* driver to induce *UAS-RBF* and *UAS-RBF*^{D253A} expressions ubiquitously. Three genotypes were tested: *da-Gal4/+* (control), *da-Gal4/UAS-RBF*, *UAS-RBF*^{D253A}*/+; da-Gal4/+* at 25°C. Actin was used as a loading control, and an RBF antibody was used to detect RBF and RBF^{D253A} (rabbit polyclonal anti-RBF,1:500, Custom antibody, Proteogenix and rabbit polyclonal anti-Actin, 1:500, Sigma). Immunoreactive bands were detected by Immobilon^{TM} Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) with facilities of ChemiDoc MP System (BioRad). (B) Immunoreactive bands were quantified using the Quantity One software. Under these conditions, the level of RBF protein is significantly higher in embryos expressing UAS-RBF and UAS-RBFD253A than in control embryos (asterisk, ANOVA, p = 7.6E-3); furthermore, there is no significant difference between RBF and RBFD253A protein expression levels (ANOVA, p = 0.48). (C) Quantification of *rbf* mRNA by RT-qPCR in wing imaginal discs. Fifty wing imaginal discs per genotype were dissected on ice. Total RNAs were extracted from each sample using the RNeasy Mini kit (QIAGEN), RT was performed on each sample using random primer oligonucleotides (Invitrogen) with Recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Real-time PCR analysis was performed using the C1000 Touch^{TM} Thermal cycler (Biorad). Data are normalized against *rp49* and correspond to the mean of three independent experiments. Error bars are the S.E.M. Asterisks indicate statistical significant difference between two genotypes (Student test, p<0,05). **Figure S3 in File S1. RBF^{D253A} is pro-apoptotic in the ZNC and induces more apoptosis than RBF in third instar larvae wing imaginal discs.** (A, E) *C96-Gal4* and *vg-Gal4* expression patterns are visualized by *UAS-mtGFP* expression in third instar larvae wing imaginal discs. (B–D, F–H) Apoptotic cells are labeled with Acridine Orange in wing imaginal discs (2 min in 100 ng/ml AO, Molecular Probes); specific staining of apoptotic cells corresponds to bright white

patches. (B, F) *C96-Gal4/+* and *vg-Gal4/+* control discs have few apoptotic cells. (C) *C96-Gal4/UAS-RBF* wing discs are similar to control. (D) Some apoptotic cells are observed within the *C96-Gal4* expression domain in *UAS-RBF^{D253A}/X*; *C96-Gal4/+* discs (white arrows). (G, H) Apoptotic cells are observed within the *vg-Gal4* expression domain in *vg-Gal4/+*; *UAS-RBF/+* and *UAS-RBF^{D253A}/X; vg-Gal4/+* wing discs (white arrows). (G) The white arrowhead indicates a zone at the center of the pouch where cells are not AO-labeled in *vg-Gal4/+; UAS-RBF/+* wing discs. All discs are shown with posterior to the top. Discs were mounted in AO and observed with a conventional Leica DMRHC research microscope using the L5 filter to detect AO fluorescence. **Figure S4 in File S1. *RBF^{D253A}* expression at the antero-posterior boundary of wing imaginal discs induces more apoptosis than RBF, but adult phenotypes are similar.** (A–C) Distances between veins 3 and 4 (dv3-v4) were measured at the posterior third of the wings using the Adobe Photoshop CS3 software, as indicated by the black lines. 20 wings were measured to estimate the average distance between veins 3 and 4 (dv3-v4±s.e.m) for each genotype: (A) *ptc-Gal4/+* control wings, (B) *ptc-Gal4/UAS-RBF* flies, (C) *UAS-RBF^{D253A}; ptc-Gal4* flies. *UAS-RBF* as well as *UAS-RBF^{D253A}* expression under the control of *ptc-Gal4* brings veins 3 and 4 closer. (D) *ptc-Gal4* expression pattern is visualized by *UAS-mtGFP* expression in third instar larvae wing imaginal discs. Apoptotic cells are labeled with TUNEL (E–G) or Acridine Orange (H–J) in the wing imaginal discs; specific staining of apoptotic cells corresponds to bright white patches. (E, H) Few apoptotic cells are observed in *ptc-Gal4/+* control discs. (F, G, I, J) In *ptc-Gal4/UAS-RBF* and *UAS-RBF^{D253A}/+*; *ptc-Gal4/+* discs, apoptotic cells are observed within the *ptc-Gal4* expression domain (white arrows). More apoptotic cells are observed in *UAS-RBF^{D253A}/+*; *ptc-Gal4/+* discs. All discs are shown posterior to the top. Discs were observed with a conventional Leica DMRHC research microscope using the L5 filter to detect AO fluorescence and using the N2.1 filter to detect TUNEL. **Figure S5 in File S1. RBF^{D253A} expression at the antero-posterior boundary of wing discs alters the Wg pattern.** (A–C) anti-Wg (green) and anti-RBF (red) staining with enlarged views of boxed areas. (A) Wg pattern in control *ptc-Gal4/+* wing disc. (B) *ptc-Gal4/UAS-RBF* discs have the same Wg pattern than control discs. (C) In *UAS-RBF^{D253A}/X; ptc-Gal4/+* discs, the Wg pattern is altered (white arrowhead) when compared to control discs. More *wg* expressing cells adjacent to the RBF^{D253A} expression domain in the posterior compartment are observed. All discs are shown with posterior to the top. Discs were observed with a conventional Leica DMRHC research microscope using the L5 filter to detect Wg-associated fluorescence and using the N2.1 filter to detect RBF-associated fluorescence. **Figure S6 in File S1. Expression of *RBF^{D253A}* and co-expression of *RBF* and *p35* lead to different Wg patterns.** (A–C) RBF immuno-staining (red). (D–F) anti-Wg immuno-staining (green). (D) Control Wg pattern in *UAS-p35/X; en-Gal4/+* wing disc. (E) In *UAS-p35/X; en-Gal4/+; UAS-RBF/+* wing discs, the Wg pattern is altered when compared to control discs: ectopic patches are observed in the posterior compartment (arrows and box b). (F) In *UAS-RBF^{D253A}/X; en-Gal4/+* wing discs, the Wg pattern is altered when compared to the control, and an enlargement of this pattern is observed in the posterior compartment (box a). All discs are shown with posterior to the top. Discs were observed with a conventional Leica DMRHC research microscope using the L5 filter to detect Wg and the N2.1 filter to detect RBF associated fluorescence.
(ZIP)

Acknowledgments

We are grateful to S. Gaumer and V. Rincheval for their critical reading of the manuscript. We wish to thank M.N. Soler, for expert support with confocal microscopy and N. Boggetto for expert support with flow cytometry. The Imaging and Cell Biology facility of the IFR87 (FR-W2251) "La plante et son environnement" is supported by Action de Soutien à la Technologie et la Recherche en Essonne, Conseil de l'Essonne. The flow cytometry facility of the Jacques Monod Institute is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Ile de France) (#R03/75-79).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM ARA AM BM IG. Performed the experiments: CM ARA AM AG AC. Analyzed the data: CM ARA AM BM IG AC. Wrote the paper: CM ARA BM IG.

References

1. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, et al. (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. Science 235: 1394–1399.
2. Classon M, Harlow E (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nat Rev Cancer 2: 910–917.
3. Morris EJ, Dyson NJ (2001) Retinoblastoma protein partners. Adv Cancer Res 82: 1–54.
4. Du W, Pogoriler J (2006) Retinoblastoma family genes. Oncogene 25: 5190–5200.
5. Cobrinik D (2005) Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene 24: 2796–2809.
6. Bosco G (2010) Cell cycle: Retinoblastoma, a trip organizer. Nature 466: 1051–1052.
7. Burkhart DL, Sage J (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nat Rev Cancer 8: 671–682.
8. Acharya P, Negre N, Johnston J, Wei Y, White KP, et al. (2012) Evidence for autoregulation and cell signaling pathway regulation from genome-wide binding of the Drosophila retinoblastoma protein. G3 2: 1459–1472.
9. Tsai KY, Hu Y, Macleod KF, Crowley D, Yamasaki L, et al. (1998) Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. Mol Cell 2: 293–304.
10. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA (1994) p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. Nature 371: 72–74.
11. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, et al. (1999) RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. Mol Cell 3: 181–193.
12. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, et al. (2009) Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. Cancer Cell 15: 184–194.
13. Lemaire C, Godefroy N, Costina-Parvu I, Rincheval V, Renaud F, et al. (2005) Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. Oncogene 24: 3297–3308.
14. Berge EO, Knappskog S, Geisler S, Staalesen V, Pacal M, et al. (2010) Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. Mol Cancer 9: 173.
15. Sharma A, Comstock CE, Knudsen ES, Cao KH, Hess-Wilson JK, et al. (2007) Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells. Cancer research 67: 6192–6203.
16. Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP (1998) Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. Cancer Res 58: 3275–3281.
17. Knudsen KE, Weber E, Arden KC, Cavenee WK, Feramisco JR, et al. (1999) The retinoblastoma tumor suppressor inhibits cellular proliferation through two distinct mechanisms: inhibition of cell cycle progression and induction of cell death. Oncogene 18: 5239–5245.
18. Ferecatu I, Le Floch N, Bergeaud M, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, et al. (2009) Evidence for a mitochondrial localization of the retinoblastoma protein. BMC cell biology 10: 50.
19. Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, et al. (2013) The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. Genes & development 27: 1003–1015.
20. Janicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG (1996) Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. Embo J 15: 6969–6978.

21. Fattman CL, An B, Dou QP (1997) Characterization of interior cleavage of retinoblastoma protein in apoptosis. J Cell Biochem 67: 399–408.
22. Chen WD, Geradts J, Keane MM, Lipkowitz S, Zajac-Kaye M, et al. (1999) The 100-kDa proteolytic fragment of RB is retained predominantly within the nuclear compartment of apoptotic cells. Mol Cell Biol Res Commun 1: 216–220.
23. Boutillier AL, Trinh E, Loeffler JP (2000) Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. Oncogene 19: 2171–2178.
24. Bertin-Ciftci J, Barre B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, et al. (2013) pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. Cell death and differentiation 20: 755–764.
25. Tan X, Martin SJ, Wang JYJ (1997) Degradation of Retinoblastoma protein in Tumor Necrosis Factor- and CD95-induced Cell Death. J Biol Chem 272: 9613–9616.
26. Fattman CL, An B, Sussman L, Dou QP (1998) p53-independent dephosphorylation and cleavage of retinoblastoma protein during tamoxifen-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. Cancer Lett 130: 103–113.
27. Borges HL, Bird J, Wasson K, Cardiff RD, Varki N, et al. (2005) Tumor promotion by caspase-resistant retinoblastoma protein. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 15587–15592.
28. Le Floch N, Rincheval V, Ferecatu I, Ali-Boina R, Renaud F, et al. (2010) The p76(Rb) and p100(Rb) truncated forms of the Rb protein exert antagonistic roles on cell death regulation in human cell lines. Biochemical and biophysical research communications 399: 173–178.
29. Young AP, Longmore GD (2004) Differential regulation of apoptotic genes by Rb in human versus mouse cells. Oncogene 23: 2587–2599.
30. van den Heuvel S, Dyson NJ (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 713–724.
31. Chen HZ, Tsai SY, Leone G (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. Nat Rev Cancer 9: 785–797.
32. Frolov MV, Dyson NJ (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. J Cell Sci 117: 2173–2181.
33. Dimova DK, Stevaux O, Frolov MV, Dyson NJ (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. Genes Dev 17: 2308–2320.
34. Moon NS, Di Stefano L, Dyson N (2006) A gradient of epidermal growth factor receptor signaling determines the sensitivity of rbf1 mutant cells to E2F-dependent apoptosis. Mol Cell Biol 26: 7601–7615.
35. Moon NS, Di Stefano L, Morris EJ, Patel R, White K, et al. (2008) E2F and p53 induce apoptosis independently during Drosophila development but intersect in the context of DNA damage. PLoS Genet 4: e1000153.
36. Tanaka-Matakatsu M, Xu J, Cheng L, Du W (2009) Regulation of apoptosis of rbf mutant cells during Drosophila development. Dev Biol 326: 347–356.
37. Du W, Dyson N (1999) The role of RBF in the introduction of G1 regulation during Drosophila embryogenesis. Embo J 18: 916–925.
38. Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I (2010) The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. Cell Cycle 9: 97–103.
39. Wee LJ, Tan TW, Ranganathan S (2007) CASVM: web server for SVM-based prediction of caspase substrates cleavage sites. Bioinformatics 23: 3241–3243.
40. Wee LJ, Tan TW, Ranganathan S (2006) SVM-based prediction of caspase substrate cleavage sites. BMC Bioinformatics 7 Suppl 5: S14.
41. Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernooy SY, et al. (2000) The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. J Biol Chem 275: 27084–27093.
42. Snipas SJ, Drag M, Stennicke HR, Salvesen GS (2008) Activation mechanism and substrate specificity of the Drosophila initiator caspase DRONC. Cell death and differentiation 15: 938–945.
43. Perez-Garijo A, Shlevkov E, Morata G (2009) The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc. Development 136: 1169–1177.
44. Worley MI, Setiawan L, Hariharan IK (2012) Regeneration and transdetermination in Drosophila imaginal discs. Annual review of genetics 46: 289–310.
45. Ryoo HD, Bergmann A (2012) The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology 4: a008797.
46. Igaki T (2009) Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling. Apoptosis 14: 1021–1028.
47. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. Dev Cell 7: 491–501.
48. Hassler M, Singh S, Yue WW, Luczynski M, Lakbir R, et al. (2007) Crystal structure of the retinoblastoma protein N domain provides insight into tumor suppression, ligand interaction, and holoprotein architecture. Molecular cell 28: 371–385.
49. Perez-Garijo A, Martin FA, Morata G (2004) Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in Drosophila. Development 131: 5591–5598.
50. Perez-Garijo A, Martin FA, Struhl G, Morata G (2005) Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 17664–17669.
51. Wells BS, Yoshida E, Johnston LA (2006) Compensatory proliferation in Drosophila imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. Curr Biol 16: 1606–1615.
52. Huh JR, Guo M, Hay BA (2004) Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. Curr Biol 14: 1262–1266.
53. Mollereau B, Perez-Garijo A, Bergmann A, Miura M, Gerlitz O, et al. (2013) Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. Cell death and differentiation 20: 181.
54. Herrera SC, Martin R, Morata G (2013) Tissue homeostasis in the wing disc of Drosophila melanogaster: immediate response to massive damage during development. PLoS genetics 9: e1003446.

Figure S1

A

CASVM: Server for SVM Prediction of Caspase Substrates Cleavage Sites

Server Results

Your input sequence has been scanned for caspase cleavage sites. Results are reported below:

Sequence Name	RBF
Sequence	MSEPD...GEHET
Length of Sequence	845 residues
Potential Sites	SEPD-5 ATSD-22 TSDD-23 LCRD-38 LNMD-42 QWCD-123 EIED-137 EDLD-139 IIMD-157 IKLD-190 KLDD-191 NTVD-210 CCID-223 KRTD-236 TELD-253 NFCD-267 GNKD-298 GEFD-331 SAYD-339 ALND-348 RKQD-363 MAGD-373 EPTD-399 YLLD-448 NKPD-460 PDID-462 WVLD-503 VNLD-576 LMKD-631 RHLD-635 RMED-653 KFSD-658 VFID-680 INED-684 KVKD-691 FVID-710 VTPD-717 RASD-724 PAKD-775 SFGD-794 AVMD-817 VMDD-818
Predicted Sites (P4-P1)	Not selected
Predicted Sites (P4-P2')	Not selected
Predicted Sites (P14-P10')	TELD-253

B

```
RYQEYIRRIQEGLAVSCVIFKKFCRIFCKIFEEIKVGS-------------ENCPSSHEL  280
KVDNAMSRLLKKYDVLFALFSKLERTCELIYLTQPSSS------------ISTEINSALV  190
EFVNEIEDLDRKFSITFMLHKRFRIIMDMIFSCPPNEKKHSKYISLHGNHAHGKCSYIKL  189

FTVLWTSFLVMKSRM--TVDDLISNYQLLFSILDQVYTEMCSMK--EGIVHHLN------  330
LKVSWITFLLAKGEVLQMEDDLVISFQLMLCVLDYFIKLSPPMLLKEPYKTAVI-PINGS  249
DDICWRLFLCAKNQKPSNTVDLVTSYNLMICCIDLIYNNVLA----EKRTDLINPKFEGL  245

----------QKFVEDLLENDCTIIRALCTQFGGSVLD-ARHF---SDHTFKKM------  370
PRTPRRGQNRSARIAKQLENDTRIIEVLCKEHECN-------IDEVKNVYFKNFIPFM--  300
PSNWTEL--------DFRHNPHCILSNFCDMTEEAKAMKATTFRQIMSSFFQASTIYGNK  297

-EKTGIPSTWNFQEFRDLIMNVPKTAYENYLLQRGSIDERIFIPSVEDFSKIFQSPDTYS  429
-NSLGLVTSNGL-----PEVENLSKRYEEIYLKNKDLDARLFLDHDKTLQTDS--IDSFE  352
DTMLGLLANENF---E-RNLKSLNISYEQYVLSVGEFDERILSAYDAGEHTAL-------  346
```

C

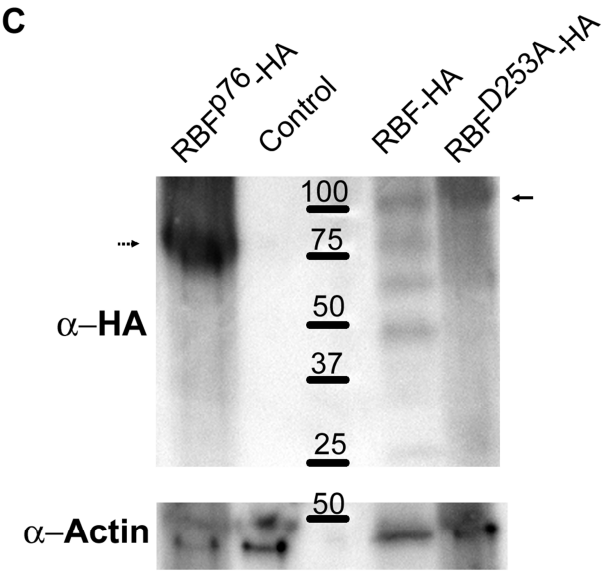


Figure S2

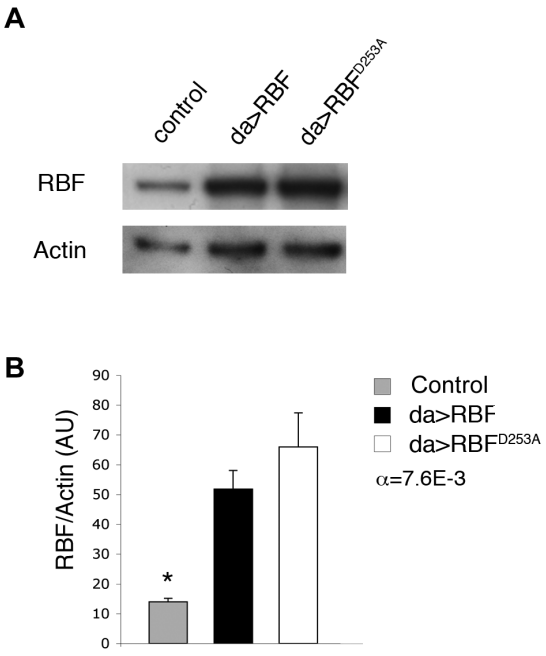

A
control
da>RBF
da>RBF^D253A
RBF
Actin
B
RBF/Actin (AU)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Control
da>RBF
da>RBF^D253A
α=7.6E-3
C
rbf /rp49
Relative mRNA level
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
*
Control
vg>RBF
vg>RBF^D253A

Figure S3

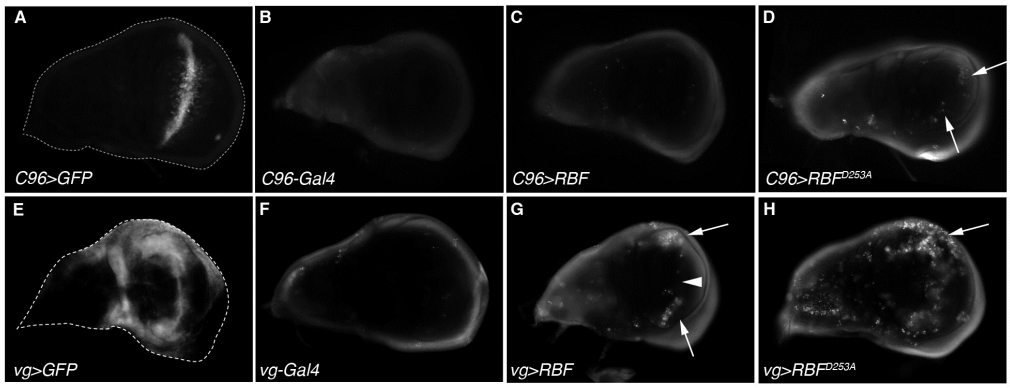

A
C96>GFP
B
C96-Gal4
C
C96>RBF
D
C96>RBF^{D253A}
E
vg>GFP
F
vg-Gal4
G
vg>RBF
H
vg>RBF^{D253A}

Figure S4

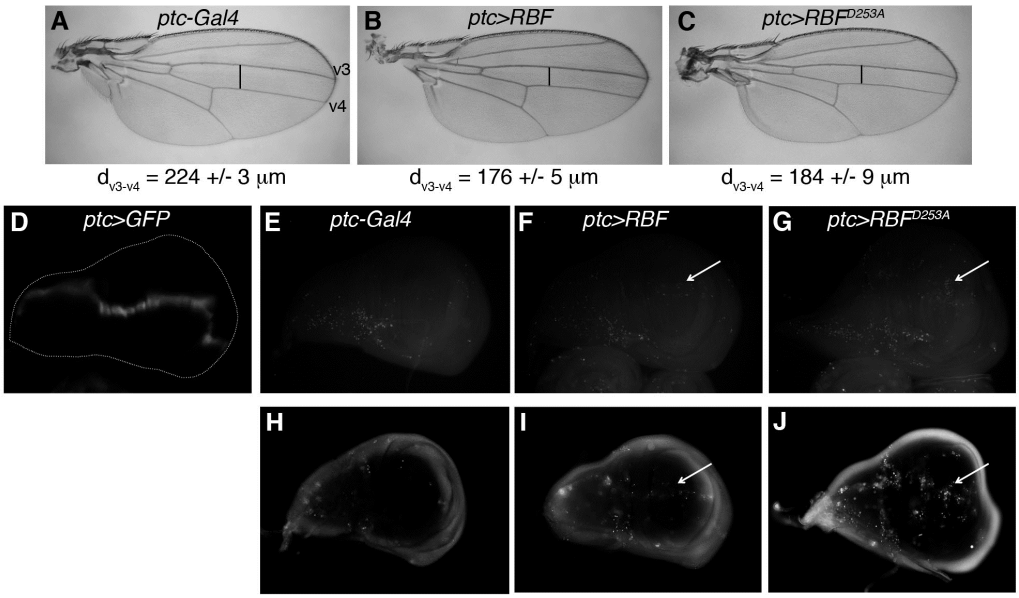

A
ptc-Gal4
v3
v4
B
ptc>RBF
C
ptc>RBF^D253A
d v3-v4 = 224 +/- 3 µm
d v3-v4 = 176 +/- 5 µm
d v3-v4 = 184 +/- 9 µm
D
ptc>GFP
E
ptc-Gal4
F
ptc>RBF
G
ptc>RBF^D253A
H
I
J

Figure S5

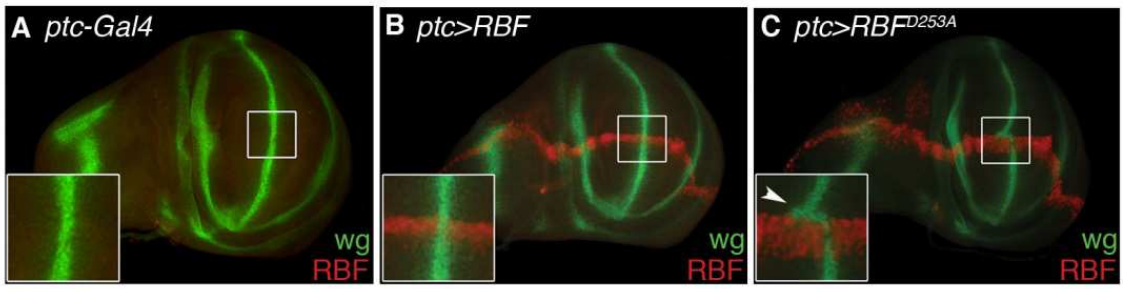
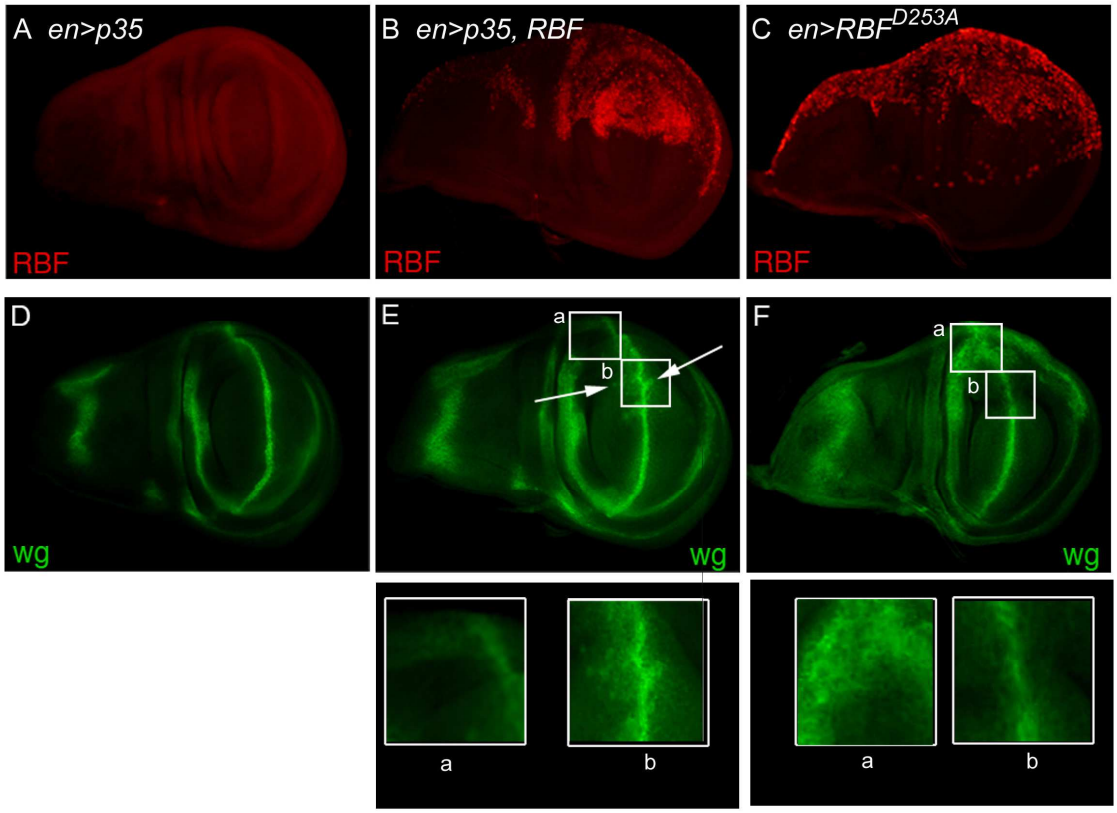


Figure S6


A en>p35
RBF
B en>p35, RBF
RBF
C en>RBF^{D253A}
RBF
D
wg
E
a
b
wg
F
a
b
wg
a
b
a
b

III. <u>Annexe 3</u> : Debcl est adressé au protéasome par Slimb, l'homologue de la β-TrCP

Apoptosis (2014) 19:1444–1456
DOI 10.1007/s10495-014-1034-8

ORIGINAL PAPER

The *drosophila* Bcl-2 family protein Debcl is targeted to the proteasome by the β-TrCP homologue slimb

Jessie Colin · Julie Garibal · Amandine Clavier · Aurore Rincheval-Arnold · Sébastien Gaumer · Bernard Mignotte · Isabelle Guénal

Published online: 11 September 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The ubiquitin–proteasome system is one of the main proteolytic pathways. It inhibits apoptosis by degrading pro-apoptotic regulators, such as caspases or the tumor suppressor p53. However, it also stimulates cell death by degrading pro-survival regulators, including IAPs. In *Drosophila*, the control of apoptosis by Bcl-2 family members is poorly documented. Using a genetic modifier screen designed to identify regulators of mammalian *bax*-induced apoptosis in *Drosophila,* we identified the ubiquitin activating enzyme Uba1 as a suppressor of *bax*-induced cell death. We then demonstrated that Uba1 also regulates apoptosis induced by Debcl, the only counterpart of Bax in *Drosophila.* Furthermore, we show that these apoptotic processes involve the same multimeric E3 ligase—an SCF complex consisting of three common subunits and a substrate-recognition variable subunit identified in these processes as the Slimb F-box protein. Thus, *Drosophila* Slimb, the homologue of β-TrCP targets Bax and Debcl to the proteasome. These new results shed light on a new aspect of the regulation of apoptosis in fruitfly that identifies the first regulation of a *Drosophila* member of the Bcl-2 family.

Keywords Bcl-2 family proteins · Bax · Debcl · Proteasome · Slmb · SCF complex

Introduction

The ubiquitin–proteasome system (UPS) is one of the main proteolytic pathways in the cell. Ubiquitination requires three specialized enzyme families. The first step of ubiquitination involves a ubiquitin activating enzyme called E1, which covalently binds a ubiquitin monomer. This activated ubiquitin is transferred to a ubiquitin conjugating enzyme, E2. A ubiquitin ligase (E3) then catalyzes the transfer of ubiquitin to a specific target. A broad diversity of E3 ligases exists, to cope with the very large number of substrates of the UPS. E3-dependent polyubiquitination of the substrate can lead to its recognition by the proteasome—a macromolecular complex responsible for the degradation of ubiquitin-tagged proteins into short peptides. The UPS controls many processes such as the cell cycle or apoptosis by targeting some of their main regulators.

In mammals, members of the Bcl-2 family are key elements of the apoptotic machinery (review: [1]). This multigenic family has about 20 members, which may either promote or inhibit apoptosis. Members of the Bcl-2 family control cell death either by inhibiting or promoting mitochondrial outer membrane permeabilization. This permeabilization is a key step in the execution of the mitochondrial apoptotic pathway in mammals, as it allows the release of apoptogenic factors, such as cytochrome c, from the mitochondrion into the cytosol. This cytochrome c release is essential for Apaf-1-mediated caspase-9 activation and cell breakdown.

One of the best described examples of the UPS regulation of Bcl-2 family members-induced cell death in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10495-014-1034-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Colin · J. Garibal · A. Clavier · A. Rincheval-Arnold · S. Gaumer · B. Mignotte · I. Guénal (✉)
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Bâtiment Simone Veil, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France
e-mail: isabelle.guenal@uvsq.fr

Annexe

mammals is provided by the degradation of the anti-apoptotic protein Mcl-1. Three E3 ligases have been shown to target Mcl-1 for degradation via two independent pathways. The first of these enzymes, Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) is a HECT domain-containing E3 ligase [2]. It contains a BH3 domain, also found in members of the Bcl-2 family, which mediates the physical interaction between Mule and Mcl-1. Mcl-1 can also be downregulated by phosphorylation on two serine residues by GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β). This hyperphosphorylation of Mcl-1 leads to its recognition by the F-box protein β-TrCP [3]. β-TrCP acts within a multimeric RING domain-containing E3 ligase, called SCF complex. The F-box protein is a variable subunit of this complex responsible for substrate recognition, leading to ubiquitination by the SCF complex and subsequent degradation by the proteasome. More recenltly, it has been shown that Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons [4]. Other members of the mammalian Bcl-2 family are regulated in a proteasome-dependent manner. Such regulation has been demonstrated for anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2 [5], and pro-apoptotic proteins, such as Bid [6] and Bim [7]. However, the precise mechanisms underlying this regulation, including the post-translational modifications targeting them for UPS-mediated degradation, and the identity of the E3 ubiquitin ligases involved remain unclear.

Bax, a multidomain pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, is a target of the UPS [8, 9]. Some evidence suggest that the signal for Bax degradation could be the Akt-mediated phosphorylation of serine 184 [10–13] and that the DNA repair protein Ku70 could be involved in Bax deubiquitination [14]. However, the ubiquitin ligase responsible for Bax targeting to the proteasome as well as the regulation of this degradation pathway remain to be characterized.

Only two members of the Bcl-2 family have been identified in *Drosophila* so far, Buffy and Debcl. Both display a mitochondrial subcellular localization and are apoptotic regulators, suggesting that mitochondria play an important role in apoptosis in *Drosophila*. Buffy was originally described as an anti-apoptotic Bcl-2 family member [15, 16], but in some cases it can promote cell death [17–20]. Debcl (death executioner Bcl-2 homolog), is a multidomain death inducer [20–24] that can be inhibited by direct physical interaction with Buffy [15]. When overexpressed in mammalian cells, Debcl induces both cytochrome c release from mitochondria and apoptosis. This protein interacts physically with anti-apoptotic members of the Bcl 2 family, such as Bcl 2 itself, in mammals. Debcl is involved in the control of some developmental cell death processes as well as in the irradiation response [16, 19, 25].

Most apoptotic processes in *Drosophila* involve the initiator caspase Dronc and its adaptor Dark [26]. Dronc activation is tightly controlled by Diap1. Indeed, loss-of-function mutations in *diap1* are often sufficient to induce apoptosis [27–29]. Diap1 has been widely studied and acts as an E3 ubiquitin ligase, targeting caspases, including Dronc, for proteasomal degradation. Diap1 is itself targeted for proteasomal degradation in response to pro-apoptotic RHG (Rpr, Hid, Grim) protein signaling. Therefore, the UPS plays a key role in regulating apoptosis in *Drosophila* by acting on caspases, IAPs or RHG proteins. However, no data are available concerning the degradation of *Drosophila* Bcl-2 family members by the proteasome and the mechanisms of action and regulation of Debcl and Buffy remain poorly documented as compared to our knowledge of their mammalian counterparts [30].

Therefore, we investigated the roles of Bcl-2 family members in *Drosophila*, using transgenic flies expressing the murine *bax* gene under control of the inducible UAS/Gal4 system [31]. We have previously shown that mammalian Bax is functional in *Drosophila* where it interacts with the cell death machinery to induce an apoptosis involving mitochondrial events [32, 33]. We have also shown that *bax*-induced apoptosis can be antagonized in *Drosophila* by overexpressing mammalian *bcl-2* [31, 32]. Studies of *debcl* demonstrated that both *debcl*- and *bax*-induced cell death share common features. Indeed, the mitochondrion stands as a key component of *debcl*- and *bax*-induced apoptosis and both trigger two different cell death pathways. The first one is effector caspase-dependent while the second appears to resist p35 inhibition, suggesting the existence of an effector caspase-independent pathway. *Bax*- and *debcl*-induced apoptosis in the wing disc result in a wing phenotype and partially penetrant fly lethality. To identify suppressors of *bax*- and *debcl*-induced cell death, we screened a library of gain-of-function mutants [34] for modifiers of these phenotypes (Colin et al, in preparation). One of the suppressors identified this way consists in a mutation of the gene encoding the unique ubiquitin activating enzyme, *Uba1*. Studies of this mutant provided insight into the proteasome-dependent regulation of Bcl-2 family members in *Drosophila*. We show here that Bax and its counterpart Debcl are degraded by the proteasome in *Drosophila*. We identified the E3 ubiquitin ligase Slimb (Slmb), the *Drosophila* homologue of β-TrCP, as the regulator of Debcl levels.

Materials and methods

Fly stocks

Flies were raised on standard medium at 25 °C, except those used for phenotypic suppression tests involving

vg > bax flies, which were performed at 18 °C. *UAS-bax* flies were generated in our laboratory. The *yw*^{c}, *w*^{1118}, *vg-gal4*, *hs-gal4* and *da-gal4* strains are described in [31, 32]. *ptc-gal4* flies were provided by L. Théodore. *UAS–debcl–HA* flies were generously provided by H. Richardson [21]. The *slmb* mutants *slmb*^{8} and *slmb*^{41} were generously provided by B. Limbourg-Bouchon [35]. The *UAS–slmb*^{DN}*–flag–myc* flies were generously provided by T. Murphy. In this strain, the UAS-slmb^{DN} transgene expresses dominant-negative Slmb protein containing five point mutations in the F-box domain that completely abolish interaction with SkpA, and includes a 3xFLAG-6xmyc N-terminal epitope made with the pTFMW vector (*Drosophila* Genomics Resource Center; T.D. Murphy, personal communication). *Uba1*^{UY3010} was generated by mobilizing *P[Mae–UAS.6.11]* (*P*[UY]). *Uba1*^{EP2375}, *morgue*^{EP1184} and *pros25*^{EP931} were obtained from Szeged Stock Center. *Uba1*^{s3484} and *skpA*^{EP1423} were obtained from Bloomington Stock Center. The *Δp54* mutant described by T. Szlanka [36] was generously provided by A. Udvardy. *UAS-PABP-flag* flies (#9420) were obtained from Boomington.

Wilcoxon test

vg > bax, *vg > rpr* and *ptc > (debcl)*$_2$ virgins were crossed, in parallel, with the tested mutant and a control strain. We have previously verified that the presence of a *UAS-GFP* transgene does not affect *bax*- or *debcl*-induced phenotypes (data not shown). Therefore, there is no detectable GAL4 titration in our system. Thus, according to the genetic background of the tested mutant strains, control experiments were performed by crossing *vg > bax* or *ptc > Debcl* females with w^{1118} males, except for the UY^{3010} mutant strain for which ywc males were used. The progenies of each of these crosses were classified, according to the strength of the wing phenotype, into four phenotypic categories (from wild-type to strong phenotype) by the same blind observer to avoid changes in categorization. A Wilcoxon test was then used to compare the distributions of phenotypes between the two lineages (T: test vs. C: control). Differences in distribution were considered significant if $\alpha < 10^{-3}$. A positive Ws value indicates enhancement of the phenotype and a negative Ws value indicates suppression of the phenotype.

Identification of the *P*[UY] insertion in the *UY3010* mutant

For identification of the gene affected in the *UY3010* mutant, we used inverse PCR and sequencing of the DNA flanking the *P*[UY] element. Inverse-PCR was carried out as in the BDGP protocol (http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html). We used genomic DNA from young UY3010 males and MspI for DNA digestions. The following primers were used: 5′-GCTTTCGCTTAGC-GACGTGT-3′, 5′–CAGATCGTAAGGGTTAATGTT-3′, 5′-GAATTGAATTGTCGCTCCGT-3′, and 5′-CTCTCAA CAAGCAAACGTGC-3′.

Immunostaining

Wing discs were dissected from *vg > bax* or *vg > bax/ Uba1*^{EP2375} third-instar larvae in PBS, pH 7.6 and fixed in 3.7 % formaldehyde. Discs were labeled by incubation for 2 h with anti-Bax Δ21 antibody (1/200) in 0.3 % Triton X–100/10 % NGS in PBS (PBT/NGS). After washing in 0.3 % Triton X–100 in PBS, TRITC-conjugate was incubated for 1 h in PBT/NGS. Images were captured with a conventional Leica DMRHC research microscope, using an N2.1 filter to detect TRITC fluorescence. The same exposure time was used for all images.

Immunoprecipitation

Two hundred embryos were collected, dechorionated in 100 % sodium hypochlorite and rinsed in PBS. Embryos were then collected by centrifugation and washed once in PBS. Pellets were resuspended in 270 µl of ice-cold CHAPS buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % CHAPS, 1 mM DTT, Pefabloc) and homogenized on ice with a Wheaton glass homogenizer (until the suspension became milky). For control immunoprecipitation, 75 µl of lysate was incubated 4 h at 4 °C with 3 µg of IgG1 before the addition of 15 µl of protein G-agarose beads overnight at 4 °C. For anti-Slmb immunoprecipitation, 75 µl of lysate was incubated overnight at 4 °C with 5 µl of anti-FLAG M2 agarose beads (Sigma Aldrich). Immune complexes were then washed four times with ice-cold CHAPS buffer and resuspended in loading buffer. Samples were boiled for 5 min. and proteins were subjected to western blotting as described below.

Western blot

Western blotting was carried out with the INVITROGEN NuPAGE™ system according to the manufacturer's instructions, with 4–12 % Bis–Tris Gels and MES running buffer (50 mM MES, 50 mM Tris base, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3). Proteins were electrotransferred onto PVDF membrane (Immobilon™-P, MILLIPORE) in transfer buffer (25 mM Bicine, 25 mM Bis–Tris, 1 mM EDTA, pH 7.2). Transfer efficiency was evaluated with Ponceau-S (0.3 % Ponceau-S, 1 % acetic acid). Membranes were saturated by incubation for one hour with skim milk before antibody staining.

Annexe

Antibodies

Immunostaining was performed with anti-Bax Δ21 (Santa Cruz, 1/200) and TRITC-conjugate anti-rabbit (Jackson, 1/200) antibodies. Western blots were probed with anti-Bax 5B7 or N20 (Santa Cruz, 1/500 or 1/200 respectively), anti-HA (Babco, 1/1000), and anti-tubulin E7 (DSHB, 1/1000) antibodies. HRP-conjugate anti-mouse or anti-rabbit antibodies were obtained from Jackson Laboratories and used at a dilution of 1/10000. Immunodetection was performed by a chemoluminescence-based method (ECL, Amersham).

In situ proximity ligation assay (PLA)

Ptc > Debcl-HA,Slmb^{DN}-flag-myc and *Ptc > Debcl-HA,P-abp-flag* third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/formaldehyde 3.7 %, washed three times for 5 min in PBT (PBS, 0.3 % Triton). Wing imaginal discs were then dissected and incubated in PBT/FCS (PBS, 0,3 % Triton, 10 % FCS) at room temperature during 20 min. *In situ* PLA was performed using the Duolink® kit (Olink Bioscience) essentially according to manufacturer's instructions. Briefly, wing imaginal discs were stained with primary antibodies overnight at 4 °C. The antibodies used for Duolink assays and their corresponding dilutions are: anti-HA antibody (ab9110, abcam®, 1/200) and anti-flag.M2 antibody (Agilent, 1/200). After washing, wing imaginal discs were incubated with the secondary oligonucleotide-linked antibodies (PLA probes: anti-Mouse PLUS and anti-Rabbit MINUS) provided in the kit. The oligonucleotides bound to the antibodies were hybridized, ligated, amplified, and detected using a fluorescent probe (Detection Kit 563). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley) and observed with a Leica SP2 upright confocal microscope.

Results

Isolation of the *UY3010* mutant

The expression of mammalian *bax* during development using the *vg-gal4* driver—which targets expression to the wing margin tissue—led to an apoptosis-induced variable notch phenotype in the adult wing (Fig. 1a–d; [31, 32]). Moreover, this excess of apoptosis led to an increase in fly lethality. We used these phenotypes to screen the mutants of the *P*[UY] collection [34], which present a random insertion of a UAS-containing *P*-element. Out of the 1475 tested mutants, only 17 modifier genes suppressing *bax*-induced apoptosis were identified, showing how stringent our screen was. One of the suppressors we identified was the *UY3010* mutation. This mutation attenuated both the wing phenotype and lethality due to *bax* expression and did not display any phenotype in absence of *bax* when driven by *vg-gal4* or *ptc-gal4* (data not shown). We carried out a phenotypic suppression test, validated by the statistical Wilcoxon test (see "Materials & Methods" section) to confirm the suppressor effect of this mutation. The result of this phenotypic suppression test is presented Fig. 1e. In the control cross offspring (*Uba1^{UY3010}*C), expressing only *bax*, only 3.4 % of the progeny displayed a weak phenotype. The percentage of weak phenotypes increased to 41 % of the progeny in the test cross (*Uba1^{UY3010}*T), in which flies expressed *bax* in presence of the *UY3010* mutation. The Wilcoxon test gave a probability of 5×10^{-15} for this shift, which is highly significant ($\leq 10^{-3}$). We conclude that the *vg–gal4*-mediated induction of the *UY3010* mutation significantly suppresses the *bax*-induced phenotype.

Characterization of the *Uba1^{UY3010}* allele

We carried out inverse PCR on genomic DNA from *UY3010* flies to identify the genes flanking the *UY3010* insertion. We sequenced the PCR products and localized the *P*[UY] insertion to the 5′UTR region of the E1 ubiquitin activating enzyme gene, *Uba1*. The *P*[UY] was found to be inserted 258 bp upstream from the translation initiation codon and 554 bp downstream from the transcription start site in an orientation compatible with *Uba1* overexpression in the *UY3010* mutant in the presence of *gal4* (supplementary Fig. 1).

We checked whether *gal4* induction led to *Uba1* overexpression in the *UY3010* mutant, using the *hs–gal4* driver to trigger the *UAS*-dependent transcription of *Uba1* (supplementary Fig. 2). As expected, *Uba1* transcript levels present a 40 fold increase in heat shocked *hs > Uba1^{UY3010}* flies compared with *Uba1^{UY3010}* or wild type flies, showing that the *UY3010* mutation leads to UAS/Gal4-dependent *Uba1* overexpression.

We investigated whether this overexpression led to synthesis of a functional form of the Uba1 protein. Thus, we tested its ability to complement the null allele *Uba1^{s3484}*. The progeny of a genetic cross between flies carrying the *UY3010* mutation and *Uba1^{s3484}* flies, did not count any *Uba1^{s3484}/Uba1^{UY3010}* flies (Table 1), showing that in the absence of Gal4 the UY3010 allele is a loss of function. In contrast, ubiquitous induction of *Uba1* using the *da-gal4* driver rescued heterozygous *Uba1^{s3484}/Uba1^{UY3010}* flies. Besides, we observed that decreasing Uba1 levels thanks to a background heterozygous for the *Uba1^{s3484}* null allele failed to modify *bax*-induced phenotypes (data not shown). Altogether, these data demonstrate that *UY3010*-mediated suppression of *bax*-induced

Annexe

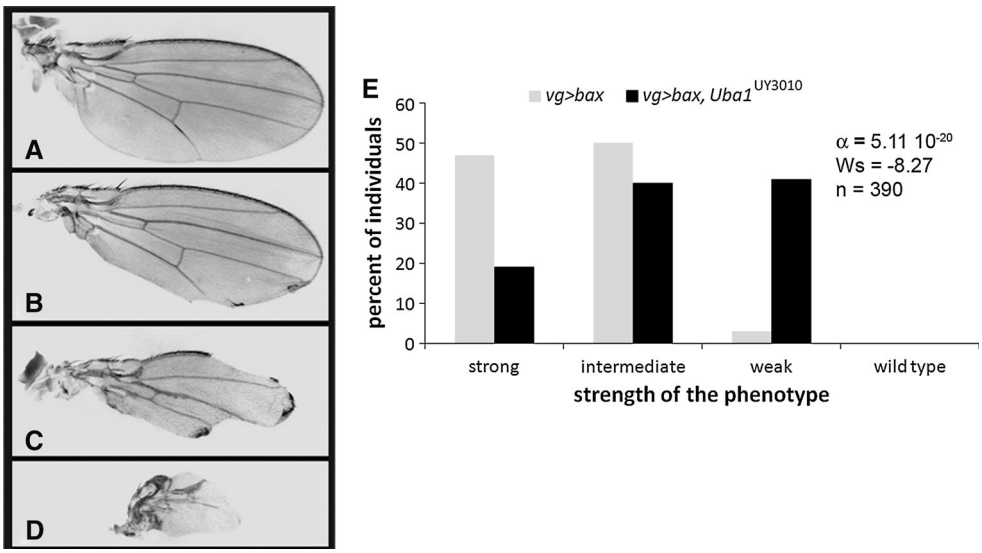


Fig. 1 *vg–gal4*-mediated induction of the *UY3010* mutation significantly suppresses the *bax*-induced phenotype **a** w^{1118} wild-type adult wing. **b–d** wings of *vg > bax* flies. *bax* expression leads to phenotypes that fall into three categories: weak (**b**), intermediate (**c**) and strong (**d**). Most specimens show strong or intermediate phenotypes (adapted from [32]). **e** Distribution of the offspring between the strong, intermediate and weak phenotype categories in *vg > bax* and *vg > bax/* $Uba1^{UY3010}$ flies

phenotypes is due to overexpression of a functional form of Uba1.

Uba1 overexpression abolishes *bax*-induced apoptosis

The *UY3010* mutant was isolated based on its ability to suppress *bax*-induced phenotypes. We tried to reproduce this suppression by overexpressing *Uba1* with another allele reported to overexpress *Uba1* in a *gal4*-dependent manner, the $Uba1^{EP2375}$ allele [37]. This allele presents a *UAS*-containing *P*-element different from *P*[UY] but inserted in the same region. We verified that driving expression of $Uba1^{EP2375}$ using *vg–gal4* or *ptc–gal4* did not lead to any wing phenotype. The $Uba1^{EP2375}$ allele allowed a much stronger suppression of the *bax*-induced phenotype than $Uba1^{UY3010}$. The $Uba1^{UY3010}$ allele gave weak phenotypes in about 40 % of cases, but never gave rise to wild-type wings or wings with only a very small notch. By contrast, as shown in Fig. 2a, b, c, $Uba1^{EP2375}$ gave mostly very weak phenotypes (wings with only a very small notch in the posterior region of the wing margin) and wild-type wings. Thus, *Uba1* overexpression from the $Uba1^{EP2375}$ allele abolished the notched wing phenotype almost totally. This stronger suppression indicates that this allele may produce more Uba1 protein than $Uba1^{UY3010}$.

As previously described, *bax* expression induced apoptosis and an alteration of wing disc morphology (Fig. 2d, e; [32]). To test whether Uba1 suppression of Bax-induced wing phenotypes is associated to a decrease of cell death, we stained apoptotic cells with acridine orange (AO) in third instar larvae imaginal discs. The number of apoptotic cells was strongly reduced when *Uba1* was co-expressed with *bax* (Fig. 2f, g).

We chose to express *bax* in the wing disc from the *vg-gal4* driver, because Bax is such a potent death inducer that most *gal4* drivers induce massive apoptosis leading to the embryonic death as observed with the ubiquitous *da-gal4* driver [31, 32]. As *Uba1* overexpression efficiently suppresses *bax*-induced phenotypes, we tried to prevent *bax*-induced lethality by overexpressing the $Uba1^{EP2375}$ allele with the *da-gal4* driver. This resulted in the survival of part of the offspring despite the ubiquitous overexpression of *bax* (data not shown). Thus, *Uba1* overexpression inhibits the massive wave of apoptosis induced by *bax,* allowing embryos to develop to adulthood.

Uba1 overexpression suppresses *debcl*-induced cell death

Little is known about Debcl regulation in fruit flies and we decided to investigate whether *debcl*-induced cell death was also sensitive to *Uba1* overexpression. We carried out a phenotypic suppression test with *debcl*-expressing flies. Ectopic *debcl* expression in the wing disc with the *ptc-gal4* driver induced apoptosis along the antero-posterior frontier (supplementary Fig. 3). In adult wings, this apoptosis led to the L3 and L4 veins being brought closer together in the proximal region of the wing and the fusion of these veins at the anterior crossvein (Fig. 3b, b′). $Uba1^{EP2375}$ allele overexpression almost completely abolished this phenotype (Fig. 3c, c′) and increased the percentage of wild-type phenotypes from 0 to 80 % (Fig. 3h).

$Uba1^{UY3010}$ expression did not significantly suppress *debcl*-induced phenotypes ($\alpha = 1.8 \times 10^{-3}$). However, $Uba1^{EP2375}$ gave efficient phenotypic suppression of *debcl.* The difference in the results obtained with these two alleles could lie in the Uba1 protein overproduction capacity of the two constructs. However, RT-qPCR did not reveal any significant difference between the *Uba1* mRNA levels

Annexe

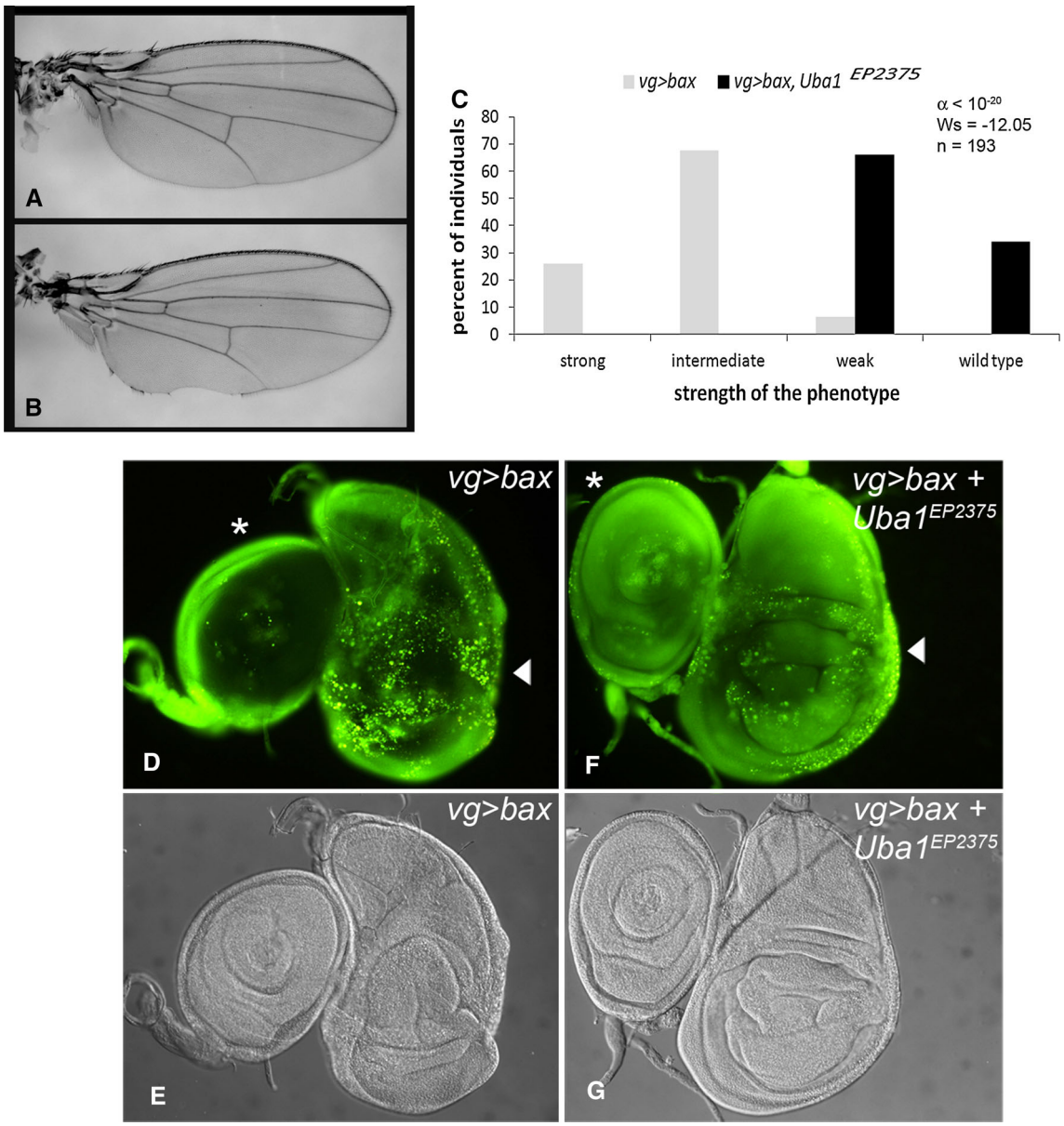


Fig. 2 *Uba1*^{EP2375} overexpression efficiently suppresses *bax*-induced apoptosis **a**, **b** *vg* > *bax*/*Uba1*^{EP2375} flies. *Uba1* overexpression leads to the appearance of wild-type (**a**) or very weak phenotypes, with only a small notch (**b**). **c** Distribution of the offspring between the strong, intermediate and weak phenotype categories in *vg* > *bax* and *vg* > *bax*/*Uba1*^{EP2375} flies. (**d**, **f**) Acridine orange stainings on third-instar larval leg (*asterisks*) and wing (*arrowheads*) discs expressing *bax* in imaginal wing discs under control of the *vg-gal4* driver (*vg* > *bax*) or coexpressing *bax* and *Uba1* (*vg* > *bax* + *Uba1*^{EP2375}). **e**, **g** Nomarsky views of the upper panels discs

Table 1 Gal4 allowed overproduction of functional Uba1 in *UY3010* mutant

	Uba1^{S3484}	*Uba1*^{UY3010}	*da* > *Uba1*^{UY3010}
Uba1^{S3484}	Lethal	Lethal	Viable
Uba1^{UY3010}	Lethal	Lethal	Viable

observed in *Uba1*^{UY3010} and *Uba1*^{EP2375} strains (data not shown), possibly as the consequence of a limited number of cells expressing Gal4 in the imaginal disc when using a *ptc* driver. Nevertheless, these results show that *Uba1* overexpression inhibits the apoptotic processes induced both by Bax or Debcl.

Proteasome activity modulates *bax*- and *debcl*-induced apoptosis

We have shown that *Uba1* overexpression inhibits the apoptosis induced by *bax* or *debcl*. Therefore, we investigated the possible role of the proteasome in the regulation

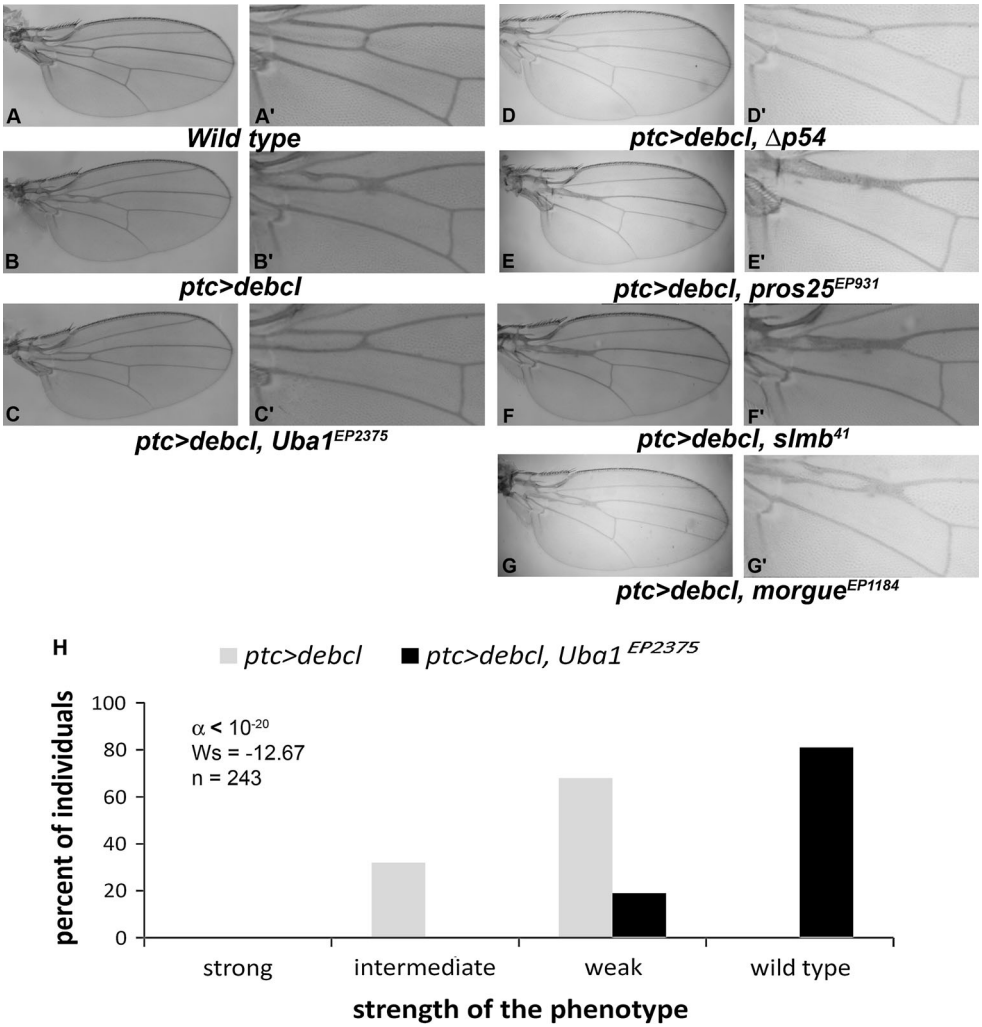


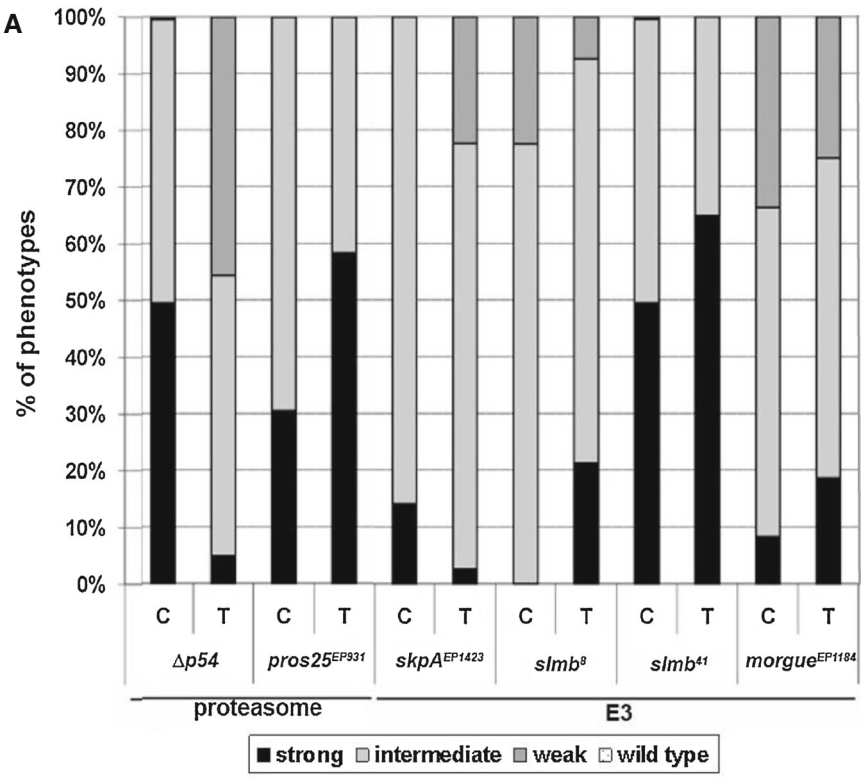
Fig. 3 Wings from *debcl*-expressing flies (**a**–**g**) Adult wings and (**a**′–**g**′) magnification of (**a**–**g**). **a**, **a**′ wild-type fly. **b**, **b**′ control fly of *ptc-gal4*, *UAS-debcl/+*; UAS-*debcl/+*genotype. **c**, **c**′) *ptc-gal4*, *UAS–debcl / Uba1*^{EP2375}; UAS-*debcl/+*. **d**, **d**′) *ptc-gal4*,*UAS-debcl/+*; *UAS-debcl/Δp54*. **e**, **e**′ *ptc-gal4*, *UAS-debcl/+*; *UAS-debcl/pros25*^{EP931}. **f**, **f**′ *ptc-gal4*, *UAS-debcl/+*; *UAS-debcl/slmb*^{41}. **g**, **g**′ *ptc-gal4*, *UAS-debcl/morgue*^{EP1184}; *UAS-debcl/+*. **h** Distribution of the offspring between the strong, intermediate weak and wild type phenotype categories in *ptc > debcl* and *ptc > debcl/Uba1*^{EP2375} flies

of *bax*- and *debcl*-induced cell death, by modifying proteasome activity and assessing the effects of these modifications on apoptotic processes. We carried out phenotypic suppression tests, using mutants with defective proteasomal subunits. We chose to use the Δ*p54* mutant, as this mutant has been well characterized [36] and displays no wing phenotype. It carries a deletion of the *p54/S5a/Rpn10* gene, which encodes a subunit of the 19S regulatory particle of the proteasome. This subunit links the base and lid subcomplexes of the 19S regulatory particle. It also acts as a "receptor" for the 26S proteasome by interacting with polyubiquitin chains. Szlanka et al. have shown that deletion of *p54* in *Drosophila* activates a regulatory feedback loop, leading to 26S proteasome overexpression [36]. We used this mutant to increase proteasomal activity with this mutant. We also used the *pros25*^{EP931} loss of function allele that carries a mutation affecting negatively the α2 subunit of the 20S core particle of the proteasome and does not lead by itself to any phenotype when driven by *vg–gal4* or *ptc–gal4*. We assessed the effects of these mutations on proteasome activity, by western blot analysis of the degradation of Armadillo, a known target of the proteasome (Supplementary Fig. 4). As expected, the Δ*p54* mutant stimulated the proteasomal activity whereas the *pros25*^{EP931} allele inhibited proteasomal activity [38].

The Δ*p54* mutation shifted the distribution of *bax*-induced phenotypes toward weaker phenotypes (Fig. 4, compare Δ*p54*C and Δ*p54*T). Indeed, the progeny of the control cross included 49.5 % strong phenotypes and only 0.5 % weak phenotypes, whereas crosses with the Δ*p54* mutant gave 4.9 % strong phenotypes and 45.7 % weak phenotypes. By contrast, *pros25*^{EP931} shifts the phenotypic distribution toward stronger phenotypes, doubling the percentage of strong phenotypes with respect to the control cross (Fig. 4 compare *pros25*^{EP931} C and T). We can therefore conclude that enhancing the proteasomal activity suppresses *bax*-induced apoptosis, whereas turning it down increases the rate of *bax*-induced apoptosis.

We then performed the same experiments with *debcl*-expressing flies. As for *bax*-induced cell death, the Δ*p54*

Annexe



B

	Δ*p54*	*pros25*^{EP931}	*skpA*^{EP1423}	*slmb*^{8}	*slmb*^{41}	*morgue*^{EP1184}
α	0	3.21×10^{-5}	1.68×10^{-7}	2.08×10^{-7}	1.24×10^{-3}	7.22×10^{-3}
Ws	-14.30	4.17	-5.30	5.25	3.23	2.69
n	578	272	190	236	542	349

Fig. 4 Modulation of *bax*-induced wing phenotype **a** Distribution of the offspring between the strong, intermediate and weak phenotype categories. Each *bar* represents the progeny of a cross between *vg* > *bax* flies and a control (**c**) or a mutant (*T*) strain. Each cross (*T*) is presented with its control (**c**) that takes into account the specific genetic background of the tested strain. The percentage of phenotypes in each category is shown on the y-axis. **b** Every phenotypic test was validated by the statistical Wilcoxon test. The phenotype distribution of each test cross was compared with that of the corresponding control. Differences in distribution with a probability $\alpha < 10^{-3}$ were considered significant; $Ws < 0$ indicates phenotype suppression and $Ws > 0$ indicates phenotype enhancement; *n* is the number of flies counted

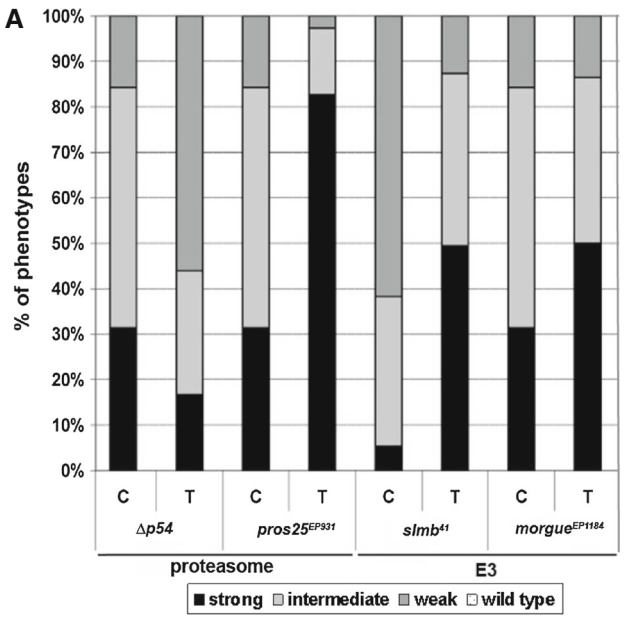
mutation was found to suppress *debcl*-induced apoptosis (Fig. 5, Δ*p54*C and T) whereas the *pros25*^{EP931} mutation enhanced this process (Fig. 5, *pros25*^{EP931}C and T, shows a shift from 31.4 % strong phenotypes to 82.7 %). The suppression of the *debcl*-induced phenotype by *Δp54* is shown in Fig. 3d, d′ and the enhancement of this phenotype by *pros25*^{EP931} in Fig. 3e, e′. Thus, the apoptotic processes induced by Bax and Debcl are regulated by proteasomal degradation. Moreover, as increasing the proteasomal activity suppresses the apoptosis induced by these two proteins whereas decreasing it enhances cell death, the regulator degraded in these processes is presumably a pro-apoptotic molecule.

The Bax and Debcl proteins are degraded by the proteasome

Some members of the Bcl-2 family in mammals are subject to proteasome-mediated regulation. We therefore hypothesized that Bax and Debcl proteins were the pro-apoptotic regulators degraded by the proteasome in our system. To test whether the modulation of Bax- and Debcl-induced cell death involves a direct effect on the level of these proteins, we performed immunostaining and western-blot experiments.

First, wing discs of *vg* > *bax* third-instar larvae were labeled with an anti-Bax antibody (Fig. 6a, *vg* > *bax*) revealing a strong staining in the region in which *vg* drove *gal4* expression (right part of Fig. 6a, *i.e. vg–gal4*-mediated expression of GFP). High-intensity foci correspond to cells overexpressing *bax*. The same immunolabeling was performed on *vg* > *bax*, *Uba1*^{EP2375} wing discs, which coexpress *bax* and *Uba1*. Staining of Bax in *Uba1*^{EP2375}-expressing discs was weaker, with fewer foci of *bax* overexpressing cells (Fig. 6a, *vg* > *bax*, *Uba1*^{EP2375}). This suggests that Bax protein levels are lower in discs over-expressing *Uba1*. To confirm that the decrease in immunodetection of Bax, when *Uba1* is overexpressed, is due to

Annexe



B

	Δp54	pros25^{EP931}	slmb^{41}	morgue^{EP1184}
α	2.29x10^{-9}	1.69x10^{-11}	8.50x10^{-14}	0.024
Ws	-6.11	6.965	7.83	2.25
n	272	215	181	214

Fig. 5 Modulation of *debcl*-induced wing phenotype **a** Distribution of offspring between the strong, intermediate and weak phenotype categories. Each bar represents the progeny of a cross between *ptc* > $(debcl)_2$ flies and a control strain (**c**) or a mutant strain (T). Each cross (T) is presented with its control (**c**). The percentage of phenotypes in each category is shown on the y-axis. **b**. Every phenotypic test was validated by carrying out a Wilcoxon test as in Fig. 4

a decrease in Bax levels and not a loss of epitope accessibility, we carried out a western blotting analysis.

To this purpose, we expressed *bax* or *debcl* ubiquitously in embryos, using the *da-gal4* driver with or without overexpressing *Uba1* from the *Uba1*^{EP2375} allele. We then carried out western blotting to determine the amounts of Bax or Debcl in embryo lysates. When *Uba1* was overexpressed (Fig. 6b, *da* > *bax*, *Uba1*^{EP2375}), Bax became undetectable, even after long exposure times, whereas this protein was readily detectable in the control extract (Fig. 6b, *da* > *bax*, control). Similarly, as shown Fig. 6c, *Uba1* overexpression resulted in a strong decrease in Debcl protein levels, as a longer exposure time was required to detect Debcl (data not shown). Moreover, although the amount of Debcl was decreased by *Uba1* overexpression, Uba1 had no effect on the relative distribution of Debcl between cytosol and mitochondria. Debcl remained mainly detected in the mitochondrial fraction in the presence of

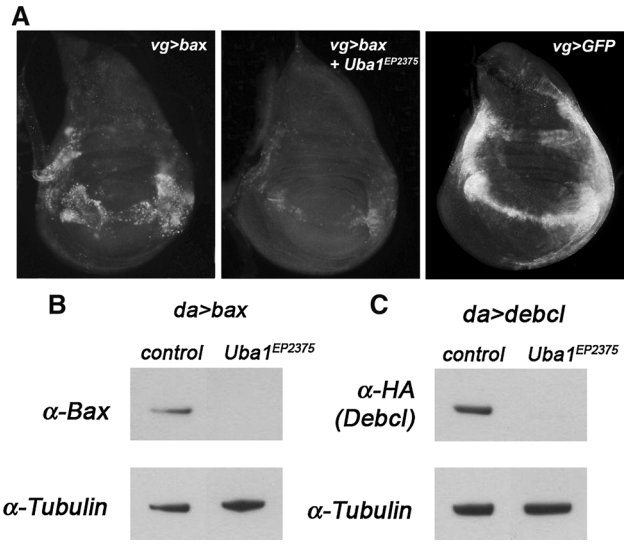


Fig. 6 Uba1 controls the level of Bax and Debcl proteins **a** Bax immunostaining on third-instar larval wing discs expressing *bax* under control of the *vg-gal4* driver (*vg* > *bax*) or coexpressing *bax* and *Uba1* (*vg* > *bax* + *Uba1*^{EP2375}). The panel on the right shows GFP expression driven by *vg–gal4* in the wing pouch, along the dorso-ventral frontier. **b** Immunodetection of Bax in a *Uba1* overexpression background. Uba1 decreases Bax protein quantities down to an undetectable level. **c** Immunostaining of Debcl in a *Uba1* overexpression background. Uba1 reduces the amount of Debcl protein. **b**, **c** Immunodetection of tubulin was used as control

Uba1 overexpression (data not shown). We can therefore conclude that the ubiquitin-mediated regulation of Bax- and Debcl-induced cell death depended on a decrease in the level of Bax and Debcl proteins themselves.

The apoptotic processes induced by Bax and Debcl are regulated by an SCF^{Slmb} complex

As E3 ubiquitin ligases confer its specificity to the ubiquitination process, we tried to identify the E3 responsible for the regulation of *bax*- and *debcl*-induced cell death. Many signalization pathways involve SCF complexes. Thus, we first affected a common component to all SCF complexes SkpA. Overexpression of *skpA* using the *skpA*^{EP1423} allele under control of *vg–gal4* did not affect wing phenotypes. We thus overexpressed this allele in a *vg* > *bax* background. The progeny overexpressing both *bax* and *skpA,* displayed suppression of the *bax*-induced phenotype. The *skpA*^{EP1423} allele shifted the phenotype distribution toward weaker phenotypes (Fig. 4 *skpA*^{EP1423} C and T).

slmb (*supernumerary limb*) encodes an F-box protein homologous to mammalian β-TrCP, which is involved in Mcl-1 recognition in mammals. Slmb contains two functional domains: the F-box domain in the N-terminal half of the protein allowing assembling into the SCF complex through interaction with SkpA, and a C-terminal domain

Annexe

containing WD40 repeats, allowing interaction with substrates. We used $slmb^{8}$ -a null allele of *slmb* which is viable at 18 °C (*i.e.* the temperature used for the *bax*-induced cell death phenotypic suppression tests)- and $slmb^{41}$ -a hypomorphic allele- to decrease the amount of Slmb [35]. The $slmb^{8}$ loss-of-function allele strongly enhanced the *bax*-induced apoptosis-associated phenotype (Fig. 4 $slmb^{8}$ C and T). Indeed, strong phenotypes were significantly more frequent among the $slmb^{8}$ mutants than in the absence of this mutation. The $slmb^{41}$ allele also enhanced the *bax*-induced phenotype, although to a lesser extent (Fig. 4 $slmb^{41}$ C and T). Thus, Slmb most likely targets a pro-apoptotic regulator to proteasomal degradation in our system.

To investigate whether the same SCF^{Slmb} E3 ligase was involved in regulating *debcl*-induced cell death, we carried out the phenotypic test with *debcl*-expressing flies. We tested the effect of a loss-of-function of *slmb* on *debcl*-induced cell death as it is the specific component of the SCF complex. The $slmb^{8}$ mutant is partially lethal at 25 °C (*i.e.* the temperature used for the *debcl*-induced cell death phenotypic suppression tests). We thus used the $slmb^{41}$ allele for these tests and observed higher levels of *debcl*-induced cell death. A shift in the phenotype distribution from 5 % ($slmb^{41}$ C) to 50 % of strong phenotypes ($slmb^{41}$ T) was observed (Fig. 5). This enhancement was characterized by an increase in size of the fusion of the L3 and L4 veins in the region of the anterior crossvein (Fig. 3f, f′). Therefore the SCF^{Slmb} E3 ubiquitin ligase is a negative regulator of *bax*- and *debcl*-induced apoptosis.

Finally, as a control, we investigated whether *morgue* affected *bax*- and *debcl*-induced apoptosis. Like Slmb, Morgue is an F-box protein but it is involved in the regulation of apoptosis through the targeting of Diap1 for proteasomal degradation. The hypomorphic $morgue^{EP1184}$ allele [37] had no effect on the phenotype induced by Bax or Debcl, as shown Fig. 3g, g′ for the *debcl*-induced crossvein phenotype. As indicated in Figs. 4 and 5, no significant change in phenotype distribution was observed in either case (α values of 7×10^{-3} for *bax* and 2.4×10^{-2} for *debcl*). We also verified that this allele did not affect fly phenotypes in presence of *vg–gal4* or *ptc–gal4* drivers alone. The lack of effect of *morgue* suggests that Morgue is not the F-box protein involved in our system. Hence, the effects observed with *slmb* alleles reflect specific Diap1-independent regulation.

Given that Debcl is sensitive to the proteasome activity and that a mutation of *slmb* enhances the *debcl*-induced cell death, we speculated that Debcl physically interacts with Slmb. We performed two types of experiments with the aim of characterizing this physical interaction. In agreement with genetic data, Debcl co-immunoprecipitates with Slmb (Fig. 7a). We assessed the occurrence of this physical

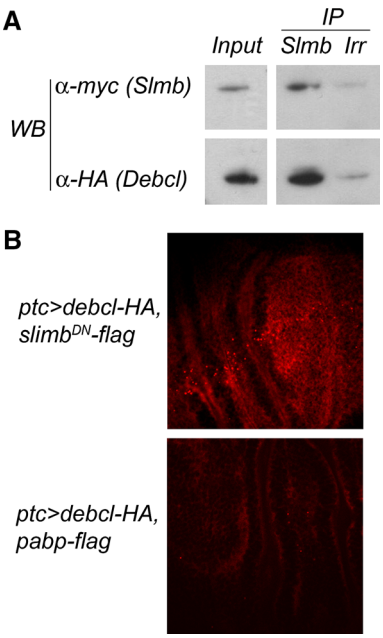


Fig. 7 Debcl and Slmb physically interact in vivo **a** Embryos ubiquitously co-expressing $Slmb^{DN}$-flag-myc and Debcl-HA (*UAS-debcl-HA/+* ; *da > $slmb^{DN}$-flag-myc/UAS-debcl-HA*) were prepared as described in "Materials and Methods" section and subjected to immunoprecipitation (IP) with mouse anti-flag antibodies (Slmb) or IgG1 control (Irr). Western-blot analysis was then performed with an anti-myc mAb (Slmb) or anti-HA mAb (Debcl). The input lane contains 6 % of the lysate while immunoprecipitates were obtained from 28 % of the lysate. Debcl co-immunoprecipitates with Slmb. **b** Wing discs of *Ptc > Debcl-HA*, *$Slmb^{DN}$-flag-myc* and *Ptc > Debcl-HA,Pabp-flag* third instar larvae were analysed by use of the proximity ligation in situ assay to monitor the Debcl/Slmb interaction. As expected, no signal was observed in *Ptc > Debcl-HA,Pabp-flag* discs whereas the red dots observed in *Ptc > Debcl-HA*, *$Slmb^{DN}$-flag-myc* indicate Slmb/Debcl colocalization

interaction in vivo by using a proximity ligation in situ assay (Fig. 7b). Red dots are specifically observed in *Ptc > Debcl-HA,$Slmb^{DN}$-flag-myc* wing discs, indicating that Debcl and Slmb colocalize within 40 nm. This approach confirmed that the two proteins can interact with each other in vivo. Together with our genetic data, these results show that a SCF^{Slmb} E3 ubiquitin ligase is involved in Debcl ubiquitination and subsequent proteasomal degradation.

Discussion

In this paper, using *Drosophila* as a model for genetic studies, we report the regulation of *bax*- and *debcl*-induced apoptosis by the ubiquitin–proteasome pathway. The stimulation of this pathway by overexpressing *Uba1,* which encodes the ubiquitin activating enzyme, leads to an almost complete loss of *bax*-induced cell death. This regulation seems conserved through evolution, as *debcl*-induced

Annexe

apoptosis is also regulated in this way. However, since Bax seems to necessitate Debcl in order to kill *Drosophila* eye cells [25], one could wonder whether suppression of Bax-induced cell death depends on the direct effect of *Uba1* on Debcl. Nevertheless, since we have shown that both Bax and Debcl proteins are degraded when *Uba1* is overexpressed, this seems unlikely unless Debcl stabilizes Bax.

Since Buffy inhibits autophagy in response to starvation [39], we can hypothesize that Debcl could induce an autophagic cell death. We have monitored autophagy in our system by using a UAS-Atg8-GFP transgene [40] and found that actually no autophagy could be detected upon Debcl expression (data not shown). Uba1 has been shown in the literature to be required for autophagy and reduction of cell size in the intestine [41]. We show here that Debcl-induced cell death in the wing disc is not only suppressed by Uba1 but also by proteasome mutants. These data suggest that the UPS pathway is the main proteolytic pathway involved in the suppression of Bax and Debcl-induced apoptosis by Uba1. However, given that *slmb* has been shown to regulate Wg and Dpp pathways [35, 42–44], we cannot exclude that these pathways are partially involved in phenotypic suppression.

Studies of the proteasome-dependent regulation of members of the Bcl-2 family in mammals have only rarely led to the identification of the specific E3 ligases. We identified an SCF^{Slmb} complex as the E3 ubiquitin ligase that regulates the Debcl pathway and may target it to proteasomal degradation. It would be interesting to determine whether the mammalian homologue of Slmb, β-TrCP, targets Bax to the proteasome in mammalian cells.

Here, we proved Debcl to be a target of the UPS, finding a new regulation of apoptosis that differs from the control of Dronc, Drice and RHG protein levels by Diap1. Indeed, Diap1 is a key enzyme that decides of cell fate by degrading either pro-apoptotic regulators or itself, leading to either cell survival or apoptosis. Since Diap1 levels are downregulated by the F-box protein Morgue in presence of Rpr or Grim, we could hypothesize that the Morgue/Diap1 pathway is involved in *bax*- and *debcl*-induced apoptosis regulation. This does not seem to be the case because a hypomorphic allele of *morgue* did not increase *bax*- and *debcl*-induced apoptosis (data not shown). Furthermore, overexpression of *diap1* does not inhibit *bax*- and *debcl*-induced apoptosis (data not shown). Thus, the proteasome-dependent regulation we identified is independent of Diap1 and differs from the Morgue/Diap1 regulation of cell death. The existence of different UPS-modulated cell death pathways is also supported by the reported absence of genetic interaction between RHG pathway components and Debcl [25].

Our results indicate an anti-apoptotic role of *Uba1* in the wing tissue. However, two other studies revealed a pro-apoptotic role of *Uba1* in the eye; strong *Uba1* loss-of-function alleles lead to apoptosis and compensatory proliferation in the developing eye [45, 46]. As previously shown in other systems, these processes seem to involve the RHG/Diap1/Dronc pathway [47, 48]. Hypomorphic alleles of *Uba1* have shown opposite effects as they suppressed *hid*- or *grim*-induced apoptosis in the eye. These results are consistent with previous data indicating that *Uba1* overexpression, using the $Uba1^{EP2375}$ allele, increases RHG-induced apoptosis. In principle, this apparent contradiction may result from either the cell death signal or the studied tissue. The use of a GMR-Gal4 driver shows that *Uba1* overexpression also inhibits *debcl*-induced apoptosis in the eye tissue (data not shown), which suggests that the Uba1 effect is specific of *debcl*-induced apoptosis. In contrast, *rpr*-induced cell death is enhanced by *Uba1* overexpression in the eye, whereas it is suppressed by Uba1 in the wing (data not shown). These results suggest that Debcl could be involved in *rpr*-induced cell death in the wing but not in the eye. RHG proteins are known to mediate their pro-apoptotic function by stimulating Diap1 degradation by the UPS while Debcl is a direct target of ubiquitination. Therefore, RHG-induced degradation of Diap1 through its ubiquitination by Morgue could explain the pro-apoptotic role of Uba1 in the eye whereas the anti-apoptotic Uba1 function mediated by Slmb in Debcl-induced cell death would rely on Debcl degradation. By showing that different pro-apoptotic pathways are regulated by the UPS in *Drosophila*, our work suggests that the tissue-dependent effect of the pleiotropic enzyme Uba1 must result from a change in the balance between UPS pro- and anti-apoptotic effects. We propose that this change relies on the availability in E3 enzymes, the incoming signals and relative amounts of pro- and anti-apoptotic regulators of cell fate.

Acknowledgments We thank A. Udvardy for generously providing us with the Δ*p54* mutant and B. Limbourg-Bouchon and T. Murphy for the *slmb* mutants. We also thank Herman Steller and Tommaso Villa for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and by Grants from the *Association pour la Recherche Contre le Cancer* (#3819) and the *Ligue Nationale Contre le Cancer* (*Comité des Yvelines*). Confocal microscopy was performed on CYMAGES imaging facility. Jessie Colin was the recipient of a fellowship from *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur*. Jessie Colin and Julie Garibal were supported by the *Ecole Pratique des Hautes Etudes*.

References

1. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B (2012) The mitochondrial pathways of apoptosis. Adv Exp Med Biol 942:157–183

Annexe

2. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. Cell 121:1085–1095
3. Ding Q, He X, Hsu JM et al (2007) Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. Mol Cell Biol 27:4006–4017
4. Magiera MM, Mora S, Mojsa B, Robbins I, Lassot I, Desagher S (2013) Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. Cell Death Differ 20:281–292
5. Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S (2000) Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. Mol Cell Biol 20:1886–1896
6. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S (2000) Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. J Biol Chem 275:21648–21652
7. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T et al (2003) Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. EMBO J 22:6653–6664
8. Li B, Dou QP (2000) Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. Proc Natl Acad Sci USA 97:3850–3855
9. Liu FT, Agrawal SG, Gribben JG et al (2008) Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. Blood 111:2797–2805
10. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK et al (2004) Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. J Biol Chem 279:21085–21095
11. Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. J Biol Chem 277:14040–14047
12. Xin M, Deng X (2005) Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. J Biol Chem 280:10781–10789
13. Xin M, Gao F, May WS, Flagg T, Deng X (2007) Protein Kinase C{zeta} Abrogates the Proapoptotic Function of Bax through Phosphorylation. J Biol Chem 282:21268–21277
14. Amsel AD, Rathaus M, Kronman N, Cohen HY (2008) Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. Proc Natl Acad Sci USA 105:5117–5122
15. Quinn L, Coombe KM, Tasman D, Colussi P, Kumar S, Richardson H (2003) Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. EMBO J 22:3568–3579
16. Sevrioukov EA, Burr J, Huang EW et al (2007) *Drosophila* Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. Genesis 45:184–193
17. Senoo-Matsuda N, Igaki T, Miura M (2005) Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in *Drosophila*. EMBO J 24:2700–2713
18. Wu JN, Nguyen N, Aghazarian M et al (2010) Grim promotes programmed cell death of *Drosophila* microchaete glial cells. Mech Dev 127:407–417
19. Tanner EA, Blute TA, Brachmann CB, McCall K (2011) Bcl-2 proteins and autophagy regulate mitochondrial dynamics during programmed cell death in the *Drosophila* ovary. Development 138:327–338
20. Yacobi-Sharon K, Namdar Y, Arama E (2013) Alternative germ cell death pathway in *Drosophila* involves HtrA2/Omi, lysosomes, and a caspase-9 counterpart. Dev Cell 25:29–42
21. Colussi PA, Quinn LM, Huang DC et al (2000) Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. J Cell Biol 148:703–714
22. Igaki T, Kanuka H, Inohara N et al (2000) Drob-1, a *Drosophila* member of the bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. Proc Natl Acad Sci USA 97:662–667
23. Brachmann CB, Jassim OW, Wachsmuth BD, Cagan RL (2000) The *Drosophila bcl-2* family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. Curr Biol 10:547–550
24. Zhang H, Huang Q, Ke N et al (2000) *Drosophila* pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. J Biol Chem 275:27303–27306
25. Galindo KA, Lu WJ, Park JH, Abrams JM (2009) The Bax/Bak ortholog in *Drosophila*, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. Development 136:275–283
26. Xu D, Li Y, Arcaro M, Lackey M, Bergmann A (2005) The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. Development 132:2125–2134
27. Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwieg E, Steller H (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. EMBO J 19:589–597
28. Lisi S, Mazzon I, White K (2000) Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. Genetics 154:669–678
29. Igaki T, Yamamoto-Goto Y, Tokushige N, Kanda H, Miura M (2002) Down-regulation of DIAP1 triggers a novel *Drosophila* cell death pathway mediated by Dark and DRONC. J Biol Chem 277:23103–23106
30. Colin J, Gaumer S, Guenal I, Mignotte B (2009) Mitochondria, Bcl-2 family proteins and apoptosomes: of worms, flies and men. Front Biosci 14:4127–4137
31. Gaumer S, Guenal I, Brun S, Theodore L, Mignotte B (2000) Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in *Drosophila*. Cell Death Differ 7:804–814
32. Brun S, Rincheval V, Gaumer S, Mignotte B, Guenal I (2002) reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in *Drosophila*. Oncogene 21:6458–6470
33. Colin J, Garibal J, Mignotte B, Guenal I (2009) The mitochondrial TOM complex modulates bax-induced apoptosis in *Drosophila*. Biochem Biophys Res Commun 379:939–943
34. Monnier V, Girardot F, Cheret C, Andres O, Tricoire H (2002) Modulation of oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* by gene overexpression. Genesis 34:76–79
35. Miletich I, Limbourg-Bouchon B (2000) *Drosophila* null slimb clones transiently deregulate Hedgehog-independent transcription of wingless in all limb discs, and induce decapentaplegic transcription linked to imaginal disc regeneration. Mech Dev 93:15–26
36. Szlanka T, Haracska L, Kiss I et al (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila* melanogaster. J Cell Sci 116:1023–1033
37. Wing JP, Schreader BA, Yokokura T et al (2002) *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. Nat Cell Biol 4:451–456
38. Neuburger PJ, Saville KJ, Zeng J, Smyth KA, Belote JM (2006) A genetic suppressor of two dominant temperature-sensitive lethal proteasome mutants of *Drosophila* melanogaster is itself a mutated proteasome subunit gene. Genetics 173:1377–1387
39. Monserrate JP, Chen MY, Brachmann CB (2012) *Drosophila* larvae lacking the bcl-2 gene, buffy, are sensitive to nutrient stress, maintain increased basal target of rapamycin (Tor) signaling and exhibit characteristics of altered basal energy metabolism. BMC Biol 10:63
40. Mohseni N, McMillan SC, Chaudhary R, Mok J, Reed BH (2009) Autophagy promotes caspase-dependent cell death during *Drosophila* development. Autophagy 5:329–338
41. Chang TK, Shravage BV, Hayes SD et al (2013) Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. Nat Cell Biol 15:1067–1078

42. Muzzopappa M, Wappner P (2005) Multiple roles of the F-box protein Slimb in *Drosophila* egg chamber development. Development 132:2561–2571
43. Swarup S, Verheyen EM (2011) *Drosophila* homeodomain-interacting protein kinase inhibits the Skp1-Cul1-F-box E3 ligase complex to dually promote Wingless and Hedgehog signaling. Proc Natl Acad Sci USA 108:9887–9892
44. Theodosiou NA, Zhang S, Wang WY, Xu T (1998) Slimb coordinates wg and dpp expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development. Development 125:3411–3416
45. Lee TV, Ding T, Chen Z et al (2008) The E1 ubiquitin-activating enzyme Uba1 in *Drosophila* controls apoptosis autonomously and tissue growth non-autonomously. Development 135:43–52
46. Pfleger CM, Harvey KF, Yan H, Hariharan IK (2007) Mutation of the gene encoding the ubiquitin activating enzyme Uba1 causes tissue overgrowth in *Drosophila*. Fly 1:95–105
47. Huh JR, Guo M, Hay BA (2004) Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. Curr Biol 14:1262–1266
48. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. Dev Cell 7:491–501

IV. <u>Annexe 4</u> : Un crible visant à identifier des suppresseurs de la mort cellulaire induite par *bax* a permis d'identifier la glycerophosphate oxidase-1 comme un médiateur de l'apoptose induite par *debcl* chez la drosophile

Screening of suppressors of *bax*-induced cell death identifies glycerophosphate oxidase-1 as a mediator of *debcl*-induced apoptosis in *Drosophila*

Jessie Colin[1,2]*, Julie Garibal[1,2]*, Amandine Clavier[1,2], Sébastien Szuplewski[1], Yanick Risler[1], Cécile Milet[1,2], Sébastien Gaumer[1], Isabelle Guénal[1#] and Bernard Mignotte[1,2#]

1: Université Versailles St-Quentin, EA4589, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, 78180 Montigny-le-Bretonneux , France.

2: Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Génétique Moléculaire et Physiologique, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

* These two authors contributed equally to this work

Co-senior authors

Corresponding author:

Pr Bernard MIGNOTTE

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire,

Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines,

Bâtiment Simone Veil

2 avenue de la Source de la Bièvre

78180 Montigny-le-Bretonneux

Tel: + 33 (0)1 70 42 94 45

e-mail: bernard.mignotte@uvsq.fr

Key words:

Apoptosis, Bax, Debcl, mutagenesis, Glycerophosphate oxidase

Running title:

Gpo-1 is a mediator of *debcl*-induced apoptosis

Abstract

Members of the Bcl-2 family are key elements of the apoptotic machinery. In mammals, this multigenic family contains about twenty members, which either promote or inhibit apoptosis. We have previously shown that the mammalian pro-apoptotic Bcl-2 family member Bax is very efficient in inducing apoptosis in *Drosophila*, allowing the study of *bax*-induced cell death in a genetic animal model. We report here the results of the screening of a *P[UAS]*-element insertion library performed to identify gene products that modify the phenotypes induced by the expression of *bax* in *Drosophila melanogaster*. We isolated 17 putative modifiers involved in various function or process: the ubiquitin/proteasome pathway; cell growth, proliferation and death; pathfinding and cell adhesion; secretion and extracellular signaling; metabolism and oxidative stress. The *Drosophila* counterpart of Bax, Debcl, has been suggested to be essential to *bax*-induced cell death in fly. Accordingly, most of these suppressors also inhibit *debcl*-induced phenotypes, showing that the activities of both proteins can be modulated in part by common signaling or metabolic pathways. Among these suppressors, *Glycerophosphate oxidase-1* is found to participate in *debcl*-induced apoptosis by increasing mitochondrial reactive oxygen species accumulation.

Introduction

Major executioners of programmed cell death by apoptosis are relatively well conserved throughout evolution. However, the control of commitment to apoptosis exhibits some differences between organisms. During mammalian cells apoptosis, various key pro-apoptotic factors are released from the inter-membrane space of mitochondria (for review, see [1]). These factors include cytochrome c, Apoptosis Inducing Factor (AIF), Endonuclease G, Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI) and the serine protease Omi/HtrA2. Once released in the cytosol, cytochrome c binds to the WD40 domain of Apaf-1 and leads to the formation of a cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 complex called "apoptosome", in which caspase-9 (a cysteinyl aspartase) auto-activates to initiate a caspase activation cascade that will lead to cell death. Mitochondrial permeabilization is under the control of the Bcl-2 family of proteins. These proteins share one to four homology domains with Bcl-2 (named BH1-4) and exhibit very similar tertiary structures. However, while some of these proteins (such as Bcl-2) are anti-apoptotic, the others are pro-apoptotic and assigned to one of the following sub-classes: BH3-only proteins (such as Bid) and multi-domain proteins (such as Bax). During apoptosis, Bax translocates to the mitochondrial outer membrane, undergoes conformational changes, oligomerizes and finally allows the release of pro-apoptotic factors from the intermembrane space (review [2]). Anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family oppose this Bax-mediated mitochondrial release of apoptogenic factors while BH3-only proteins can activate Bax or inhibit anti-apoptotic proteins of the family.

In *C. elegans*, activation of the caspase CED-3 requires CED-4, the homologue of Apaf-1 but no cytochrome c. The Bcl-2 family protein CED-9 constitutively interacts with CED-4 and thereby prevents the activation CED-3. This repression of cell death is released upon binding of CED-9 to the BH3-only protein EGL-1, which induces a conformational change in CED-9 that results in the dissociation of the CED-4 dimer from CED-9. Released CED-4 dimers form tetramers, which facilitate auto-activation of CED-3 [3]. Although CED-9 appears bound to mitochondria, these organelles seem to play a minor role in apoptosis in *C. elegans*, contrarily to mammals [4].

The role of mitochondria in *Drosophila* programmed cell death remains more elusive [1, 5-7]. Cytochrome c does not seem crucial in the apoptosome activation [8, 9], which is mediated by the degradation of the caspase inhibitor DIAP1 by proteins of the Reaper/Hid/Grim (RHG) family. The apoptotic cascade appears somehow inverted between

flies and worm/mammals. In these two last organisms, apoptosis regulators are relocated from mitochondria to the cytosol. Contrarily, *Drosophila* apoptosis regulators are concentrated at or around mitochondria during apoptosis. Indeed, targeting the RHG proteins Reaper (Rpr) and Grim to mitochondria seems to be required for their pro-apoptotic activity [10-12]. Furthermore, Hid possesses a mitochondrial targeting sequence and is required for Rpr recruitment to the mitochondrial membrane and for efficient induction of cell death *in vivo* [13].

The important role played in *Drosophila* by the mitochondria in apoptosis is also suggested by the mitochondrial subcellular localization of Buffy and Debcl, the only two members of the Bcl-2 family identified, so far, in this organism. Buffy was originally described as an anti-apoptotic Bcl-2 family member [14, 15], but it can also promote cell death [16-19]. Debcl (death executioner Bcl 2 homolog), is a multidomain death inducer [19-23] that can be inhibited by direct physical interaction with Buffy [14]. When overexpressed in mammalian cells, *debcl* induces both cytochrome c release from mitochondria and apoptosis. This protein interacts physically with anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Bcl-2 itself, in mammals. In *Drosophila*, Debcl is involved in the control of some developmental cell death processes as well as in irradiation-induced apoptosis [15, 18, 24].

We have previously shown in *Drosophila* that mammalian Bcl-2 inhibits developmental and irradiation-induced cell death [25] as well as *rpr*- and *bax*-induced mitochondrial membrane potential collapse [26]. Interestingly, we have shown that *bax*-induced cell death is mitigated by loss-of-function (LOF) mutations in genes encoding some components of the TOM complex which controls protein insertion in the outer mitochondrial membrane [5]. These results suggest that Bax mitochondrial location remains important for its activity in *Drosophila*. Therefore, flies provide a good animal model system to study Bax-induced cell death in a simple genetic background and look for new regulators of Bcl-2 family members.

Here, we report the results of the screening of *P[UAS]*-element insertion (UYi) library, performed in order to identify modifiers of *bax*-induced phenotypes in *Drosophila*. Among 1475 UYi lines screened, 17 putative modifiers were isolated, that include genes involved in various cellular functions. We also present a more detailed study of one of these modifiers, *UY1039,* and show that glycerophosphate oxidase-1 (Gpo-1) [EC 1.1.5.3] participates in *debcl*-induced apoptosis by increasing reactive oxygen species (ROS) production.

Materials and methods

Fly stocks

All strains were raised on standard culture medium at 25°C or 18°C. Generation of UYi lines was performed by standard *P* mobilization [27] of a *P[Mae-UAS.6.11]* [28]. The driver strains used in this study, are *vestigial-GAL4* (*vg-GAL4*) [25] and *patched-GAL4* (*ptc-GAL4*) given by L. Théodore. The strains carrying *UAS-bax* or *UAS-bcl-2* transgenes have been generated in our laboratory and were previously described [25]. The strain carrying two insertions of *UAS-debcl-HA* (one on the second and one on the third chromosome) was given by H. Richardson [20] and recombined with the *ptc-GAL4* driver to generate the pct>debcl$_2$ strain. Either y,w^c or w^{1118} Canton S was used as the control strain according to the genetic background of the tested lines. The $Uba1^{EP2375}$ mutant strain was obtained from the Szeged Drosophila stock center. Gpo-1^{n322} [29], Gpo-1^{291} and UAS-RNAi-Gpo-1 Trip #55319 strains were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center. The UAS-RNAi-Gpo-1 VDRC KK #110608 strain was obtained from Vienna Drosophila RNAi Center.

Screen for suppressors of lethality

UYi lines including a *P*-element insertion on the X, second or third chromosome were tested. Concerning the screening of UYi lines carrying a *P*-element on the second chromosome, the survival rate in the progeny was evaluated as follows. Each cross was performed with 7 virgin females and 3 males. [*vg>bax/CyOGFP*] virgin female flies were mated to [*UYi*/*UYi*] males when homozygous males were viable or, alternatively, to heterozygous [*UYi*/*CyO*] males. In the first case, the survival rate corresponds to ([*vg>bax*/*UYi*] / [*UYi*/*CyOGFP*]) while in the case of heterozygous mutant strains it corresponds to (([*vg>bax/CyO*] + [*vg>bax*/*UYi*]) / [*UYi*/*CyOGFP*]).

For UYi lines carrying the *P*-element on the third chromosome, virgin female flies [*vg>bax*/*CyOGFP* ; +/+] were mated to viable [+/+ ; *UYi*/*UYi*] males or, alternatively, to [+/+ ; *UYi*/*TM3*] males. In the first case, the survival ratio corresponds to ([*vg>bax/+ ; UYi/+*] / [*CyOGFP/+ ; UYi/+*]), while in the second case it was (([*vg>bax*/+ ; *UYi* /+] + [*vg>bax*/+ ; *TM3*/+]) / ([*CyOGFP*/+ ; *UYi* /+] + [*CyOGFP*/+ ; *TM3*/+])).

UYi lines located on the *X* chromosome were screened by crossing virgin [*UYi*/*UYi ; +/+*] or [*UYi/FM0 ; +/+*] female flies with [*+/Y ; vg>bax/CyOGFP*] males. If the mutant line was homozygous, the survival ratio was (([*UYi/+ ; vg>bax/+*]) / [*UYi/+ ; CyOGFP/+*]). If the

mutant line was balanced with *FM0*, the ratio was (([*UYi/+ ; vg>bax/+*] + [*FM0 /+ ; vg>bax/+*]) / ([*UYi/+ ; CyOGFP/+*] + [*FM0/+ ; CyOGFP/+*]).

For *UYi* insertions located on autosomes, only crosses giving rise to a progeny of at least 25 individuals including at least two [*vg>bax/UYi*] were taken into account. For mutations of the X chromosome, only crosses giving rise to at least 25 individuals including at least 20 [*UYi/+* ; *CyOGFP* /+] flies were taken into account.

To study phenotypes and survival, crosses were performed at 18°C and after five days they were either kept at 18°C or switched to 25°C. Since the survival ratio obtained, when [*vg>bax/CyOGFP*] flies were mated to the control y,w^c line, never exceeds 70% at 18°C and 35% at 25°C, *UYi* mutations were considered as suppressors of lethality if the survival rate was higher than 100% at 18°C or higher than 50% at 25°C.

Classification of the wing phenotypes and the Wilcoxon test

All the lineages were analyzed in parallel with a control progeny and by a blind observer. Flies were classified according to their wing phenotype (strong, intermediate or weak) as previously described [26]. For flies showing two different wing phenotypes, the strongest phenotype of both wings was used for classification. In our screen, we have analyzed the distribution of graded phenotypes based on their expressivity. The Wilcoxon test was used to compare the distributions of the phenotypes between two lineages A and B [30]. The sign of the $Ws_{A\text{-}B}$ value determines whether the distribution A is stronger than B ($Ws<0$) or whether the distribution B is stronger than A ($Ws>0$). We considered the difference between A and B significant when $\alpha_{A\text{-}B}<10^{-3}$.

Molecular characterization of UYi lines

To characterize the genes identified by screening for *bax*-induced phenotype modifiers, the DNA flanking the *P[Mae-UAS.6.11]* element was isolated by inverse polymerase chain reaction (PCR), essentially according to the Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) protocol (http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html) and sequenced. The following primers were used in this study:

“31b” 5’-GCAGTTGATTTACTTGGTTGCTGG-3’,

“OUY76YR” 5’-GGTAAGCTTCGGCTATCGAC-3’,

“32bis” 5’-GCTTTCGCTTAGCGACGTGT-3’,

"OUY32" 5'-GCTTTCGCTTAGCGACGTG-3',

"OUY76bis" 5'-GTATACTTCGGTAAGCTTCG-3',

"OUYISA" 5'-CTCTCAACAAGCAAACGTGC-3',

"OUY52" 5'-ACACAACCTTTCCTCTCAACAA-3',

"OUY33" 5'-GAATTGAATTGTCGCTCCGT-3',

"OUY31" 5'-ATTGATTCACTTTAACTTGCAC-3'.

Sequencing was performed by Genecust (Genopole, Evry, France). Sequences were submitted to BLAST search in the BDGP database to identify nearby genes.

Quantification of ptc-Gal4>(UAS-debcl)$_2$-induced phenotype in the wing

To test the implication of *Gpo-1* in *debcl*-induced apoptosis, the severity of the wing tissue loss induced by *UAS-debcl* overexpression led by *ptc-Gal4* driver was measured in different genetic backgrounds. We first verified that the *Gpo1^{n322}* LOF mutation did not induce any wing phenotype by itself. Then, *ptc>debcl$_2$,* females were crossed with wild-type males or males bearing a LOF mutation for *Gpo-1*. For each progeny, the distance between veins L3 and L4 was measured perpendicularly to the sixth sensilla of the dorsal row of the anterior wing margin and plotted against the distance between the extremity of veins 4 and 5. Student's t-tests were then performed.

TUNEL staining

As previously described [31, 32], third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS/formaldehyde 3.7%, washed three times for 10min in PBT (1X PBS, 0.5% Triton). Discs were then dissected and TUNEL staining was performed according to manufacturer's instructions (ApopTag Red in situ apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley, Marne-La-Vallée, France) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). White patches in the *ptc* expression domain were counted for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's t-tests were then performed.

Mitochondrial superoxide measurement

MitoSOX (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was used to measure the mitochondrial production of superoxide as described in [33]. Briefly, twenty wing imaginal discs were dissected in Schneider's *Drosophila* medium (Fisher Bioblock scientific, Illkirch

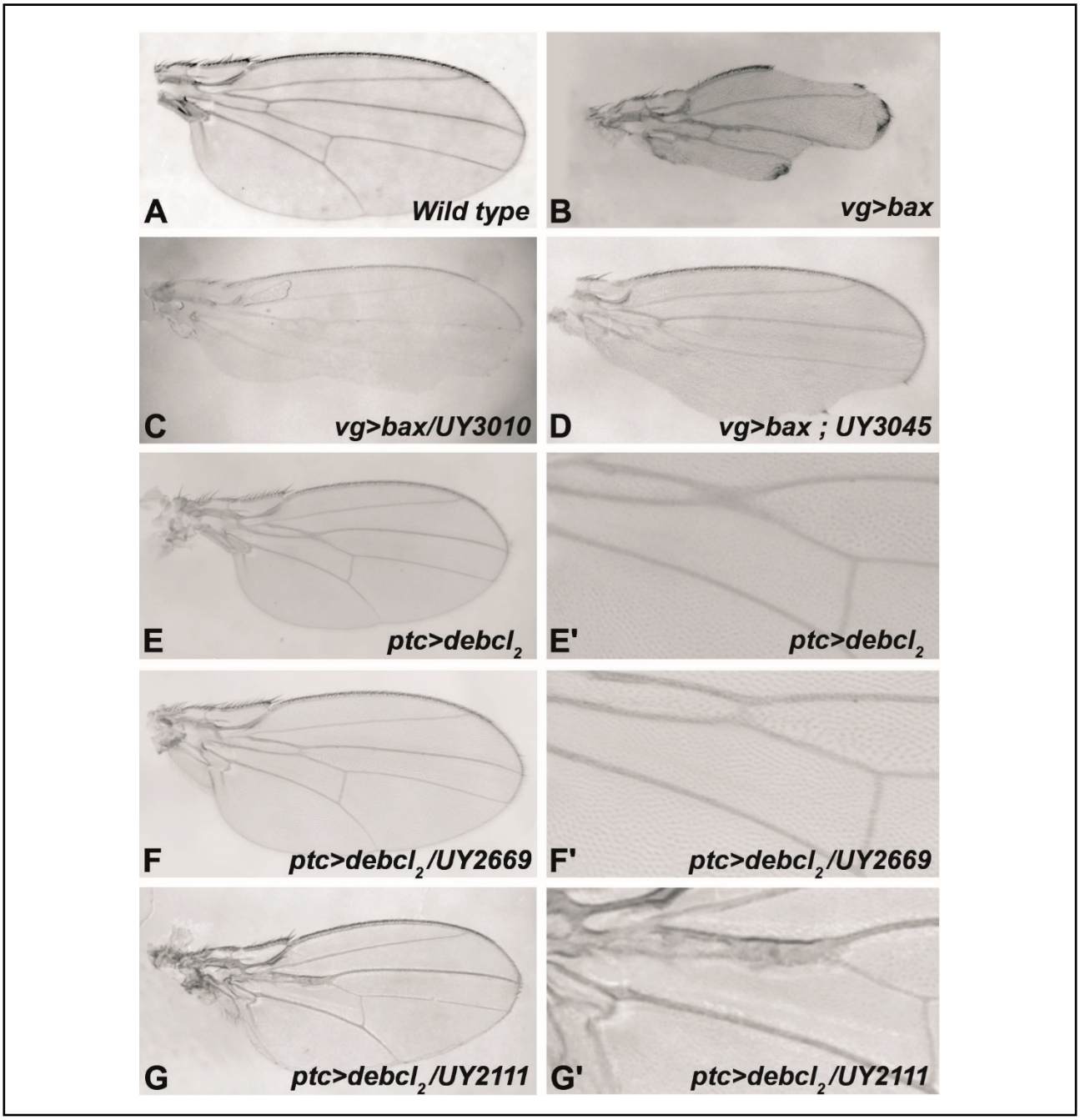


Figure 1. – Examples of modified adult wing phenotypes.
(A) Wild-type wing.
(B-D) Adult wings from *bax* expressing flies. (B) *vg>bax*, (C) *vg>bax/UY3010*, (D) *vg>bax ; UY3045.*
(E-G) Adult wings from *debcl* expressing flies. (E'-G') are magnifications of (E-G). (E-E') *ptc>debcl*$_2$ (F-F') *ptc>debcl*$_2$*/UY2669*, (G-G') *ptc>debcl*$_2$*/UY2111.*

Graffenstaden, France), then cells were trypsinized. 5 µM MitoSOX were added to the cells placed at 37°C. Red fluorescence was then measured by flow cytometry in 2000 events per experimental condition. Flow cytometric measurement was performed using a BD LSRFortessa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Fluorescence was induced by the Yellow-Green Laser (561 nm). Red fluorescence was collected with a PE detector (emission: 578 nm).

Results

A modifier screen for suppressors of bax-induced cell death

We have previously shown that expression of the proapoptotic gene *bax* induced apoptosis in the developing eye or wing [25, 26]. Expression of *bax* under control of the wing specific *vg-GAL4* driver during development led to lethality and notches in the wing of the surviving escapers. As expected from the temperature sensitivity of the UAS-GAL4 expression system, lethality was more penetrant and wing phenotypes were more severe when flies were raised at 25°C than at 18°C. This adult wing phenotype was suppressed by *bcl-2* expression [25, 26] and by heterozygoty for LOF mutations in genes encoding Tom22 or Tom70 [5], indicating that the *vg>bax*-induced adult wing phenotype is sensitive and thus amenable to genetic screening.

To gain insight into the molecular mechanism of *bax*-induced apoptosis and with the aim of isolating regulators of this process, we designed a genetic screen for modifiers of Bax-mediated tissue loss in the wing. To ease the screening procedure, we used a strain recombined for *vg-GAL4* and *UAS-bax* transgenes. Animals heterozygous for *vg>bax* showed a strong and scorable notched wing phenotype (Figure 1B, compared to 1A), facilitating the selection of suppressors rather than enhancers.

A mutagenesis involving the transposition of a *P*-element containing *UAS* sequences, *P[Mae-UAS.6.11]* has been performed. Genes flanking the 5' end of the transposon could therefore be transcriptionally regulated by the *UAS/GAL4* system and thus overexpressed. The *P*-element insertion, *per se*, could also generate LOF mutations. As part of a consortium of laboratories, we have produced *Drosophila* lines with random insertion sites of the *P*-element named hereafter UYi [28, 34, 35]. Thus, a collection of 1475 lines, *i.e.* 594 with the *P*-element inserted on the second chromosome, 775 on the third chromosome and 106 on the X

Strain	Chromosome	Survival (%)		Wilcoxon test	Insertion site	Cytological location	Gene	Putative insertion effect
		18°C	25°C					
UY558	II	107	20	$\alpha=7.9x10^{-10}$ n=125	~1183988	21F2	*CG5126*	overexpression
UY1039	II	119	72	$\alpha= 8.2x10^{-4}$ n=173	11749089	52C8	*Gpo-1*	loss of function
UY1116	II	156	47	$\alpha=3.3x10^{-4}$ n=330	5027391	25C1	*vkg*	overexpression
UY1118	II	109	44	$\alpha=5x10^{-7}$ n=125	~20779074	60E5	*Ance-5*	overexpression
UY1131	II	96	104	$\alpha=7.3x10^{-5}$ n=206	19157906	37C1-C6	*brat*	loss of function
UY1615	II	97	31	$\alpha<10^{-15}$ n=229	6421874	47A11-A13	*lola*	overexpression
UY2056	II	106	77	$\alpha=2x10^{-6}$ n=120	~1555073	22A3	*CG14351*	loss of function
UY2106	III	69	65	$\alpha=2X10^{-4}$ n=144	4495304	85A5	*CG8036*	overexpression
UY2111	II	74	82	$\alpha<10^{-15}$ n=254	~2108075	42A13	*bin3*	overexpression
UY2220	III	47	65	$\alpha=2.9x10^{-4}$ n=125	15612981	71E4	*comm3*	loss of function
UY2510	III	115	55	$\alpha= 6.3x10^{-5}$ n=418	15721530	71F2	*comm*	loss of function
UY2564	III	115	43	$\alpha=2.35x10^{-5}$ n=232	10957668 / 10960827	88E2	*CG6934/CG6912*	loss of function
UY2625	III	123	78	$\alpha=1.85x10^{-6}$ n=497	27811473	100E1	*heph/CG2003*	loss of function
UY2669	III	36	85	$\alpha=8.2x10^{-5}$ n=80	~3983390	64A2	*scrt*	overexpression
UY3010	II	100	74	$\alpha=5.1x10^{-15}$ n=243	5080803	46A1	*Uba1*	overexpression
UY3045	III	139	59	$\alpha=2.82x10^{-5}$ n=350	6957776	65D5	*sgl*	overexpression
UY4001	X	206	58	$\alpha=1.3x10^{-11}$ n=255	13716347	12C6	*clic*	loss of function

Table 1: Identified suppressors of *bax*-induced wing phenotype.
Concerning UY2564 strain the *P* element insertion site could not be singled out by reverse PCR and two insertion sites remain possible.

chromosome was generated. Males carrying *UYi* were crossed with *vg>bax/CyOGFP* females and their progeny was screened for a rescue of both lethality (at 18°C and/or 25°C) and the notch phenotype (see Materials and Methods). Examples of wing phenotypes suppression are shown on Figure 1C and D. 56 *UYi* lines were selected, corresponding to 3,8% of the collection (56/1475).

Since the number of flies exhibiting a rescue of the wing phenotype was sometimes low, we tested the relevance of the suppression of the wing phenotype by a statistical approach. As previously described [26], expressivity and penetrance of the wing phenotype are variable in a population of flies of the same genotype. Flies expressing *bax* in the wing exhibit a distribution of phenotypes that can be classified into three categories: strong, intermediate and weak according to the number and size of notches observed along the wing margin. Therefore, we have used the statistical Wilcoxon test [30] to compare distributions of phenotypes between the two different types of progenies that express *bax* with or without the *UYi* suppressor. This test defines an α and a Ws value that respectively allow assessment of whether two distributions are significantly different or not, and which population is composed of stronger phenotypes. We defined the statistically significant limit as $\alpha<10^{-3}$. Using this stringent criterion, we identified 24 suppressors of *bax* acting both on fly survival and wing phenotype, among the 56 selected *UYi* lines, corresponding to 1.6% of the collection (24/1475).

Subsequently, to distinguish possible additive effects from more specific interactions, all selected UYi lines were crossed with *vg-GAL4*. Only wild type wing phenotypes, ruling out an additive effect of *UYi* and *bax* transgenes, and thus revealing the specificity of the genetic interactions between *bax* and the 24 insertions.

To define if the wing phenotype suppression could be due to a gain (GOF) or a LOF, we identified the insertion point and orientation of each of the 24 insertions. PCR rescue experiments were performed and their products were sequenced. We compared the recovered sequence of the flanking genomic DNA to the *Drosophila* full-genome sequence database [36]. We were unable to obtain unambiguous flanking sequence information for 7 isolated *UYi* lines, *i.e. UY504*, *UY1220*, *UY1236*, *UY1649*, *UY2303*, *UY2650* and *UY2803*. Therefore, 17 putative suppressors of *bax*-induced apoptosis were identified. The results are presented in the Table 1, which summarizes the genetic and molecular characterization of the selected insertions.

Functional group	Strain	Gene	Molecular function / Biological processes
Cell growth, proliferation or death	UY1131	*brain tumor (brat)*	Translation repressor activity / negative regulation of cell proliferation
	UY4001	*clic*	Chloride channel activity / response to oxidative stress / apoptosis ?
	UY558	*CG5126*	Choline kinase / unknown
	UY2111	*bicoid-interacting protein 3 (bin3)*	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity / olfactory behavior
	UY1615	*lola*	RNA polymerase II transcription factor activity / axon guidance
Pathfinding and cell adhesion	UY2510	*commissureless (comm)*	Protein binding / axon guidance
	UY2220	*comm3*	Protein binding / salivary gland cell autophagic cell death
	UY2669	*scratch (scrt)*	Transcription factor activity / dendrite morphogenesis
	UY2056	*CG14351*	Receptor binding / nervous system development
	UY1116	*viking (vkg)*	Type IV collagen / basal lamina component
Secretion and extracellular signaling	UY3045	*sugarless (sgl)*	UDP-glucose 6-dehydrogenase / proteoglycan biosynthetic process
	UY1118	*Ance-5*	Peptidyl dipeptidase activity / protein secretion
	UY2564	*CG6934/CG6912*	Growth factor receptor ?
	UY2625	*hephaestus (heph)/CG2003*	Poly-pyrimidine tract binding, mRNA binding / Notch signaling pathway
Metabolism and oxidative stress	UY1039	*Gpo-1*	Glycerophosphate oxidase-1/ carbohydrate metabolism
	UY2106	*CG8036*	Transketolase activity / pentose-phosphate shunt
Ubiquitin proteasome pathway component	UY3010	*Ubiquitin activating enzyme 1 (Uba1)*	Ubiquitin activating enzyme activity / proteasome pathway

Table 2: Molecular function of *bax*-induced wing phenotype suppressors

Candidate genes were regrouped according to the known or putative molecular function of their predicted products (Table 2). They are involved in cell growth, proliferation or death, pathfinding and cell adhesion, secretion and extracellular signaling, metabolism and oxidative stress, ubiquitin/proteasome pathway.

Study of the effects of bax *suppressors on* debcl-*induced phenotypes*

Bax seems to induce cell death in the eye thanks to its interaction with Debcl [24]. Moreover, only few data are reported concerning Debcl regulation and its partners. Therefore, we decided to test if the identified modifiers of *bax*-induced cell death could also genetically interact with *debcl*.

As for *bax*-induced cell death, the expression of *debcl* in wing imaginal discs during development induces apoptosis, which leads to a wing phenotype [14]. A very homogenous adult phenotype was obtained when expressing *debcl* along the antero-posterior frontier of wing discs, thanks to *ptc-GAL4* driver [37]. Under these conditions, *debcl* expression brought closer L3 and L4 veins in the proximal region of the wing, inducing a fusion of these veins in the region of the anterior cross vein (figure 1E and E'). These phenotypes were due to an excess of apoptosis [37].

Before testing genetic interactions, all selected *UYi* insertion were crossed with *ptc-GAL4* flies, to verify that their own overexpression did not give rise to any wing phenotype. All lines studied showed a wild type wing phenotype when tested with *ptc-GAL4*. An exception was *UY2669* that exhibited an absence of anterior cross vein but no alteration at the level of the antero-posterior frontier.

This secondary screen was performed on 15 insertions because two lines were lost (*UY1116* and *UY1039*).We found nine suppressors of *debcl*-induced phenotype (Table 3). An example is shown in Figure 1F-F' for *UY2669*. Four of Bax modifiers had no significant effect and two led to complex phenotypes of partial penetrance as shown for *UY2111* in Figure 1G- G'. Thus, most of *bax*-induced apoptosis suppressors also suppressed *debcl*-induced apoptosis.

Glycerophosphate oxidase-1 participates in superoxide production during Debcl-induced apoptosis

The line *UY1039* being lost we assumed that the suppressor effect of *UY1039* was due to a LOF mutation in the *Glycerophosphate oxidase-1* gene. Given that this gene is involved in the mitochondrial metabolism, and that numerous Bcl-2 family members act at the mitochondrial level, Gpo1 seemed of high interest and we decided to focus on its study. To confirm our

	Strain	Gene	Insertion effect	Wilcoxon test
Suppressor	**UY558**	*CG5126*	overexpression	$\alpha=1.9x10^{-9}$ n=271
	UY1118	*Ance-5*	overexpression	$\alpha=9.5x10^{-8}$ n=270
	UY1615	*lola*	overexpression	$\alpha=5.1x10^{-5}$ n=242
	UY2056	*CG14351*	loss of function	$\alpha=1.3x10^{-12}$ n=242
	UY2220	*comm-3*	loss of function	$\alpha=6.3x10^{-6}$ n=250
	UY2510	*comm*	loss of function	$\alpha=7.2x10^{-5}$ n=217
	UY2564	*CG6934/CG6912*	loss of function	$\alpha=6.6x10^{-4}$ n=229
	UY2669	*scratch*	overexpression	$\alpha<10^{-15}$ n=241
	UY4001	*clic*	loss of function	$\alpha<10^{-15}$ n=306
complex phenotype	**UY2111**	*bin-3*	overexpression	na
	UY2625	*heph/CG2003*	loss of function	na
No significant effect	**UY1131**	*brat*	loss of function	$\alpha=0.027$ n=216
	UY2106	*CG8036*	overexpression	$\alpha=0.027$ n=206
	UY3010	*Uba1*	overexpression	$\alpha=0.002$ n=247
	UY3045	*sugarless*	overexpression	$\alpha=0.512$ n=243

Table 3: Effect of Bax suppressors on *debcl*-induced phenotypes

hypothesis, we tested whether RNAi against *Gpo-1* or heterozygosity for a *Gpo-1* hypomorph (*Gpo-1*^{291}) or an amorph (*Gpo1*^{n322}*)* allele, could suppress *Debcl* overexpression-induced wing phenotype. Both RNAi and both Gpo LOF heterezogous alleles suppressed debcl-induced phenotypes but the most complete and fully penetrant suppression was observed in flies heterozygous for the *Gpo1*^{n322} mutation (Figure 2). Therefore, we decided to assess the apoptosis level in wing imaginal discs of flies heterozygous for *Gpo1*^{n322}. The number of TUNEL positive cells in wing discs overexpressing *debcl* was dramatically reduced by *Gpo1*^{n322} heterozygosity when compared to discs that are not mutated in *Gpo1* (Figure 3A-E), thus confirming that a reduction of *Gpo-1* dosage suppresses *debcl*-induced apoptosis.

Gpo-1 [EC 1.1.5.3], also known as glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is encoded by a nuclear gene and located at the outer surface of the inner mitochondrial membrane. It catalyzes the reaction:

sn-glycerol 3-phosphate + coenzyme Q10 -> glycerone phosphate + reduced coenzyme Q10

Along with the cytosolic NAD-linked glycerol phosphate dehydrogenase (GPDH), Gpo-1 forms the glycerol phosphate shuttle that catalyzes the interconversion of glycerol phosphate and dihydroxyacetone phosphate to oxidize cytosolic NADH by transferring reducing equivalents from the cytosol to mitochondria. Cytosolic GPDH has been shown to protect mammalian CHO cells against ROS-induced apoptosis [38]. On the opposite, mitochondrial Gpo-1 has been involved in superoxide production in various species (review: [39]) including *Drosophila* [40], which is in agreement with a protective role of a dosage reduction of this gene. Furthermore, we have observed that *debcl* overexpression can induce ROS accumulation thanks to a mitochondrial superoxyde indicator, *i.e.* MitoSOX. Indeed, *debcl* overexpression increases the proportion of MitoSOX positive cells in the wing imaginal discs compared to the *ptc-gal4/+* control (Figure 3F). Thus, we decided to test whether heterozygosity for the *Gpo-1 null* mutant could decrease ROS levels produced by *debcl* overexpression. A significant decrease of MitoSOX positive cells was observed when *debcl* was overexpressed in a *Gpo1*^{n322} heterozygous background when compared to Gpo1$^{+/+}$ background (Figure 3F). This result indicates that *Gpo-1* participates in *debcl*-induced apoptosis by increasing ROS production.

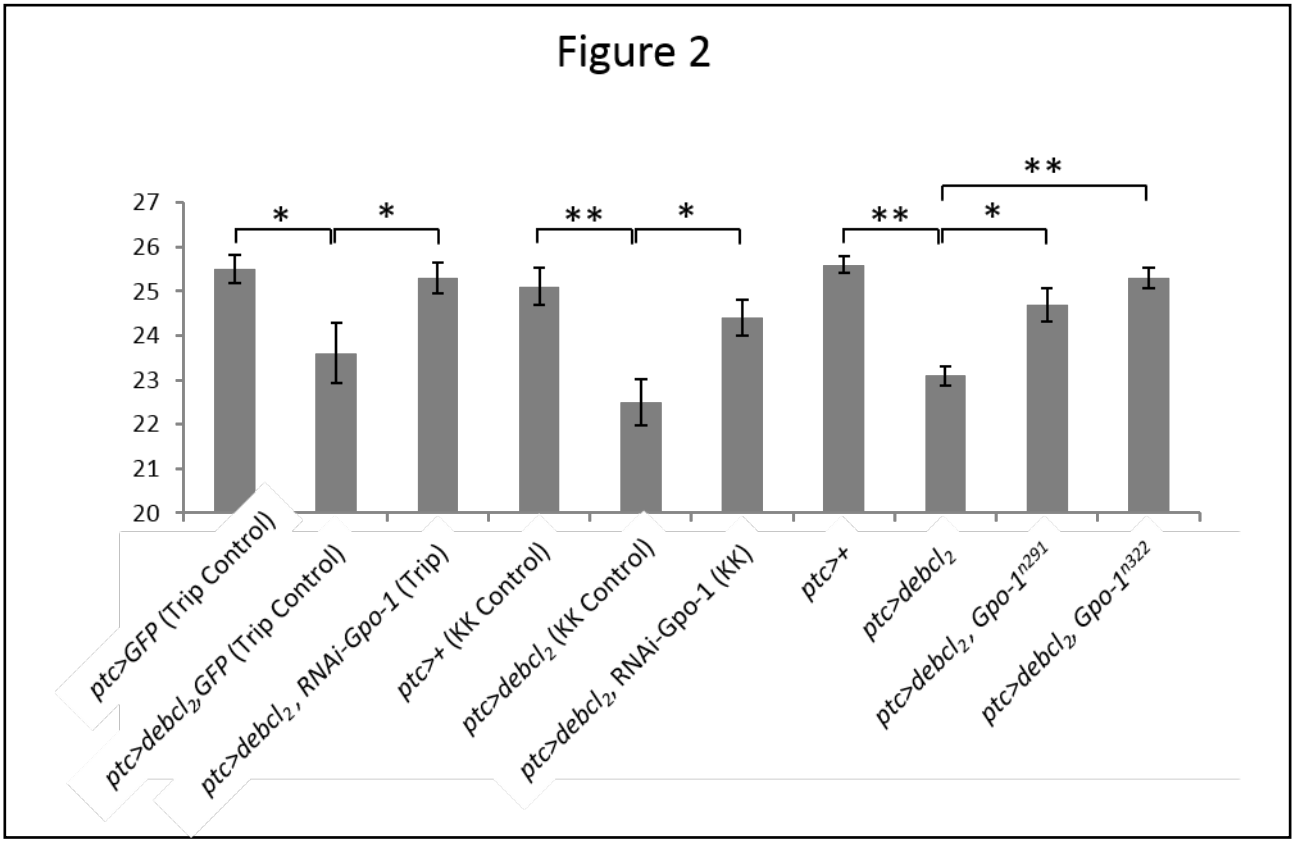


Figure 2. – *Gpo-1* loss of function suppresses *debcl*-induced phenotypes
Measure of relative distance between L3 and L4 veins in wings from *ptc>GFP* (Trip Control); *ptc>debcl$_2$,GFP* (Trip Control); *ptc>debcl$_2$,RNAi-Gpo1* (Trip); *ptc>+* (KK Control*)*; *ptc>debcl$_2$* (KK Control); *ptc>debcl$_2$, RNAi-Gpo-1* (KK); *ptc>+*; *ptc>debcl$_2$*; *ptc>debcl$_2$,Gpo1^{291}* and *ptc>debcl$_2$,Gpo1^{n322}*.
Error bars are the S.E.M. *: Student's t test $\alpha<0.05$. **: Student's t test $\alpha<0.01$.

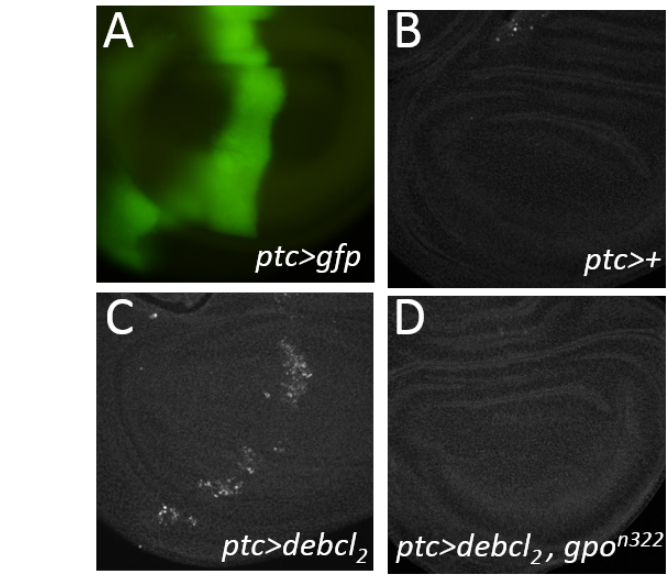
Discussion

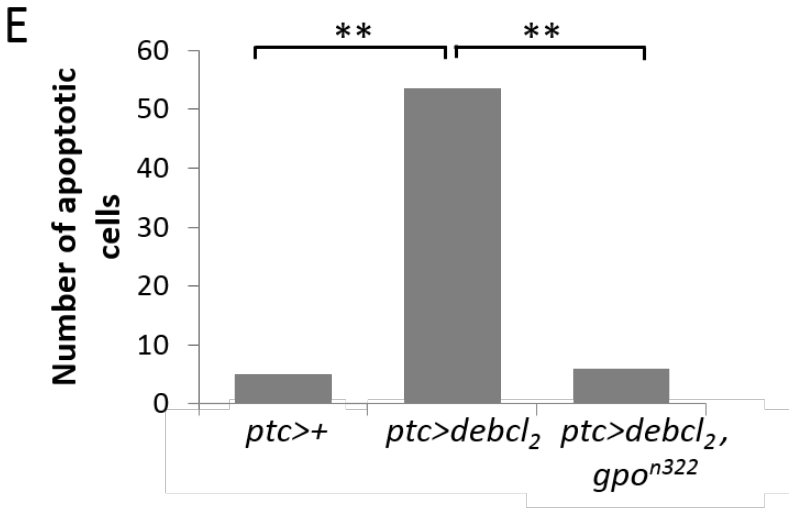
This screen provides us with 17 suppressors of phenotypes induced by the expression of *bax* under control of the wing specific *vg-GAL4* driver (lethality and wing notches). We cannot exclude the possibility that these suppressors affect GAL4 synthesis or that the selected insertions titrate the GAL4 transcription factor. However, this seems unlikely since our number of suppressors is limited (1.6% of the collection). Moreover, we isolated *UYi* insertions which were not identified in other screens performed using the same collection [28, 34, 35]. Finally, we have recently reported the specificity of one of the suppressors, *UY3010*, which corresponds to a gain-of-function of the Ubiquitin activating enzyme encoding gene *Uba1*. It is directly involved in the control of Bax and Debcl levels, thanks to the activation of Bax and Debcl degradation by the ubiquitin/proteasome pathway [37]. We also showed in this study that Debcl is targeted to the proteasome by the β-TrCP homologue Slimb [37].

We found that 9 of the bax-modifiers also behaved as suppressors of *debcl*-induced wing phenotype while 4 showed no significant effect on this phenotype. One possible explanation for this discrepancy involves the difference in the driver used in each assay (*vg-GAL versus ptc-GAL*). Indeed, *UY3010* did not significantly suppress *debcl*-induced apoptosis while another *Uba1* overexpression mutant ($Uba1^{EP2375}$) did [37]. Alternatively, although Bax and Debcl, share similarities in their mode of action and regulation, some signaling pathways could be specific of *bax*-induced apoptosis. Indeed, a LOF of *brat* mitigates neither *debcl*- (this paper) nor *hid*- or *Sca3*-induced cell death [41].

The *brat* gene belongs to a group of suppressors which is implicated in cell growth, proliferation or death. Mutations in this type of genes could compensate cell loss due to ectopic apoptosis induction. Results observed for this group of modifiers can generally be easily interpreted with the literature data. *UY1131* corresponds to an insertion in the *brat* (for *brain tumor*) gene that could allow the expression of a truncated form of the protein. To check whether this insertion leads to a LOF or a GOF of *brat*, we tested the effect of the characterized LOF allele $brat^{k0602}$ on *bax*-induced phenotypes. This mutation strongly suppressed ($\alpha=7.3x10^{-7}$) the wing phenotype showing that *UY1131* is a LOF of *brat* (data not shown). Brat belongs to the NHL family of proteins, represses translation of specific mRNAs [42] and is a negative regulator of cell growth [43-45]. The suppression of *bax*-induced phenotypes by a LOF of *brat* suggests that this gene also regulates cell death, which seems unlikely according to its inability to suppress other cell death pathways [41]. Alternatively *brat* could regulate somehow compensatory proliferation in this system.

Figure 3





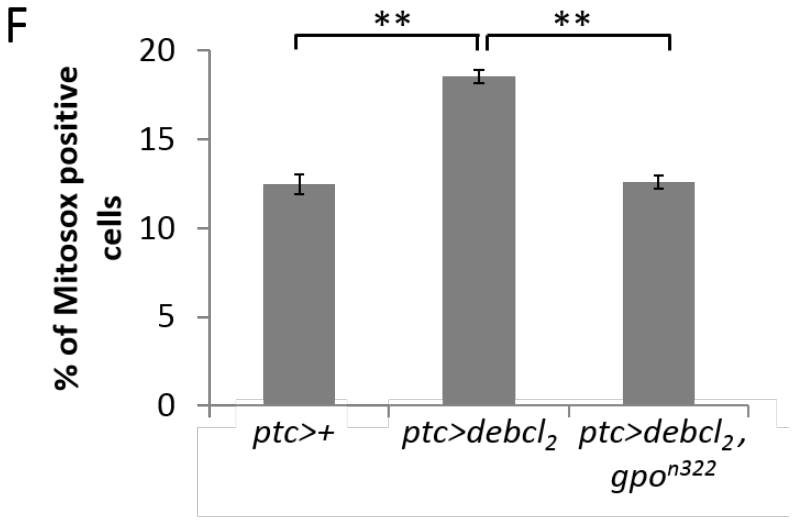


Figure 3. – *Gpo-1* loss of function suppresses *debcl*-induced apoptosis by limiting mitochondrial ROS accumulation.

(A) *ptc* expression domain visualized by GFP fluorescence in a wing imaginal disc.

(B-D) TUNEL staining of wing imaginal discs from *ptc>+*; *ptc>debcl*$_2$; and *ptc>debcl*$_2$,*Gpo1*^{n322} wing imaginal discs.

(E) Quantification of TUNEL positive cells of wing imaginal discs.

(F) Quantification by flow cytometry of MitoSOX staining in larval wing imaginal discs.

Error bars are the S.E.M. **: Student's t test $\alpha<0.01$.

Some candidate suppressors encode proteins involved in secretion or components of the extra-cellular matrix. The effect of these genes could rely on cell signaling. Change in levels of secreted proteins could modify cell-extracellular matrix interactions and thus affect viability *via* processes similar to anoikis.

Several suppressors are implicated in pathfinding (*comm*, *comm3*, *scratch* and *lola*). Two hypotheses can be formulated. Either neurons are of particular importance in *bax*-induced phenotypes or a more general role of these proteins in signaling is responsible for these suppressions. If the neuronal death could explain the decreased survival of *bax* expressing flies, it could hardly explain the wing phenotypes. Therefore, these suppressor genes may have a more general role in signaling and in particular in cell death regulation. For example, *UY2669* corresponds to a GOF mutant of *scratch* (*scrt*). This gene is a *Drosophila* homologue of *C. elegans ces-1*, which encodes a snail family zinc finger protein involved in controlling programmed death of specific neurons [46]. Interestingly, a mammalian homologue of *scratch*, named *Slug*, is involved in a survival pathway that protects hematopoietic progenitors from apoptosis after DNA damage [47]. *Slug* also antagonizes p53-mediated apoptosis by repressing the *bcl-2*-family pro-apoptotic gene *puma* [48]. More recently, a regulatory loop linking p53/Puma with Scratch has been described in the vertebrate nervous system, not only controlling cell death in response to damage but also during normal embryonic development [49].

Another possibility is that some extracellular survival and/or death factors could be affected by these modifiers. For example, *sugarless,* which was found twice in the screen, has been shown to interact with several survival pathways such as Wingless, EGF and FGF pathways that can play a role in defining shape and size of tissues and organs. This result can be paralleled with the suppressive effect of mutations in *hephaestus* and *lola*, both of which interact with the Notch/Delta signaling. Notably, *lola,* a gene encoding a Polycomb group epigenetic silencer, has been shown to be required for programmed cell death in the *Drosophila* ovary [50]. Lola has also been identified for its role in normal phagocytosis of bacteria in *Drosophila* S2 cells and as a component of the *Drosophila* Imd pathway that is key to immunity [51]. In contrast, Lola is required for axon growth and guidance in the *Drosophila* embryo [52]. This indicates that *lola* could play a role in cell adhesion and motility. Accordingly, when coupled with overexpression of *Delta*, misregulation of *pipsqueak* and *lola* induces the formation of metastatic tumors associated with a downregulation of the *Rbf* (*Retinoblastoma-family*) gene [53].

Other identified genes are involved in carbohydrate metabolism (*Gpo-1* and *CG8036* described as a transketolase). This result is in agreement with the evidence that Bcl-2 family proteins, in addition to their well characterized function in cell death, also play roles in metabolic processes in particular at the level of energetic metabolism (reviewed in [54]). In particular, Bcl-2 regulates mitochondrial respiration and the level of different ROS through a control of cytochrome c oxidase activity [55]. Study of heterologous *bax* expression in yeast has provided clues on Bax function in relation to ROS (reviewed in [56, 57]) and yeast LOF mutants of genes involved in oxidative phosphorylation show increased sensitivity to Bax cytotoxicity [58]. In agreement, Bcl-xL complements *Saccharomyces cerevisiae* genes that facilitate the switch from glycolytic to oxidative metabolism [59]. Furthermore, both the anti-apoptotic effect of LOF mutations in *Gpo-1* and the GOF in transketolase genes can be related to a protective effect against oxidative stress. This result suggests that the cell death process induced by Bax involves, at least in part, the modulation of different ROS levels.

Indeed, we report here that the suppressor effect of a null allele of *Gpo-1* is associated with a decreased ability of Debcl to induce ROS production. This result is in agreement with the observation that 70% of the total cellular H_2O_2 production was estimated to stem from Gpo-1 in isolated *Drosophila* mitochondria [40]. This enzyme has also been implicated in ROS production in mammalian brown adipose tissue mitochondria when glycerol-3-phosphate was used as the respiratory substrate [60] and, more recently, in prostate cancer cells [61]. In this latter case, ROS production seems to be beneficial to cancer cells, whereas we show here that it favors cell death in *Drosophila* wing disc cells. This apparent contradiction could be related to the abnormal ROS production occurring during the oncogenic transformation and the shift to a glycolytic metabolism.

In conclusion, this study shows that Bax and Debcl killing activities can be modulated by common metabolic or signaling pathways, thus suggesting that these proteins share similarities in their mode of action and/or regulation. Furthermore, these data provide a substantial resource that will aid our efforts to understand the regulation of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family proteins.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité des Yvelines). Jessie Colin, Cécile Milet and Amandine Clavier held a support from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Jessie Colin, Julie Garibal,

Cécile Milet and Amandine Clavier were supported by the Ecole Pratique des Hautes Etudes. We thank Laurent Théodore, Helena Richardson and the Bloomington *Drosophila* stock center for providing *Drosophila* strains. We thank François Juge and Martine Simonelig for precious informations about the *UY1131* strain and Magali Lecourtois for *P[UY1615]* localization.

References

1. Wang C and Youle RJ. The Role of Mitochondria in Apoptosis. Annu Rev Genet. 2009; 43:95-118.
2. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B and Vallette FM. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. Apoptosis. 2007; 12(5):887-896.
3. Yan N, Chai J, Lee ES, Gu L, Liu Q, He J, Wu JW, Kokel D, Li H, Hao Q, Xue D and Shi Y. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2005; 437(7060):831-837.
4. Tan FJ, Fire AZ and Hill RB. Regulation of apoptosis by C. elegans CED-9 in the absence of the C-terminal transmembrane domain. Cell Death Differ. 2007; 14(11):1925-1935.
5. Colin J, Garibal J, Mignotte B and Guenal I. The mitochondrial TOM complex modulates bax-induced apoptosis in Drosophila. Biochemical and biophysical research communications. 2009; 379(4):939-943.
6. Krieser RJ and White K. Inside an enigma: do mitochondria contribute to cell death in Drosophila? Apoptosis. 2009; 14(8):961-968.
7. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL and Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. Adv Exp Med Biol. 2012; 942:157-183.
8. Dorstyn L and Kumar S. A cytochrome c-free fly apoptosome. Cell Death Differ. 2006; 13(7):1049-1051.
9. Pang Y, Bai XC, Yan C, Hao Q, Chen Z, Wang JW, Scheres SH and Shi Y. Structure of the apoptosome: mechanistic insights into activation of an initiator caspase from Drosophila. Genes Dev. 2015; 29(3):277-287.
10. Claveria C, Caminero E, Martinez AC, Campuzano S and Torres M. GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. Embo J. 2002; 21(13):3327-3336.
11. Olson MR, Holley CL, Gan EC, Colon-Ramos DA, Kaplan B and Kornbluth S. A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. J Biol Chem. 2003; 278(45):44758-44768. .
12. Freel CD, Richardson DA, Thomenius MJ, Gan EC, Horn SR, Olson MR and Kornbluth S. Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. J Biol Chem. 2008; 283(1):367-379.
13. Sandu C, Ryoo HD and Steller H. Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. The Journal of cell biology. 2010; 190(6):1039-1052.
14. Quinn L, Coombe KM, Tasman D, Colussi P, Kumar S and Richardson H. Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. EMBO J. 2003; 22(14):3568-3579.
15. Sevrioukov EA, Burr J, Huang EW, Assi HH, Monserrate JP, Purves DC, Wu JN, Song EJ and Brachmann CB. Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. Genesis. 2007; 45(4):184-193.

16. Senoo-Matsuda N, Igaki T and Miura M. Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in Drosophila. Embo J. 2005; 24(14):2700-2713.
17. Wu JN, Nguyen N, Aghazarian M, Tan Y, Sevrioukov EA, Mabuchi M, Tang W, Monserrate JP, White K and Brachmann CB. grim promotes programmed cell death of Drosophila microchaete glial cells. Mechanisms of development. 2010; 127(9-12):407-417.
18. Tanner EA, Blute TA, Brachmann CB and McCall K. Bcl-2 proteins and autophagy regulate mitochondrial dynamics during programmed cell death in the Drosophila ovary. Development. 2011; 138(2):327-338.
19. Yacobi-Sharon K, Namdar Y and Arama E. Alternative germ cell death pathway in Drosophila involves HtrA2/Omi, lysosomes, and a caspase-9 counterpart. Developmental cell. 2013; 25(1):29-42.
20. Colussi PA, Quinn LM, Huang DC, Coombe M, Read SH, Richardson H and Kumar S. Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. J Cell Biol. 2000; 148(4):703-714.
21. Igaki T, Kanuka H, Inohara N, Sawamoto K, Nunez G, Okano H and Miura M. Drob-1, a *Drosophila* member of the bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(2):662-667.
22. Brachmann CB, Jassim OW, Wachsmuth BD and Cagan RL. The *Drosophila bcl-2* family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. Curr Biol. 2000; 10(9):547-550.
23. Zhang H, Huang Q, Ke N, Matsuyama S, Hammock B, Godzik A and Reed JC. *Drosophila* pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. J Biol Chem. 2000; 275(35):27303-27306.
24. Galindo KA, Lu WJ, Park JH and Abrams JM. The Bax/Bak ortholog in Drosophila, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. Development. 2009; 136(2):275-283.
25. Gaumer S, Guenal I, Brun S, Theodore L and Mignotte B. Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in Drosophila. Cell Death and Differentiation. 2000; 7(9):804-814.
26. Brun S, Rincheval V, Gaumer S, Mignotte B and Guenal I. reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila. Oncogene. 2002; 21(42):6458-6470.
27. Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK and Engels WR. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila*. Genetics. 1988; 118(3):461-470.
28. Monnier V, Girardot F, Cheret C, Andres O and Tricoire H. Modulation of oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* by gene overexpression. Genesis. 2002; 34(1-2):76-79.
29. Davies LP, Macintyre G and Cox DW. New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: implications for molecular testing. Genet Test. 2008; 12(1):139-145.
30. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics. 1945; 1:80-83.
31. Milet C, Rincheval-Arnold A, Morieras A, Clavier A, Garrigue A, Mignotte B and Guenal I. Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis. PLoS One. 2014; 9(8):e102902.
32. Clavier A, Baillet A, Rincheval-Arnold A, Coleno-Costes A, Lasbleiz C, Mignotte B and Guenal I. The pro-apoptotic activity of Drosophila Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA. Cell Death Dis. 2014; 5:e1405.
33. Bergeaud M, Mathieu L, Guillaume A, Moll UM, Mignotte B, Le Floch N, Vayssiere JL and Rincheval V. Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of

cell respiration and interacts with the mitochondrial F1F0-ATP synthase. Cell Cycle. 2013; 12(17):2781-2793.
34. Nicolai M, Lasbleiz C and Dura JM. Gain-of-function screen identifies a role of the Src64 oncogene in Drosophila mushroom body development. J Neurobiol. 2003; 57(3):291-302.
35. Raisin S, Pantalacci S, Breittmayer JP and Leopold P. A new genetic locus controlling growth and proliferation in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 2003; 164(3):1015-1025.
36. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000; 287(5461):2185-2195.
37. Colin J, Garibal J, Clavier A, Rincheval-Arnold A, Gaumer S, Mignotte B and Guenal I. The drosophila Bcl-2 family protein Debcl is targeted to the proteasome by the beta-TrCP homologue slimb. Apoptosis. 2014; 19(10):1444-1456.
38. Jeong DW, Kim TS, Cho IT and Kim IY. Modification of glycolysis affects cell sensitivity to apoptosis induced by oxidative stress and mediated by mitochondria. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313(4):984-991.
39. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? Adv Exp Med Biol. 2012; 942:93-136.
40. Miwa S, St-Pierre J, Partridge L and Brand MD. Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria. Free Radic Biol Med. 2003; 35(8):938-948.
41. Bilen J and Bonini NM. Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in Drosophila. PLoS Genet. 2007; 3(10):1950-1964.
42. Sonoda J and Wharton RP. Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. Genes Dev. 2001; 15(6):762-773.
43. Bello B, Reichert H and Hirth F. The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of Drosophila. Development. 2006; 133(14):2639-2648.
44. Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP and Doe CQ. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. Dev Cell. 2006; 10(4):441-449.
45. Ferreira A, Boulan L, Perez L and Milan M. Mei-P26 Mediates Tissue-Specific Responses to the Brat Tumor Suppressor and the dMyc Proto-Oncogene in Drosophila. Genetics. 2014.
46. Metzstein MM and Horvitz HR. The C. elegans cell death specification gene ces-1 encodes a snail family zinc finger protein. Mol Cell. 1999; 4(3):309-319.
47. Inoue A, Seidel MG, Wu W, Kamizono S, Ferrando AA, Bronson RT, Iwasaki H, Akashi K, Morimoto A, Hitzler JK, Pestina TI, Jackson CW, Tanaka R, Chong MJ, McKinnon PJ, Inukai T, et al. Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. Cancer Cell. 2002; 2(4):279-288.
48. Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM and Look AT. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. Cell. 2005; 123(4):641-653.
49. Rodriguez-Aznar E and Nieto MA. Repression of Puma by Scratch2 is required for neuronal survival during embryonic development. Cell death and differentiation. 2011.
50. Bass BP, Cullen K and McCall K. The axon guidance gene lola is required for programmed cell death in the Drosophila ovary. Dev Biol. 2007; 304(2):771-785.
51. Kleino A, Valanne S, Ulvila J, Kallio J, Myllymaki H, Enwald H, Stoven S, Poidevin M, Ueda R, Hultmark D, Lemaitre B and Ramet M. Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-

binding protein are components of the Drosophila Imd pathway. Embo J. 2005; 24(19):3423-3434.
52. Crowner D, Madden K, Goeke S and Giniger E. Lola regulates midline crossing of CNS axons in Drosophila. Development. 2002; 129(6):1317-1325.
53. Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ and Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. Nature. 2006; 439(7075):430-436.
54. Majors BS, Betenbaugh MJ and Chiang GG. Links between metabolism and apoptosis in mammalian cells: applications for anti-apoptosis engineering. Metab Eng. 2007; 9(4):317-326.
55. Chen ZX and Pervaiz S. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. Cell Death Differ. 2009:doi: 10.1038/cdd.2009.1132.
56. Fleury C, Mignotte B and Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie. 2002; 84(2-3):131-141.
57. Manon S. Utilization of yeast to investigate the role of lipid oxidation in cell death. Antioxid Redox Signal. 2004; 6(2):259-267.
58. Harris MH, Vander Heiden MG, Kron SJ and Thompson CB. Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. Mol Cell Biol. 2000; 20(10):3590-3596.
59. Vander Heiden MG, Choy JS, VanderWeele DJ, Brace JL, Harris MH, Bauer DE, Prange B, Kron SJ, Thompson CB and Rudin CM. Bcl-x(L) complements Saccharomyces cerevisiae genes that facilitate the switch from glycolytic to oxidative metabolism. J Biol Chem. 2002; 277(47):44870-44876.
60. Sekhar BS, Kurup CK and Ramasarma T. Generation of hydrogen peroxide by brown adipose tissue mitochondria. J Bioenerg Biomembr. 1987; 19(4):397-407.
61. Singh G. Mitochondrial FAD-linked Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase: A Target for Cancer Therapeutics. Pharmaceuticals (Basel). 2014; 7(2):192-206.

L'inactivation du gène de susceptibilité au rétinoblastome (*rb*) est une étape préalable au développement de nombreux cancers. De façon cohérente avec son rôle de suppresseur de tumeur, pRb inhibe la prolifération cellulaire. Le rôle de pRb dans le contrôle de l'apoptose est plus complexe et les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces fonctions sont peu décrits.

La drosophile possède un homologue de *rb*, appelé *rbf1*. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé la voie d'apoptose induite par Rbf1 dans un tissu prolifératif. J'ai pu montrer que Rbf1 coopère avec le facteur de transcription dE2F2 et le complexe dREAM pour stimuler la transcription du gène *how* codant pour une protéine de liaison aux ARN capable d'induire la dégradation des transcrits de l'inhibiteur de caspases *diap1*. Par ailleurs, ces protéines répriment la transcription du gène *buffy* (gène anti-apoptotique de la famille Bcl-2) et ainsi déclenchent une voie de mort mitochondriale dépendante de *debcl* (gène pro-apoptotique de la famille Bcl-2). La fragmentation du réseau mitochondrial, dépendante de la protéine pro-fission Drp1, favorise l'accumulation d'espèces activées de l'oxygène, à l'origine de l'activation de la voie JNK et *in fine* de l'apoptose. Ces travaux précisent le mode d'action des protéines de la famille Bcl-2 de drosophile. Ils apportent de nouvelles données concernant le rôle pro-apoptotique de Rbf1 et devraient permettre de mieux comprendre l'activité suppresseur de tumeur de pRb. Enfin, j'ai pu montrer que l'apoptose induite par Rbf1 conduit à un mécanisme de prolifération compensatoire et caractériser pour la première fois des acteurs spécifiques de la voie JNK impliqués dans ce mécanisme.

Mots clés : Rbf1, apoptose, prolifération compensatoire, mitochondrie, JNK, Debcl, complexe dREAM, Drp1

The inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene (*rb*) is a preliminary step in the development of many cancers. Consistent with its role of tumor suppressor, pRb inhibits cell proliferation. The role of pRb in apoptosis control is more complex and the molecular mechanisms underlying these functions are poorly described.

rbf1 is the *rb* Drosophila homologue. During my PhD, I characterized the apoptosis pathway induced by Rbf1 in a proliferative tissue. I showed that Rbf1 cooperates with the dE2F2 transcription factor and with the dREAM complex to stimulate the transcription of *how* gene coding for a RNA binding protein able to induce the degradation of *diap1* caspase inhibitor transcripts. Furthermore, Rbf1/dE2F2 proteins repress the transcription of *buffy* (anti-apoptotic gene of Bcl-2 family) and thus trigger a mitochondrial death pathway dependent of *debcl* (pro-apoptotic gene of Bcl-2 family). A mitochondrial fragmentation dependent of the Drp1 pro-fission protein promotes the accumulation of reactive oxygen species, which in turn causes JNK pathway activation, leading ultimately to apoptosis. This work clarifies the mechanism of action of Bcl-2 proteins in drosophila. It brings new data about Rbf1 pro-apoptotic function and should provide a better understanding of pRb tumor suppressor activity. Finally, I showed that Rbf1-induced apoptosis leads to compensatory proliferation and defined for the first time specific actors of the JNK pathway involved in this proliferation.

Key words : Rbf1, apoptosis, compensatory proliferation, mitochondria, JNK, Debcl, dREAM complex, Drp1