



Étude de dilp8, une hormone de couplage de la croissance tissulaire

Émilie Boone

► To cite this version:

Émilie Boone. Étude de dilp8, une hormone de couplage de la croissance tissulaire. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4026 . tel-01424188

HAL Id: tel-01424188

<https://theses.hal.science/tel-01424188>

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

Université de Nice Sophia-Antipolis
UFR Sciences

Thèse

Présentée pour obtenir le titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-
ANTIPOLIS**

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue par

BOONE Emilie

CNRS UMR 7277 / INSERM U1091

Institut Biologie Valrose

**Etude de *dilp8*, une hormone de couplage de la croissance
tissulaire**

Thèse dirigée par Pierre Leopold

Co-direction par Julien Colombani

Soutenue le 10 juin 2016 devant le jury composé de :

Prof. Thomas Lamonerie

Président de jury

Dr Nicolas Tapon

Rapporteur

Dr Yohanns Bellaïche

Rapporteur

Dr Cédric Polesello

Examineur

Dr Julien Colombani

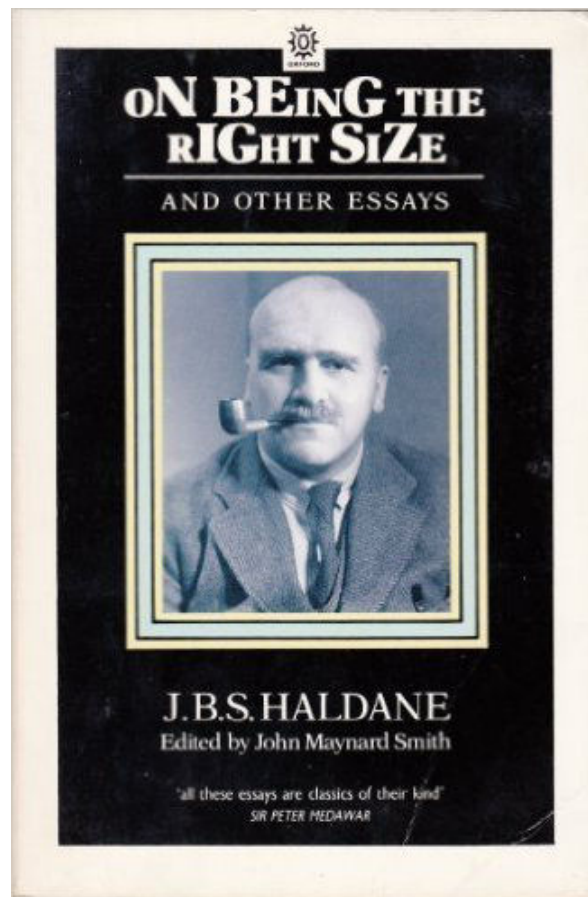
Co-directeur de thèse

Dr Pierre Leopold

Directeur de thèse

“The most obvious differences between different animals are differences of size, but for some reason the zoologists have paid singularly little attention to them.”

—J. B. S. Haldane, *On Being the Right Size*, 1927



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mes rapporteurs Nic Tapon et Yohanns Bellaïche pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que les membres du jury, Cédric Polésello et le président du jury Thomas Lamonerie.

Je tiens ensuite à remercier l'équipe de Pierre pour m'avoir soutenu tout au long de ces quatre années de thèse. En particulier, Laura et Alessandra, mes fidèles comparses, toujours présentes même lors des coups durs !!!! Un véritable soutien à tout épreuve. Cécile et Eleonore, mes alliées thésardes, c'était un plaisir de pouvoir échanger avec vous sur la dure vie de thésarde. Nath et Marianne pour votre bonne humeur, et votre support. Merci à Gisèle et Laurence, vous êtes des amours, toujours remplies de bonne volonté. Merci à Renald mon presque voisin de paillasse, pour m'avoir souvent aidé à relativiser dans les moments de panique et à décrypter le langage obscur de mon chef Jedi. Je remercie toute la communauté des drosophilistes pour nos échanges fructueux au cours des différents meetings auxquels j'ai pu participer.

Bien évidemment, merci à mon chef Jedi Julien et à sa doudou, Ditte. Ils ont accepté la lourde tâche de former un jeune padawan (enfin pas si jeune que ça). Vous m'avez permis de m'épanouir dans un projet fabuleux, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Et même si parfois ces deux brillants chefs sont des TGV difficiles à suivre, c'était un véritable bonheur que de pouvoir évoluer dans votre microcosme.

Pour garder le tableau fidèle à la réalité, il faut néanmoins reconnaître que j'ai parfois tenté d'éliminer mon chef. Pour ce faire, j'ai utilisé divers moyens, allant du « lancer de morgue remplie de mouches » à la « voiture bélier ». Mais comme on dit, qui aime bien, châtie bien ! Encore un grand merci à Papa Julien et Maman Ditte !!!

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont permis de prendre la décision de faire une thèse. Mes deux précédents chefs de Master Florence et Amandine, vous m'avez donné goût à la science et à la recherche et surtout vous m'avez aidé à prendre confiance en moi. Un immense merci !!!

Merci à Charles qui m'a un jour dit sur le bateau de plongée « Marinette, je connais une super équipe, celle de Pierre Léopold. Un couple de talentueux chercheurs Julien et Ditte propose un projet en or. Si tu dois faire une thèse, c'est sans hésitation l'équipe où il faut aller ». Sur tes conseils, j'ai frappé à la porte de Pierre et postulé pour ce poste. Merci à toi !

Et bien sûr, un immense merci à papi Pierre !!! Je me souviens d'avoir passé un entretien pour le poste de thésarde, la peur au ventre sans imaginer ô combien humain tu étais. Le courant est passé immédiatement et bien qu'impressionné par le personnage, j'ai vite compris que j'avais tout intérêt à rentrer dans tes troupes. Tu as su être extrêmement compréhensif lorsque des difficultés personnelles ont affecté mon moral. Je n'oublierai jamais ton écoute et ton soutien. Tu es un chef exceptionnel et j'ai eu une chance énorme de pouvoir évoluer dans ton aura !!!

Je dois ensuite remercier l'alphabet. N'est ce pas Cortex ! A la reprise de mes études, les joies de l'alphabet m'ont permis de rencontrer ma chère binômette. Après une phase d'observation, où cette jeune étudiante, inquiète, s'est demandée sur quel étrange spécimen elle avait bien pu tomber ... Cortex et Minus, le binôme de choc inséparable était formé. Je ne serais jamais allé aussi loin sans toi. Tes excellentes capacités à l'écrit et ton organisation hors pair complétée par mes talents de couturière à la paillasse (Cf notre ami le rat), nous ont permis de réaliser des miracles. Même si nous avons souvent passé nos examens au talent, je suis certaine que c'est notre complicité qui nous a permis de faire des miracles !

Un grand merci à ma famille, mon papounet d'amour, ma Sophie et Super Nanette. Merci à mon papounet de m'avoir supporter dans ce choix tardif de reprise d'études !
Merci à mon lapinouche d'amour, tu es un être exceptionnel et j'ai énormément de chance de te voir grandir et t'épanouir.
Merci à mon Tithom, le roi de l'orthographe, pour ce petit glaçon qui grandit en moi.

Abréviations

CIP : inhibition de la prolifération par contact
Ds : Dachsous
Dsx : Double sex
EcR : Ecdysone receptor
Ex : Expanded
FOXO : famille des facteurs de transcription forkhead
Fru : Fruitless
Ft : Fat
GCL : growth coordinating Lgr3
Hpo : Hippo
IGF : facteur de croissance de type insuline
IIS : insulin/insulin like growth factor signaling
Lgr3 : Leucine rich repeat containing G-protein couple receptor 3
LRC : Ligand Recepteur Capteur
MAPK : mitogen-activated proteine kinase
Mats : Mob as tumor suppressor
MED : Medea
Mer : Merlin
Msn : Misshappen
PDK : Phosphoinositide dependent kinase 1
PI3K : phosphoisositide-3-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate,
PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB : proteine kinase B
Puc : Puckered
RTK : Récepteur tyrosine kinase
Sd : Scalloped
SHN : Schnurri
SNC : Système Nerveux Central
TGP : Phase terminale de croissance
Warts : Wts
YAP : Yes associated protein
Yki : Yorkie

Résumé

Au cours du développement, les organismes croissent de façon harmonieuse suivant un programme génétique intrinsèque et en adaptation avec les conditions environnementales. Chaque tissu atteint une taille cible qui est proportionnelle à la taille finale des autres organes et à celle de l'organisme. Des expériences de régénération tissulaire effectuées sur différents modèles animaux ont révélé que chaque organe possède un programme autonome de croissance. Ainsi, des mécanismes de coordination entre la croissance tissulaire et le programme de développement sont nécessaires afin d'assurer une régulation fine de l'allométrie avant le passage du stade juvénile au stade adulte fixant la taille finale du corps.

Dilp8 (Drosophila Insulin Like Peptide 8) est une hormone analogue aux peptides de la famille des insulines/relaxines récemment identifiée au laboratoire. Elle est produite par les tissus dont la croissance est lésée, en régénération ou néoplasique. *dilp8* inhibe la production d'hormone stéroïde (ecdysone) et retarde ainsi le passage à la forme adulte (métamorphose). Les mutants *dilp8* présentent une augmentation du bruit développemental qui se traduit par une perte de la symétrie bilatérale des organes (asymétrie fluctuante). Ceci suggère un rôle de *dilp8* dans la coordination de la croissance entre les organes au cours du développement.

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer que la voie de signalisation Hippo, son activateur transcriptionnel Yorkie et son co-partenaire Scalloped régulent directement les niveaux transcriptionnels de *dilp8* via un Hippo Responsive Elements (HRE) présent dans le promoteur de *dilp8*. La voie de signalisation Hippo joue un rôle clé dans le contrôle de la taille des organes en couplant les paramètres biomécaniques des tissus (densité cellulaire, contraintes physiques et pressions induites par la croissance) avec la capacité de prolifération cellulaire. Les expériences de génétique que j'ai réalisées indiquent que la délétion du HRE présent dans le promoteur de *dilp8* suffit à induire une asymétrie fluctuante. Ces résultats démontrent qu'un couplage étroit, entre la voie de signalisation Hippo et l'expression de *dilp8*, est requis pour le contrôle de la stabilité développementale.

Avant propos

Les organismes croissent de manière harmonieuse et chaque organe ou tissu atteint une taille finale en proportion avec le reste du corps. Cependant, des expériences de régénération et de transplantation effectuées sur différents modèles animaux montrent que les organes possèdent un programme autonome de croissance. On connaît très peu de chose concernant les mécanismes senseurs qui induisent un arrêt de croissance lorsque la taille finale d'un organe est atteinte. Une particularité commune à la croissance tissulaire et aux processus de régénération tissulaire est l'existence dans les deux cas, d'un couplage avec le programme de développement de l'organisme. Ceci a pour effet de prévenir le passage du stade de croissance juvénile au stade adulte tant que les différents tissus n'ont pas atteint leur taille cible. Ce couplage est essentiel pour la conservation des proportions entre les différentes parties de l'organisme.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à étudier différentes questions biologiques telles que « Comment les organes ressentent ils leurs tailles finales ? » « Comment la croissance des organes est elle coordonnée ? » « Quels sont les mécanismes coordonnant croissance des organes et horloge développementale ? »

Au cours de mon introduction, je présenterai tout d'abord les grands principes de la croissance. Puis, je développerai mon modèle d'étude, la drosophile, connu pour la richesse de ses outils génétiques.

Ensuite, je détaillerai les mécanismes systémiques contrôlant la croissance larvaire, en me focalisant sur les croissances extrinsèques et intrinsèques. La croissance extrinsèque, dépendante des conditions de nutrition, est contrôlée par voie de l'insuline. La voie de signalisation insuline/IGF est fortement conservée chez la drosophile. Cependant, il existe une différence majeure entre la drosophile et les mammifères : les Dilps (drosophila insulin like peptides) portent à la fois les fonctions métaboliques de l'insuline et les fonctions de croissance des IGFs des vertébrés. La croissance intrinsèque étant contrôlée par de nombreux mécanismes, je détaillerai principalement dans mon introduction le rôle des morphogènes et de la voie de signalisation Hippo.

Puis, je présenterai les mécanismes impliqués dans la coordination de la croissance des organes. De nombreuses expériences ont montré que chaque organe possède un programme autonome de croissance, grandissant à différentes vitesses et durant différents stades développementaux. Un mécanisme de couplage doit s'assurer que chaque organe a atteint sa taille finale avant de passer au prochain stade développemental. Lorsque l'on affecte ces mécanismes de couplage, on entraîne une dérégulation de la stabilité développementale, se traduisant par une asymétrie des organes pairs. Il est essentiel de comprendre quels mécanismes sont impliqués dans la détermination finale de la taille des organes et la coordination de la croissance entre organes.

Dans une dernière partie, je présenterai la découverte d'une nouvelle hormone de coordination de la croissance, Dilp8 et son rôle face à un stress et au cours du développement normal.

L'équipe a montré que le gène *dilp8* est fortement induit au niveau transcriptionnel dans plusieurs conditions de perturbation de la croissance tissulaire. Son expression varie au cours du développement larvaire, avec un pic d'expression au milieu de la période larvaire et une forte réduction de son expression avant la transition larvaire/pupale. Ceci suggère que l'état de maturation/croissance des tissus influe directement sur le niveau d'expression du gène *dilp8*. *dilp8* est donc impliqué dans le couplage de la croissance tissulaire et le programme développemental. De façon surprenante, un mutant hypomorphe pour *dilp8* présente une asymétrie bilatérale.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre le couplage entre l'expression de *dilp8* et l'état de croissance/maturation des organes. A cet effet, j'ai étudié la régulation transcriptionnelle de *dilp8*. J'ai pu montrer que la voie de signalisation Hippo, son activateur transcriptionnel Yorkie et son co-partenaire Scalloped, régulent directement les niveaux transcriptionnels de *dilp8* via des Hippo Responsive Elements (HRE) présents dans le promoteur de *dilp8*. La voie de signalisation Hippo joue un rôle clé dans le contrôle de la taille des organes en couplant les paramètres biomécaniques des tissus (densité cellulaire, contraintes physiques et pressions induites par la croissance) avec la capacité de prolifération cellulaire. Les expériences de génétique que j'ai réalisées indiquent que la délétion des HREs présents dans le promoteur de *dilp8* suffit à induire une asymétrie fluctuante. Au cours du développement, l'état de croissance du disque modifie les tensions et forces mécaniques au sein du disque imaginal. Ces modifications contrôlent la voie de signalisation Hippo. De façon intéressante, la voie de signalisation Hippo contrôle la croissance au niveau de la cellule, à l'aide des interactions hétérophiliques de type Fat/Ds de façon autonome cellulaire ou au niveau du tissu dans son intégralité. Ces résultats démontrent qu'un couplage, entre la voie de signalisation Hippo et l'expression de *dilp8*, est requis pour le contrôle de la stabilité développementale.

J'ai aussi contribué à démontrer que le récepteur de Dilp8, Lgr3, exprimé dans une paire de neurones nommés GCL, est responsable du phénotype d'asymétrie caractéristique des mutants hypomorphes pour *dilp8*. L'inhibition de Lgr3 au sein des neurones GCL en présence d'une surexpression de *dilp8* montre une désynchronisation de la croissance des tissus périphériques. *dilp8* est donc surexprimé par un tissu dont la croissance est affectée et signale au niveau du cerveau.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS	5
RESUME	6
AVANT PROPOS	7
INTRODUCTION	11
I. INTRODUCTION GENERALE	11
II. LA DROSOPHILE, UN MODELE D'ETUDE DE LA CROISSANCE DES ORGANES	16
III. CROISSANCE DES ORGANES CHEZ LA LARVE	17
1. <i>Modèle général de la croissance larvaire</i>	17
2. <i>Les disques imaginaux, précurseurs des structures adultes chez la drosophile</i>	19
a. La croissance est elle homogène au sein du disque imaginal d'aile ?	21
3. <i>Croissance extrinsèque : nutrition et voie de l'insuline</i>	23
a. La voie de l'insuline, régulateur de l'homéostasie métabolique	23
b. Contrôle de la croissance par les IGF chez les vertébrés	23
c. Contrôle systémique de la croissance et de l'homéostasie métabolique chez la drosophile en réponse aux nutriments par les voies de signalisation IIS et TOR	25
d. Les Dilps	26
e. Le facteur de transcription FOXO et la régulation des cibles de la voie IIS	28
f. Nutrition et croissance : la voie de signalisation TOR	28
4. <i>Croissance intrinsèque</i>	29
a. Les morphogènes	30
b. La voie de signalisation Hippo	34
IV. COORDINATION DE LA CROISSANCE	44
1. <i>Coordination de la croissance et de l'horloge développementale</i>	44
2. <i>Coordination de la croissance des organes</i>	47
V. DILP8, UNE NOUVELLE HORMONE DE LA COORDINATION	49
1. <i>Dilp8 et le contrôle de l'horloge développementale</i>	49
2. <i>Lien entre dilp8, l'ecdysone et le contrôle de la taille</i>	50
3. <i>Dilp8 et son récepteur Lgr3 : circuit cérébral contrôlant l'horloge développementale</i>	52
4. <i>Lien entre dilp8 et l'état de croissance des tissus</i>	53
a. Réponse au stress tissulaire JNK/dilp8	53
5. <i>Fonctions de dilp8 au cours du développement normal</i>	54
a. Dilp8 et son récepteur Lgr3 impliqué dans les fonctions reproductrices	54
b. Régulation post transcriptionnelle des niveaux d'ARNm de <i>dilp8</i> par l'exoribonucléase Pacman au cours du développement normal	54
c. <i>Dilp8</i> est impliquée dans l'homéostasie et la robustesse développementale	55
RESULTATS	57
VI. MANUSCRIT	57
1. <i>The Hippo signalling pathway coordinates organ growth and limits developmental variability by controlling dilp8 expression</i>	57
a. Introduction	57
b. Manuscrit	57
c. Conclusion	82
VII. ARTICLES PUBLIES	82
1. <i>Drosophila Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability</i>	82
a. Introduction	82
b. Article	82
c. Conclusion	96
2. <i>The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth</i>	97
a. Introduction	97
b. Article	97

c. Conclusion	121
VIII. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES NON PUBLIEES	122
1. <i>La régulation de dilp8 par myc de façon autonome cellulaire</i>	122
2. <i>Le rétrocontrôle autonome de dilp8 sur la croissance du disque n'est pas dépendant de la voie Hippo</i>	123
3. <i>Dilp8 n'est pas transcriptionnellement régulé par stat dans les clones surexprimant Yki</i>	124
CONCLUSION GENERALE	126
DISCUSSION	128
REFERENCES	134

Introduction

I. Introduction générale

Une des questions les plus excitantes de la biologie développementale est de comprendre comment la croissance autonome de chaque organe est coordonnée pour former un adulte aux proportions correctes. Au cours du développement, la croissance est ajustée à différents niveaux, celle de l'organisme, de l'organe et enfin des tissus ou compartiments au sein de chaque organe. Toutes ces croissances autonomes doivent être coordonnées pour produire un adulte aux proportions appropriées. De plus, les programmes de croissance individuelle doivent intégrer des informations extrinsèques (nutrition, variations environnementales) et des signaux intrinsèques (patrimoine génétique) pour former un adulte où la taille de chaque organe est calibrée avec la taille finale de l'organisme.

Croissance normale

La croissance est définie par une augmentation de la taille ou de la masse d'un tissu ou d'un organisme. Cette augmentation dépend de trois procédés principaux chez les animaux : la prolifération cellulaire, l'agrandissement de la taille des cellules sans division, ou par l'ajout de matériel extracellulaire (sécrétion d'une matrice dans le cas de l'os).

Deux paramètres majeurs caractérisent la croissance et déterminent la taille finale d'un adulte. Le premier paramètre est la durée de la période de croissance, temps au cours duquel l'organisme grandit. Le deuxième paramètre est le taux de croissance qui correspond à la vitesse de croissance de l'organisme (augmentation de sa masse au cours du temps).

La taille finale d'un organisme est intimement liée avec la taille des organes individuels qui le composent.

Allométrie

L'allométrie est l'étude des relations qui lient la croissance relative des différents organes à la croissance de l'individu dans son intégralité. L'allométrie signifie littéralement « autre que métrique » et vient de « allo » en grec qui signifie « autre ». Elle définit, en biologie, les mécanismes de croissance différentielle des organes. L'allométrie caractérisée par des taux de croissance variés pour chaque organe doit néanmoins aboutir à la formation d'un individu aux proportions correctes. Les proportions des différents organes sont contrôlées génétiquement et peuvent avoir un impact sur l'évolution d'une espèce. Ainsi chez l'homme, la croissance du cœur est isométrique par rapport à la croissance du corps dans son intégralité, possédant approximativement le même taux de croissance. A l'inverse, la croissance du cerveau s'arrête à l'âge de 6 ans correspondant à une croissance hypo-allométrique. La taille de la tête devient progressivement plus petite au fur et mesure de la croissance de l'individu. La présence d'une hyper ou d'une hypo céphalie peut avoir des conséquences dramatiques, confirmant le rôle essentiel de l'allométrie. Chez la drosophile, la

parfaite symétrie des ailes est essentielle pour une bonne aptitude au vol, et une forte capacité reproductive. Ces exemples confortent l'idée que les mécanismes de contrôle des proportions sont extrêmement importants et par conséquent doivent être extrêmement robustes. Peu d'éléments sont actuellement connus sur les mécanismes développementaux qui assurent une croissance isométrique, hypoallométrique ou hyperallométrique de l'organe par rapport à la taille finale. Le cas de la croissance des organes pairs est encore plus intrigant. Quels processus entrent en jeu pour permettre à 2 organes pairs, en absence de tout contact physique, de posséder à la fin du développement approximativement la même taille ? Comment, lors d'une lésion sur l'un des organes pairs, l'autre organe pair non lésé va-t'il percevoir la lésion et s'adapter en ralentissant son développement ?

Croissance intrinsèque

L'évidence de la présence de mécanismes intrinsèques de régulation de la taille, provient d'expériences de transplantations de bourgeons entre des espèces de différentes tailles de salamandre du genre *Ambystoma* (Twitty and Schwind, 1931) (Harrison, 1924). Dans les années 20, Harrison a montré que les bourgeons des membres provenant de 2 espèces transplantés dans des donneurs, se développent en fonction de la taille d'origine du membre du donneur même si ces bourgeons sont transplantés dans un receveur de taille différente à celle du donneur (Fig1).

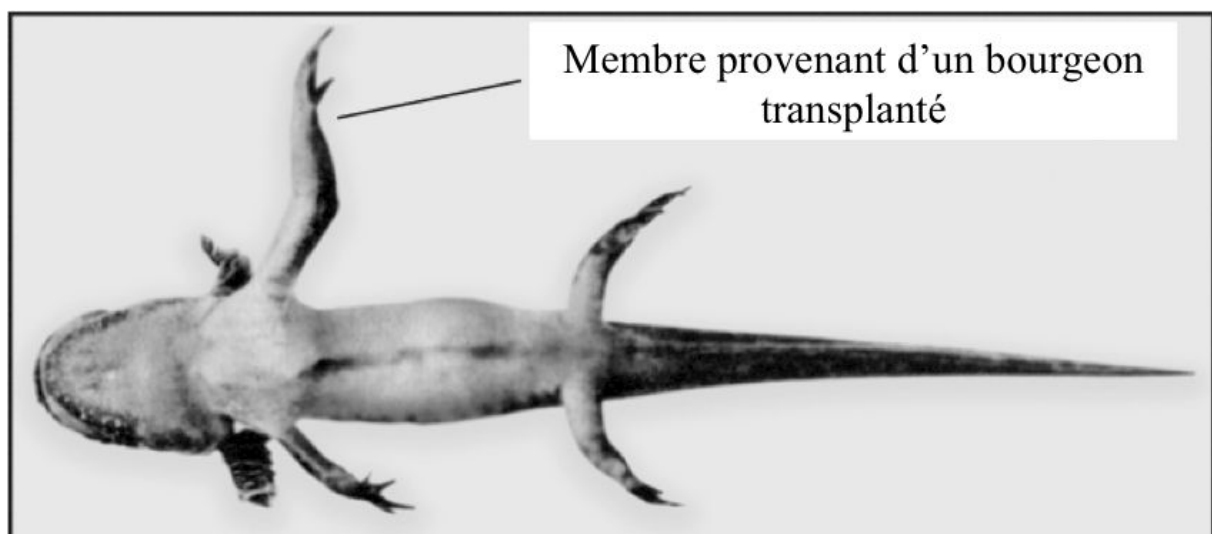


Figure 1 : La taille des membres est génétiquement programmée chez la salamandre.

Un bourgeon membranaire d'une grande espèce de salamandre *Ambystoma trigrinum* est transplanté sur un embryon d'une plus petite espèce *Ambystoma punctatum*. Le transplant grandit plus que les membres de l'hôte atteignant la taille qu'il aurait atteinte chez *Ambystoma trigrinum*.

Photographie de Harrison, R.G, 1969

Cette expérience confirme que, quelques soient les facteurs circulants tels que les hormones qui influencent la croissance, le contrôle intrinsèque de la croissance est primordial. Ce modèle de l'organe contrôlant de façon autonome la taille finale cible à atteindre est

appuyé par des observations chez la drosophile. En 1985, une expérience de Bryant et Levinson consiste à transplanter des disques précoces (début du troisième stade larvaire) dans un environnement permissif de croissance, l'abdomen de femelle adulte. Ils montrent que les disques atteignent la taille finale approximativement attendue à la fin du développement larvaire. Cette expérience confirme l'existence d'un mécanisme de détermination autonome de la taille.

Un mécanisme autonome de contrôle de la taille du disque est présent et fonctionne dans un environnement hétérologue (Fig2)(Bryant and Levinson, 1985).

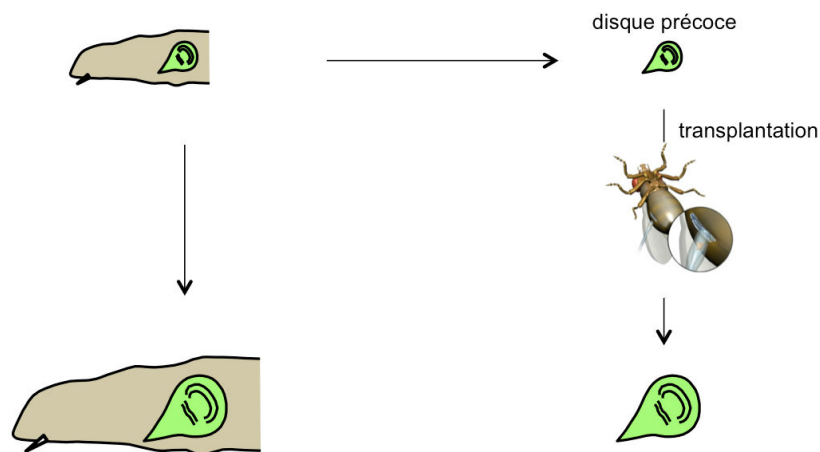


Figure 2 : Expérience de transplantation chez la drosophile.

L'existence d'un mécanisme autonome de détermination de la taille est illustrée par cette expérience de transplantation. Un disque précoce provenant d'une jeune larve est disséqué et transplanté dans l'abdomen d'une mouche adulte, grandissant jusqu'à la taille attendue à la fin du programme développemental.

Le mécanisme de l'homéorhésie, décrit par Waddington en 1940, consiste à un retour à la séquence normale de développement d'un organe lorsque celui-ci a subi une perturbation de son programme de croissance. Les organes suivent une trajectoire déterminée de croissance. Face à une perturbation, deux types de croissances différentes peuvent se mettre en place.

Le premier type est la croissance régénérative. Au cours du développement, lorsque la croissance d'un organe est affectée par manipulation génétique, physique ou face aux variations environnementales, une croissance régénérative de l'organe lésé se met en place compensant la perte de masse à la fin du développement et se traduisant par un retard développemental.

Le deuxième type est la croissance de rattrapage, qui est défini par une augmentation temporaire du taux de croissance en réponse à une situation de retard de croissance. La croissance de rattrapage compense pour la perte potentielle de masse que l'organe aurait dû acquérir si la croissance s'était déroulée normalement.

La croissance de rattrapage, mécanisme homéorhétic, est à différencier du mécanisme homéostatique de la croissance régénérative ou compensatoire. La croissance régénérative implique la croissance supplémentaire d'un organe après la perte d'une masse

tissulaire (régénération du foie après une hépatectomie) dans le but d'un retour à l'état d'équilibre. Quant à elle, la croissance de rattrapage compense la perte de masse potentielle, c'est à dire la masse de tissu qui aurait dû être ajoutée à l'organe au cours de sa croissance normale dans le but d'un retour sur la trajectoire développementale.

Croissance régénérative

Une partie des invertébrés et certains vertébrés primitifs possèdent une capacité remarquable de régénération des organes. Un des objectifs de l'étude de ces mécanismes de régénération dans un organe, est de comprendre les processus de stimulation de la régénération tissulaire et les raisons pour lesquelles cette croissance compensatoire est perdue partiellement à l'âge adulte, et très peu répandue chez les mammifères (Uygur and Lee, 2016). Toutefois des travaux ont montré une régénération de certains tissus fœtaux ou embryonniques de mammifères tels que la peau sans formation de cicatrices (Nodder and Martin, 1996). En effet, le fœtus en développement a une capacité à cicatriser des lésions épidermales, régénérant à l'identique l'épiderme. Cette croissance régénérative au site de la lésion est possible en modulant la réponse immunitaire adaptative.

Une meilleure compréhension des gènes clés impliqués dans la mise en place d'une cicatrisation étendue à la place d'une régénération à l'identique pourrait avoir un rôle crucial dans le développement d'une future thérapie régénérative des organes à l'âge adulte.

Chez les mammifères, un des rares organes conservant sa capacité de croissance compensatoire à l'âge adulte est le foie (Michalopoulos, 1990). Ainsi, même si plus de 75% du foie est ôté chirurgicalement, l'organe peut régénérer jusqu'à atteindre une masse normale.

Une des raisons pour lesquelles le foie conserve cette capacité régénérative au stade adulte est le lien entre la taille et la fonction du foie. En effet, si le foie est trop petit, il ne produira pas suffisamment de bile et un mécanisme activant sa croissance se mettra en place. A l'inverse, lorsque le foie aura atteint sa taille adéquate, la croissance sera arrêtée grâce à un mécanisme d'arrêt de la croissance. Cette hypothèse est appuyée par diverses expériences, telles que la transplantation du foie d'un petit chien dans un plus grand animal. En réaction à cette transplantation, un mécanisme d'activation de la croissance se met en place, le foie grandit pour pouvoir assurer pleinement sa fonction et délivrer un volume de bile adéquat au volume de l'animal receveur (Kam et al., 1987). Une autre expérience porte sur le lien entre la taille du foie et sa fonction. En réponse à un stress dû à un excès de xénobiotiques ou de l'administration de phénobarbital, le foie subit une hyperplasie. Cette hyperplasie compense la perte de masse hépatique et rétablit la production d'un volume de bile adéquat (Columbano and Shinozuka, 1996).

De récentes études suggèrent que les niveaux de bile permettent au foie d'évaluer la fonctionnalité de l'organe. Les acides biliaires sont synthétisés par le foie et sécrétés dans l'intestin grêle. Les acides biliaires sont ensuite réabsorbés et retournent au foie où ils sont repris par les hépatocytes, participant à la circulation entérohépatique. Une faible augmentation du flux d'acide biliaire entraîne une augmentation de la taille du foie (Huang et al., 2006). Une étude complémentaire a montré qu'un drainage du liquide biliaire en dehors du foie pendant 7 jours avant une hépatectomie, retarde la régénération ultérieure du foie (Lui and Baron, 2011).

Croissance de rattrapage

Si l'un des organes subit une inhibition de sa croissance (par exemple due à une carence ou une déficience en hormones de croissance), cet organe doit modifier sa croissance autonome pour rester dans son programme développemental (Roselló-Díez and Joyner, 2015). Dans ce but, l'organe s'engage dans une croissance de rattrapage (catch up growth).

Cette croissance de rattrapage consiste en une accélération temporaire du taux de croissance qui perdure jusqu'à atteindre une trajectoire de croissance normale.

Au cours d'une croissance normale, la prolifération diminue progressivement jusqu'à entraîner un arrêt de la croissance. Cette diminution de la prolifération entraînant un arrêt de la croissance pourrait donc être contrôlée par un mécanisme intrinsèque dépendant de l'âge de l'organe et aboutissant à la diminution progressive des gènes activant la croissance tels que les IGF, *myc* ... La modification de ce programme génétique de croissance ne semble pas être contrôlée par la durée de la période de croissance mais plutôt par l'âge du tissu. Ainsi, des conditions d'inhibition de croissance ralentissent la progression du programme génétique, et par conséquent conserve le potentiel de croissance (Finkelstein et al., 2013).

Ce modèle est soutenu par des études sur le rat, où, l'utilisation d'un régime alimentaire déficient en tryptophane permet de ralentir la croissance postnatale. Après une période d'inhibition de la croissance de la naissance à 4 semaines postnatales, l'analyse de l'ARNm de gènes activateurs de la croissance (de la première semaine à la 20^{ème} semaine) indique que le programme génétique limitant la croissance a été retardé. La période d'inhibition de la croissance due à une carence en tryptophane a retardé la diminution du taux de prolifération attendu dans les reins et les poumons. Le retour des animaux à un régime alimentaire normal entraîne une élévation du taux de prolifération dans le foie, les reins et les poumons, supérieure par rapport aux animaux témoins (Lui et al., 2010). Ces données suggèrent que l'inhibition de la croissance ralentit la progression du programme génétique, retardant ainsi la perte de la capacité proliférative, et permettant une croissance de rattrapage. Le programme génétique d'arrêt de la croissance n'est donc pas seulement fonction de l'âge de l'organe, mais aussi de son état de maturation.

Toutefois ces résultats sont à modérer. En effet, tous les organes ne compensent pas leur déficit de croissance par une croissance de rattrapage efficace. Les reins, par exemple, présentent un pic de prolifération suite à l'arrêt du tryptophane. Ce pic n'est cependant pas suffisant pour que le rein atteigne la taille finale attendue à la fin de croissance postnatale.

Mécanismes d'arrêt de la croissance

L'une des questions irrésolues dans le domaine de la croissance concerne la compréhension des mécanismes et signaux qui entraînent l'arrêt de la croissance.

L'une des hypothèses serait que des chalone, facteurs solubles qui sont sécrétés par des cellules d'un organe régulent négativement la croissance de cet organe. Ces chalone seraient produites en quantité proportionnelle à la masse de l'organe (Sharpey-Schäfer, 1916). Les chalone sont décrites comme possédant une activité spécifique de contrôle de la

croissance de chaque organe, et sont à actions réversibles et non toxiques (Bullough, 1971) (Maugh, 1972). Dans les années 1970, de nombreuses équipes de recherches s'appliquent à isoler ces chalcones. L'incapacité à les purifier aboutit peu à peu à l'abandon des recherches au début des années 80. En 1997, une molécule possédant les propriétés caractéristiques des chalcones est identifiée. Il s'agit de la myostatine (McPherron et al., 1997). Des souris mutantes pour la *myostatine* présentent une augmentation systémique de la masse musculaire au cours du développement. Les adultes mutants pour la *myostatine* possèdent 2 fois plus de masse musculaire que les contrôles. En 2000, une étude montre que la myostatine est sécrétée par les myoblastes en cours de différenciation, bloquant la prolifération d'une partie des cellules précurseurs des muscles en agissant sur le cycle cellulaire (arrêt en phase G1).

La *myostatine* en agissant comme répresseur de la croissance est capable de définir le volume musculaire à la fin du développement, remettant au goût du jour la notion de chalcones (McPherron et al., 1997) (Thomas et al., 2000). Ces expériences montrent que des chalcones pourraient être produites localement pour réguler négativement la croissance d'un organe et retarder sa croissance.

Ces principes biologiques m'ont amené à me poser les questions suivantes au cours de ma thèse :

Comment les organes ressentent ils leurs tailles finales ?

Comment la croissance des organes est elle coordonnée ?

Quels sont les mécanismes coordonnant croissance des organes et horloge développementale ?

Pour tenter de répondre à ces questions, j'ai utilisé la drosophile comme modèle d'étude. La drosophile est actuellement un modèle riche en outils génétiques et avec de nombreuses équipes réalisant actuellement des progrès considérables sur les mécanismes de compréhension de la croissance.

II. La drosophile, un modèle d'étude de la croissance des organes

En 1794, le poète William Blake, dans son recueil « Chanson de l'innocence et de l'expérience » dédicace l'un de ses poèmes à la mouche. Il termine ce poème par les vers suivants : « Ne suis-je pas une mouche comme toi ? Où n'es-tu pas un homme comme moi ? ». De nos jours, de nombreuses études ont confirmé l'existence de fortes similarités entre la drosophile et l'homme.

Depuis plus de 100 ans, la drosophile est un modèle utilisé pour la recherche scientifique et médicale. Décrite pour la première fois en 1830 par le Dr Meigen, elle devient un insecte au service de la science au début du XXème siècle. En 1910, le Dr Morgan identifie par hasard la mutation « œil blanc ». Le Dr Morgan et ses étudiants développent ensuite la théorie chromosomique de l'hérédité, de la liaison des gènes et du crossing over. Ces études permettent à Morgan de recevoir le prix Nobel en 1933. La drosophile devient alors un modèle d'étude incontournable (Bier, 2005).

De prime abord, la drosophile et l'homme semblent extrêmement différents. Ces deux espèces possèdent pourtant les mêmes mécanismes biologiques fondamentaux et voies de signalisations conservées au cours de l'évolution. En effet, grâce au séquençage du génome de la drosophile, plus de 75% des gènes identifiés qui sont mutés, délétés ou amplifiés dans des pathologies humaines, ont leur équivalent chez la drosophile (Pickeral et al., 2000) (Banfi, 1996)(Reiter et al., 2001)(Adams et al., 2000)(Giot et al., 2003).

La drosophile est le modèle idéal pour aborder de nombreuses questions de biologie cellulaire et de génétique développementale. De plus, de puissants outils génétiques offrent une vaste quantité de lignées transgéniques contenant des mutations endogènes, insertions d'éléments P, RNAi, déficience, inversion, duplications, qui sont actuellement disponibles (stock centers Bloomington, VDRC, Kyoto...) et cataloguées (Flybase).

Des techniques de modification de l'expression d'un gène spécifiquement dans un groupe de cellules, tels que le système UAS/Gal4, permettent l'étude de gènes essentiels tout en s'affranchissant des risques de létalité (Brand and Perrimon, 1993). De plus, la génération de tissus mosaïques grâce à la technique de Xu et Rubin, a permis la réalisation de cribles génétiques en présence de mutations de gènes affectant des mécanismes biologiques essentiels (Xu and Rubin, 1993). Un deuxième système d'expression binaire LexA/Lexop a été récemment identifié. Il n'interagit pas avec le système UAS/Gal4. La combinaison de ces 2 systèmes d'expression permet d'exprimer un gène dans un premier tissu et un autre gène dans un second tissu et d'analyser l'interaction entre les 2 tissus (del Valle Rodríguez et al., 2012).

Grâce à de nouveaux outils d'ingénierie génétique, il est très simple de générer de nouvelles lignées mutantes. Par exemple, la technique CRISPR (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) permet de réaliser une mutagenèse dirigée avec une haute efficacité, facilitant l'étude d'un gène d'intérêt (Baena-Lopez et al., 2013).

De nombreuses ressources bioinformatiques existent. Les génomes de *Drosophila melanogaster* et des 12 espèces les plus étroitement apparentées sont annotés et de nombreuses bases de données donnent accès à l'expression spatio-temporelle des gènes annotés, les interactions protéiques... (St. Pierre et al., 2014).

Au cours des dernières années, la drosophile s'est placée comme un excellent modèle pour décrypter les mécanismes de régulations impliqués dans la génération d'un adulte à la taille finale et aux proportions conservées.

III. Croissance des organes chez la larve

1. Modèle général de la croissance larvaire

Le cycle de vie de la drosophile est comparable à celui de nombreuses espèces animales, avec quatre stades principaux : développement embryonnaire, stade juvénile, maturation sexuelle et âge adulte (Fig3). Après fertilisation de l'œuf, le développement embryonnaire se met en place, suivi par le stade juvénile (enfance chez l'homme, larve chez la drosophile). Une phase de maturation sexuelle a ensuite lieu, correspondant au stade pupal

chez la drosophile et à l'adolescence chez l'homme. Ce cycle de vie se termine par l'âge adulte, correspondant pour la mouche et pour l'homme, à la phase active de reproduction.

Chez la drosophile, la taille finale de l'adulte est déterminée par la taille de la larve atteinte, avant l'entrée en pupaison (Edgar, 2006). En effet, l'exosquelette, formant la cage pupale, empêche tout gain de volume, limitant l'expansion de la taille finale de l'individu. La transition larve-pupe définit donc la taille finale de l'individu.

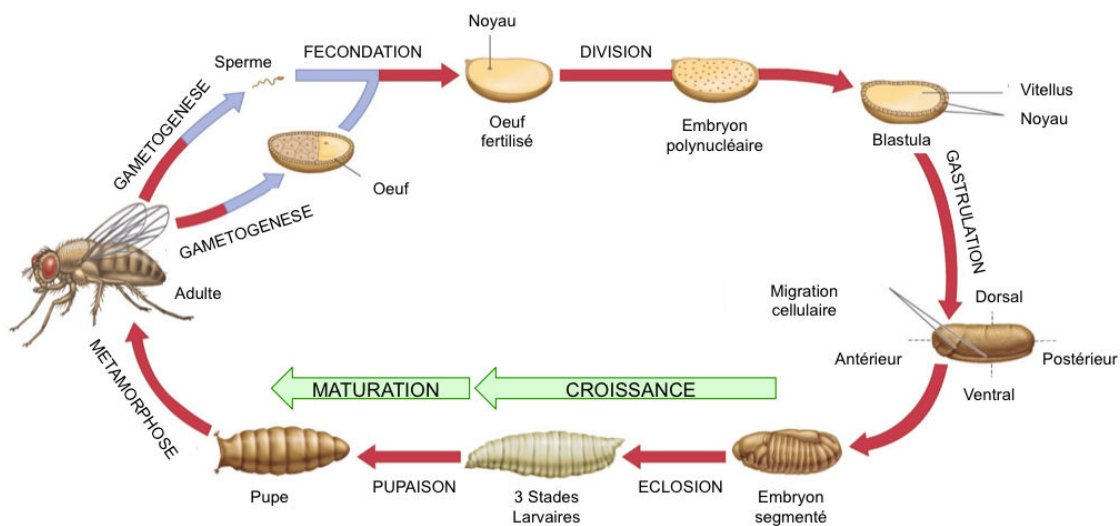


Figure 3 : Cycle de vie de la drosophile.

D'après un cours de biologie du Kenyon College :

http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap12/FG18_03.JPG

Après fertilisation, l'embryon se développe sous forme d'un œuf. Pendant ce stade embryonnaire, les axes du corps sont établis, suivis par la cellularisation, la gastrulation, la segmentation et des événements morphogénétiques complexes aboutissant à l'éclosion d'une larve (Rivera-Pomar and Jacki, 1996).

Le développement se poursuit ensuite par la phase larvaire qui contient 3 stades (L1-L3), séparés par deux mues. Entre chaque mue, une nouvelle cuticule se forme, permettant la croissance de l'animal.

Chez la larve, deux types de tissus sont présents, le tissu larvaire et les tissus imaginaux. La taille des cellules du tissu larvaire augmente sans aucune division cellulaire grâce à une série de duplication du génome multipliant jusqu'à 200 fois la masse de la larve (Church and Robertson, 1966). Cette augmentation de la masse corporelle au cours du stade larvaire est attribuée à la croissance du tissu larvaire endoréplicatif contrôlée principalement par les voies de signalisation TOR et Inr.

A la fin du stade larvaire, la larve se transforme en pupa au cours de la métamorphose. La métamorphose démarre quand l'inhibition qui prédomine pendant le stade larvaire est levée par des facteurs environnementaux (température, oxygène, nutrition) et des facteurs hormonaux (ecdysone). Au cours de cette métamorphose, une phase intense de remodelage et

de changement dans la structure corporelle se met en place et s'achèvera par l'éclosion de l'adulte.

Pendant le stade pupal, la plupart des tissus larvaires (l'appareil digestif, les glandes salivaires et certains muscles) sont histolysés, entrant dans un cycle de mort cellulaire programmée, à l'exception d'une partie du corps gras (Lee et al., 2002)(Nelliot et al., 2006).

Spécifiés durant l'embryogénèse, les tissus imaginaux préexistent depuis le stade embryonnaire et sont constitués de tissus prolifératifs. Les tissus imaginaux se sont développés au cours de ce stade larvaire sous forme de structures épithéliales (équivalent des bourgeons membranaires chez les humains). Ils se métamorphosent pour former les organes et les appendices de la mouche adulte.

2. Les disques imaginaux, précurseurs des structures adultes chez la drosophile

Au sein de la larve de drosophile, les disques imaginaux, superpositions de couches de cellules épithéliales à partir desquelles les structures adultes sont formées, sont le modèle idéal pour l'étude des processus gouvernant la croissance des tissus (Fig4) (Weinkove and Leever, 2000). Le disque imaginal d'aile est un tissu qui est mis en place durant le stade embryonnaire du développement de la drosophile. Il est destiné à devenir l'aile et le mésothorax. Après l'éclosion, la larve traverse 3 stades développementaux séparés par des mues au cours desquelles le disque imaginal est formé et grandit jusqu'à atteindre une taille et une forme caractéristiques.

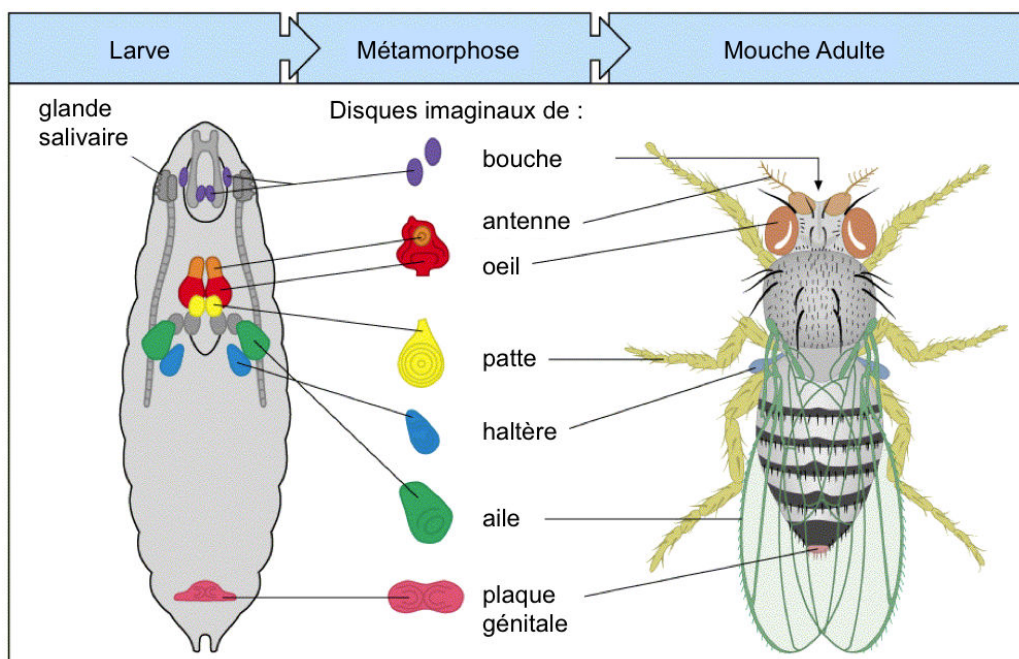


Figure 4 : Les tissus imaginaux, précurseurs des structures adultes chez la drosophile.

Les tissus imaginaux sont des feuillet de cellules épithéliales qui vont former les structures adultes de la mouche

D'après le livre : Principles of development, Lewis Wolpert, Cheryll Tickle, 4^{ème} édition.

A la fin du 3^{ème} stade larvaire, le disque imaginal d'aile est composé de 2 couches distinctes de cellules, la membrane péripodiale et le disque imaginal lui même. Ce disque est aussi divisé en 3 lignées de cellules qui composeront le futur notum, la charnière et l'aile. Le disque est aussi séparé en 4 compartiments définis par les frontières antéro-postérieure (axe A/P) et dorso-ventrale (D/V) (Fig5). Les compartiments sont des entités formées par un groupe de cellules à l'avenir commun.

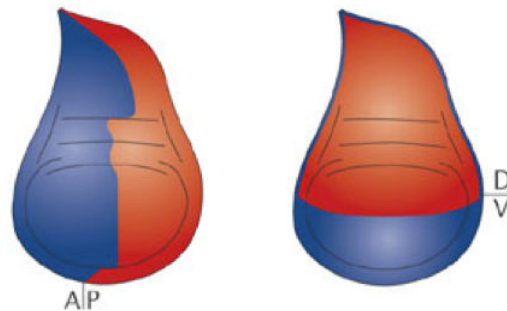


Figure 5 : Compartiment du disque imaginal d'aile à la fin du 3^{ème} stade larvaire.

La frontière antéro-postérieure est délimitée par l'expression du gène sélecteur *engrailed*. L'expression du gène sélecteur *apterous* définit la frontière dorso ventrale

D'après Dahmann, C., Oates, A.C. & Brand, M., 2011. Boundary formation and maintenance in tissue development. *Nature reviews. Genetic*

Dix heures après la ponte, le disque imaginal d'aile est formé au cours de l'embryogénèse par une invagination de l'ectoderme embryonnaire (Bate and Arias, 1991). Dans la larve nouvellement éclos, le disque d'aile apparaît comme un sac ovale transparent relié à l'épiderme larvaire par la tige péripodiale (Bryant and Levinson, 1985). Au cours des stades larvaires, le disque imaginal d'aile grandit jusqu'à atteindre sa taille et sa forme finales, en intégrant des changements dans la forme et la prolifération des cellules le constituant.

Pendant la majeure partie du premier stade larvaire, les cellules du disque d'aile grandissent sans se diviser, augmentant leurs volumes jusqu'à 6 fois. Une série de mitoses démarre ensuite 15 heures après l'éclosion. Les cellules deviennent plus plates et allongées aboutissant à une elongation du disque d'aile le long de l'axe antéro-postérieur (Mandaravally Madhavan and Schneiderman, 1977).

Au cours du second stade larvaire, le nombre de cellules augmente de façon inversement proportionnelle aux volumes de celles-ci, entraînant des changements considérables dans la forme des cellules. Les cellules forment alors 2 couches distinctes : la membrane péripodiale et le disque. 60 heures après la ponte, les cellules du disque d'aile prennent la forme de colonnes selon un processus dépendant du morphogène *dpp*.

Les cellules du disque d'aile continuent à se diviser rapidement jusqu'au milieu du 3ème stade larvaire où les taux de prolifération commencent à baisser. Ce taux baisse continuellement ainsi que le volume des cellules jusqu'à la fin du stade larvaire où la

croissance du disque cesse. Le disque a atteint sa taille finale, constitué de 30 à 50000 cellules. Le disque d'aile s'invagine après le début de la métamorphose et continue à se diviser au cours du premier stade pupal (Schubiger and Palka, 1987).

a. La croissance est elle homogène au sein du disque imaginal d'aile ?

A sa formation, le disque d'aile est initialement composé d'environ 40 cellules, et atteindra à la fin de sa croissance larvaire, 50000 cellules. Les divisions cellulaires se déroulent dans l'intégralité du disque et cessent uniformément lorsque la taille finale du disque est atteinte. Des expériences préliminaires ont déjà montrées que la taille finale de l'aile n'est pas corrélée avec un nombre défini de divisions cellulaires ou un nombre total de cellules à atteindre. La taille finale de l'aile semble être contrôlée par certains mécanismes qui mesurent et surveillent la taille globale du disque d'aile en développement et ajustent le nombre de divisions cellulaires ainsi que la taille des cellules en conséquence.

La croissance du disque peut aussi être découplée de la prolifération cellulaire. Si les divisions cellulaires sont bloquées dans le compartiment antérieur ou postérieur du disque d'aile au stade larvaire, la taille finale de l'aile est normale mais les cellules ont une taille individuelle plus grande (Neufeld et al., 1998).

D'autres expériences ont montré que la taille d'un organe ou d'une partie de celui-ci ne dépend pas du nombre de divisions cellulaires. Pour confirmer ce résultat, il suffit de réaliser des clones dont la croissance est ralentie (phénotype de type minute). Les cellules de type sauvage se divisent plus rapidement. Le nombre de cellules de type sauvage est donc supérieur au nombre de cellules de type « Minute ». Néanmoins, la taille finale du tissu ou du compartiment n'est pas affectée (Morata and Ripoll, 1975).

Bien que la croissance du disque d'aile est représentée comme une sigmoïde asymétrique en terme de nombre de cellules (Fig6), les différentes régions du disque ne croissent pas à la même vitesse. En 1970, Bryant vît que le nombre de cellules du mésonotum représente 1/3 du nombre total de cellules du disque au cours du deuxième stade larvaire. Au cours du troisième stade larvaire, le nombre de cellules correspondant au mésonotum n'est plus qu'1/6, indiquant que le mésonotum grandit plus lentement à ce stade. De plus, il démontra plus tard en 1985, que la zone périphérique de la poche centrale du disque ne prolifère pas à la fin du stade larvaire (Bryant and Levinson, 1985).

L'équipe du Dr Morata a montré un plus fort taux de prolifération cellulaire dans le compartiment postérieur entre 36 et 60 heures après la ponte, confirmant la présence d'une croissance non uniforme au sein du disque (Lawrence and Morata, 1976).

L'équipe du Dr Johnston a démontré un plus faible doublement du nombre de cellules dans la charnière de l'aile en comparaison avec la poche centrale entre 48 et 115 heures après la ponte (Johnston and Sanders, 2003).

Toutes ces expériences confirment que la prolifération cellulaire n'est pas homogène au cours du temps et de l'espace au sein du disque imaginal d'aile (Fig6). Cette croissance nécessite donc la présence d'organiseurs tels que les morphogènes. Au cours du développement, le disque d'aile est divisé en compartiments. Les cellules de chaque compartiment ont une identité spécifique et ne peuvent pas se mélanger avec les cellules des autres compartiments.

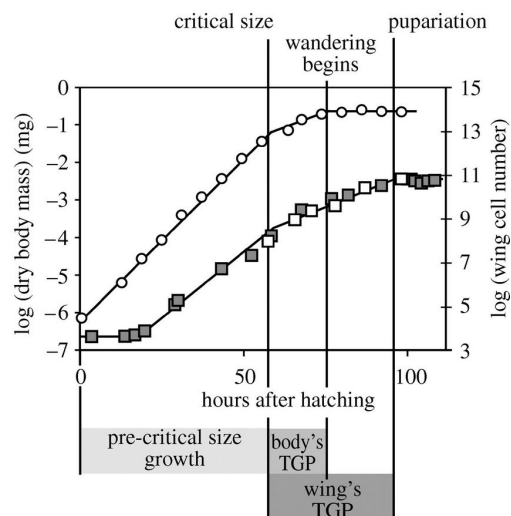


Figure 6 : Croissance cellulaire du disque imaginal d'aile et croissance de la larve (masse).

Les ronds blancs représente la croissance de l'organisme en logarithme de la masse au cours du temps. La croissance de la larve commence à l'éclosion et finit lors du comportement d'errance de la larve.

Les carrés blancs et gris représentent la croissance du disque imaginal d'aile selon 2 études différentes (carrés blancs (Martin, 1982) et carrés gris (Bryant and Levinson, 1985)).

La croissance des disques imaginaires d'ailes commence à la fin du premier stade larvaire et cesse au moment de l'entrée en pupe.

D'après Shingleton, A.W., Mirth, C.K. & Bates, P.W., 2008. Developmental model of static allometry in holometabolous insects. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*

Une étude récente réalisée par le Dr Eaton a montré qu'au cours du stade pupal, la contraction de la charnière de l'aile soumet la pâle de l'aile à de fortes tensions. Ces tensions entraînent une orientation précise de l'élongation cellulaire, des réarrangements cellulaires, et des divisions cellulaires qui vont réorienter l'élongation de l'aile dans l'axe proximal-distal. Ce mécanisme est indispensable pour l'obtention d'une aile parfaitement formée. En effet, l'ablation de la charnière de l'aile en agissant sur la polarité planaire, modifie la forme de l'aile au stade pupal. Ces expériences ont permis de montrer que la contraction de la charnière de l'aile entraîne la formation d'un flux de cellules provenant de la charnière qui va réorienter les divisions cellulaires dans l'axe proximal-distal de polarité planaire de l'épithélium de l'aile de drosophile (Aigouy et al., 2010).

De nombreux mécanismes cellulaires sont indispensables pour s'assurer que le programme développemental du disque imaginal d'aile puisse se dérouler de façon optimale en contrôlant la croissance en fonction des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Une des voies majeures du contrôle de l'homéostasie métabolique au cours de la croissance est la voie de signalisation de l'insuline.

3. Croissance extrinsèque : nutrition et voie de l'insuline

a. La voie de l'insuline, régulateur de l'homéostasie métabolique

La voie de l'insuline/IGF est apparue comme l'une des voies majeures de régulation du contrôle de la croissance, de la taille finale d'un organisme et de l'homéostasie (Broughton and Partridge, 2009)(Teleman, 2010; Garofalo, 2002).

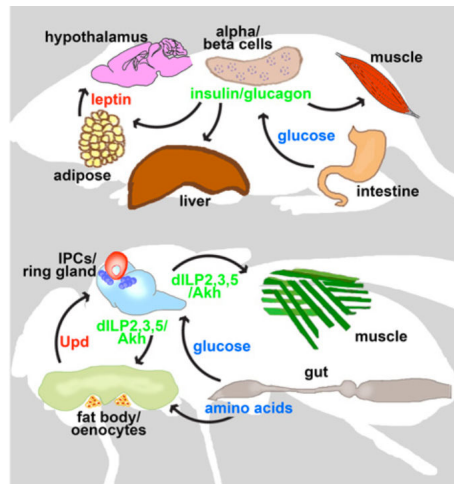


Figure 7 : Comparaison de la régulation des fonctions métaboliques chez les mammifères et la drosophile.

Le code couleur permet d'identifier la conservation des principaux signaux endocriniens impliqués dans l'homéostasie métabolique entre la souris (en haut) et la drosophile (en bas).

D'après Das, R. & Dobens, L.L., 2015. Conservation of gene and tissue networks regulating insulin signalling in flies and vertebrates. *Biochemical Society transactions*

Chez les vertébrés, les fonctions métaboliques sont assurées par l'insuline alors que la croissance est dirigée par les facteurs de croissance de type insuline appelé IGF (Nakae et al., 2001).

Chez l'homme, la fonction métabolique principale de l'insuline est de réguler la glycémie en augmentant l'utilisation du glucose au niveau du tissu adipeux (lipogénèse) et des muscles (oxydation) et en inhibant la libération de glucose par le foie. En activant la synthèse et en inhibant le catabolisme des lipides, glycogène et protéines, l'insuline stimule la croissance cellulaire et le stockage de métabolites énergétiques dans le muscle, le foie et les tissus adipeux (Fig7). Une résistance à l'insuline ou une déficience dans sa synthèse entraîne de sévères dérégulations métaboliques tels que le diabète.

b. Contrôle de la croissance par les IGF chez les vertébrés

La famille des polypeptides de type insuline contient l'insuline pancréatique (proinsuline) ainsi que les facteurs de croissance de type insuline (IGF), les peptides

insuliniques des invertébrés (par exemple les dilps chez la drosophile) et les relaxines (identifiées lors de l'étude des mécanismes d'élargissement du vagin à la naissance et décontraction de l'utérus et impliqués dans d'autres mécanismes) (Bathgate et al., 2013).

La famille des IGFs comprend 2 polypeptides, les IGF1 et 2. Ces peptides possèdent de fortes similarités de séquence avec l'insuline pancréatique. Ils sont produits par le foie en réponse à l'hormone de croissance sécrétée par l'hypophyse. Les IGFs sont responsables de la croissance des tissus somatiques, tels que les muscles squelettiques et les os au cours des périodes pré et post-natale (Maki, 2010). Les IGFs se lient et activent le récepteur aux IGFs (IGF-IR). Le recrutement des substrats IRS1-4 par l'IGF-IR active la PI3K et la voie des MAPK.

Les mutants murins nuls IGF-I et IGF-II et les doubles mutants IGF-I/IGF-II sont viables, bien que leur taille soit sévèrement réduite allant de 30% pour une simple mutation à 60% pour une double mutation (Liu et al., 1993). Afin de réguler la biodisponibilité des IGFs, des protéines nommées IGFBP se lient aux IGFs avec une affinité égale ou supérieure à celle de l'IGF-R (Duan, 2002).

Les effets des IGFs et de l'insuline sur la croissance et le métabolisme sont produits par leur liaison à l'InR et au IGF-IR. Ces deux familles de récepteurs appartiennent aux récepteurs RTK et possèdent de fortes similarités structurelles. Ces récepteurs sont formés de molécules dimériques intégrées à la membrane, lesquels subissent une autophosphorylation après liaison à leur ligand. Ce mécanisme permet le recrutement de molécules adaptatrices (IRS) et potentialise leur activité (White, 1997).

InR contrôle la croissance fœtale en réponse à l'IGF-II et le métabolisme en réponse à l'insuline à l'âge adulte. Les mutants nuls pour l'InR ont un programme développemental normal avec une légère réduction de taille à la naissance de 10%. A l'âge adulte, ces mutants InR présentent des dérégulations métaboliques (résistance à l'insuline) et meurent au bout de quelques jours (Nakae et al., 2001). Ce phénotype sévère de résistance à l'insuline montre un taux élevé de glucose et d'insuline en accord avec le phénotype visible chez des enfants présentant des mutations du récepteur de l'insuline (Taylor and Arioglu, 1999).

La spécificité d'activité des récepteurs IGF-R est donnée par leurs co-activateurs, les IRS. IRS-1 et IRS-2 sont les principaux acteurs du contrôle du métabolisme glucidique et de la croissance somatique.

Les souris mutantes pour l'IRS-1 sont insulino-résistantes et possèdent un poids réduit à la naissance de 20% à 60% (Tamemoto et al., 1994). Les mutants nuls pour l'IRS2, bien que de taille normale, développent un diabète provoqué par une insulino-résistance et possèdent plusieurs anomalies telles qu'une réduction de la taille du cerveau et du nombre de photorécepteurs et une stérilité des femelles (Withers et al., 1998).

IRS-3 est localisé dans les tissus adipeux. Les mutants nuls IRS-3 semblent phénotypiquement normaux.

IRS-4 est exprimé dans le thymus, le rein et le cerveau. Les mutants nuls pour l'IRS-4 ont de légères atteintes des fonctions reproductrices, de la croissance et une faible insulino-résistance.

Les 2 IRS primordiaux pour les fonctions de développement, de fécondité et de croissance semblent donc être IRS-1 et 2. Les effets principaux des IRS sur la croissance et le

métabolisme sont transmis par l'activation de Akt par la PI3K, qui régulent des cibles telles que mTORC1 et FOXO (Mihaylova et al., 2011).

c. Contrôle systémique de la croissance et de l'homéostasie métabolique chez la drosophile en réponse aux nutriments par les voies de signalisation IIS et TOR

Chez la drosophile, comme chez l'homme, la voie de l'insuline régule de nombreuses fonctions physiologiques, telles que le métabolisme (homéostasie), la reproduction, la croissance tissulaire et la longévité (Partridge and Gems, 2002). La voie de signalisation insuline est fortement conservée de l'homme à la drosophile (Fig8). L'utilisation de la drosophile comme modèle d'étude permet de comprendre comment la voie de l'insuline régule le métabolisme de l'échelle d'une cellule à l'organisme entier (Géminard et al., 2009). En effet, chez la drosophile, la voie de l'insuline est simplifiée, intégrant les fonctions de l'insuline et des IGF des mammifères en une seule voie de signalisation.

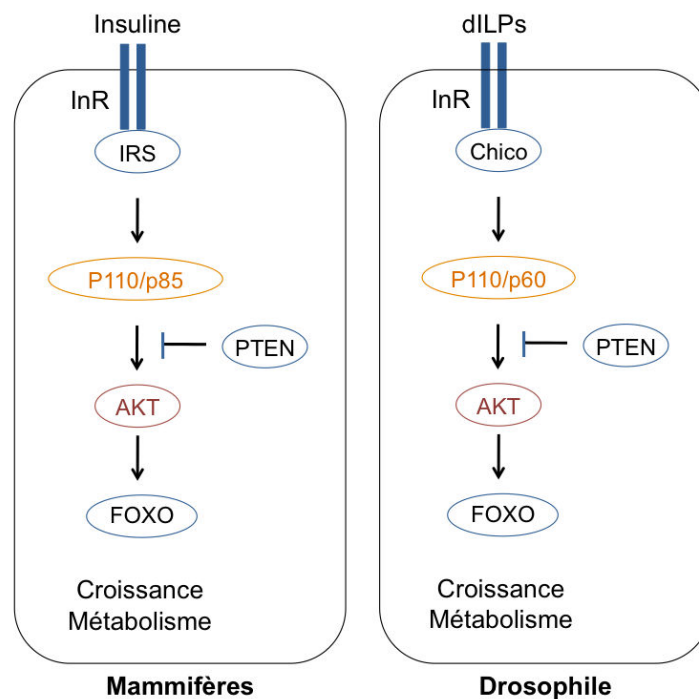


Figure 8 : Forte conservation de la voie de signalisation de l'insuline entre les mammifères et la drosophile.

Chez la drosophile, le récepteur à l'insuline (InR) et une protéine substrat du récepteur à l'insuline (IRS), dénommée Chico, sont les homologues des protéines mammifères InR, IGF-IR et IRS1-4 contrôlant la croissance systémique dépendante de l'insuline, le

métabolisme, la reproduction et la longévité (Nijhout, 2003; Rulifson et al., 2002; Ikeya et al., 2002).

d. Les Dilps

Chez la drosophile, 8 Dilps ont été identifiés. Les Dilps sont des ligands pour l'InR et agissent simultanément sur les fonctions de croissance et de métabolisme.

A l'exception de Dilp8, les autres Dilps 1 à 7 activent la voie canonique de l'insuline et favorisent la croissance cellulaire et l'anabolisme. Les *dilps* diffèrent par leur expression spatio-temporelle (Brogiolo et al., 2001).

Une surexpression d'un des *dilps* 1 à 7 entraîne une augmentation de la taille de la larve (Ikeya et al., 2002). Inversement, des mutants homozygotes pour une région affectant les *dilps*1-5 présentent une croissance affectée et des troubles métaboliques (Grönke et al., 2010).

La régulation de la croissance dépendante de la nutrition provient principalement de la sécrétion des Dilps par le SNC (Fig9). Sept paires de cellules neurosécrétrices nommées cellules produisant l'insuline (IPC) se situant dans le protocérébrum, régulent la transcription des *dilps* 1,2,3 et 5 et sont des homologues des cellules β chez les vertébrés (similarité de leur programme développemental et de fonction) (Rulifson et al., 2002). La destruction de ces cellules réduit la taille de la larve et entraîne une réduction de la taille de l'adulte (Ikeya et al., 2002) confirmant leur rôle systémique d'hormones favorisant la croissance. Lorsqu'ils sont libérés dans l'hémolymph, les Dilps, activent un récepteur unique à l'insuline (InR) dans les tissus cibles tels que le corps gras, les muscles, et les ovaires. Dans ces tissus cibles, ils exercent des fonctions de régulation de la croissance de façon auto et paracrine via une cascade de signalisation fortement conservée. Chez la plupart des espèces animales, les Dilps sont le relais entre nutrition et croissance (Andersen et al., 2013) (Nässel and Broeck, 2015)

Les phénotypes des mutants nuls pour les *dilps* sont assez mineurs. La perte de fonction de l'InR est létale. Les mutants hypomorphes pour l'*inr* présentent une réduction de la taille des organes et de l'organisme traduisant la réduction de la taille et du nombre de cellules couplées avec une infertilité des femelles et une augmentation des taux lipidiques (Stocker and Hafen, 2000). A l'inverse une surexpression de l'InR spécifiquement dans un tissu, aboutit à une surcroissance autonome des organes (Brogiolo et al., 2001).

Chez la drosophile, Chico est l'homologue des protéines IRS1-4. Un mutant nul pour *chico* présente un phénotype similaire à une perte partielle de l'InR. Les mutants *chico* sont semi-létaux et subissent une réduction de plus de 50% de la taille finale de l'adulte (Böhni et al., 1999). Chico se lie aux résidus autophosphorylés de l'InR, puis subit une phosphorylation par l'InR. Chico sert alors de molécule adaptatrice pour assembler les composants en aval de la voie de signalisation (Ptillove et al., 2000). Chico se lie grâce aux différents résidus tyrosine phosphorylés dans sa région C terminale aux domaines SH2 de nombreuses protéines. Chico s'associe avec l'InR activant la voie PI3K impliquée dans la croissance et le contrôle du métabolisme (Oldham and Hafen, 2003).

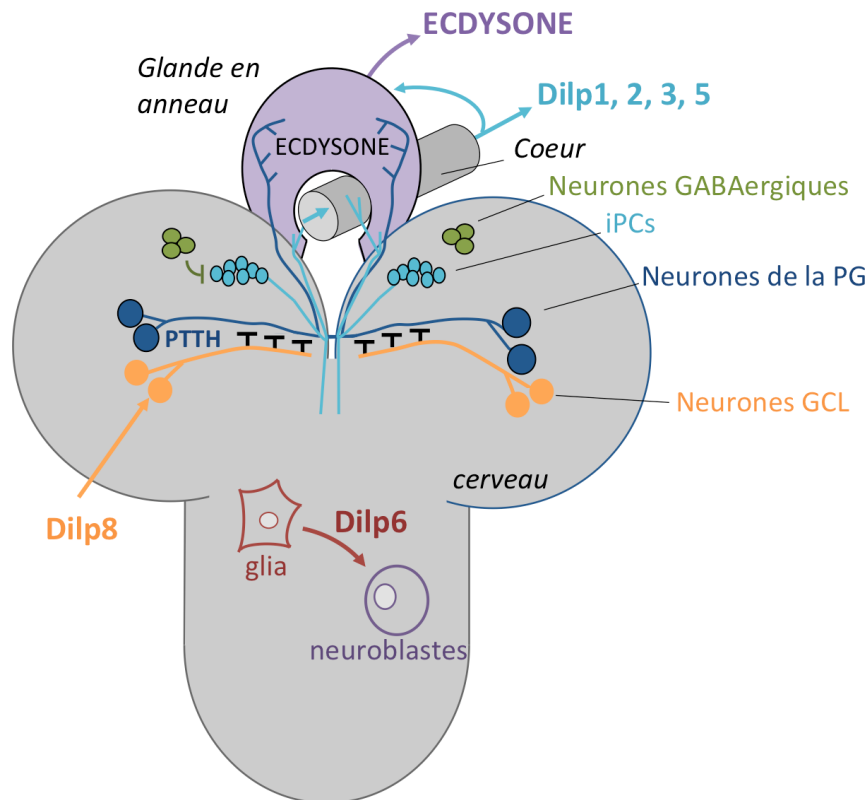


Figure 9 : Contrôle de la croissance par les Dilps au niveau du SNC.

D'après Andersen, D.S., Colombani, J. & Léopold, P., 2013. Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends in Cell Biology*.

La croissance est contrôlée principalement par la liaison de Chico à la PI3K. La formation du complexe InR-Chico entraîne la phosphorylation du PIP2 en PIP3 par la PI3K grâce à la sous unité catalytique p110. Cependant, chez la drosophile, l'InR peut activer sa cascade de signalisation en l'absence de Chico (Böhni et al., 1999). La cascade de signalisation contrôlée par l'InR est inhibée par la phosphatase PTEN. PTEN, second gène le plus muté dans les cancers humains, est un immunosuppresseur. La perte de fonction de PTEN entraîne une surcroissance chez la drosophile (Di Cristofano and Pandolfi, 2000)(Brogiolo et al., 2001).

Les phénotypes des mutants nuls pour la PI3K correspondent aux mutants *inr*, confirmant son rôle crucial. La modification de l'activité de la PI3K affecte la taille du tissu en modifiant la taille et le nombre des cellules (Weinkove and Leivers, 2000).

La conversion de PIP2 en PIP3 aboutit au recrutement de protéines de liaison aux PIP3 telles que Akt et PDK1, à la membrane. Le recrutement à la membrane de Akt et son interaction avec le PIP3 sont primordiaux pour la propagation du signal. Une forme de Akt mutée et incapable de se lier à la membrane sauve le phénotype de létalité des mutants nuls PTEN, confirmant que l'Akt est l'acteur majeur de la voie de signalisation PI3K (Stocker et al., 2002). L'hyperactivation de l'Akt entraîne des cancers, du diabète et des troubles cardiovasculaires et neurologiques (Hers et al., 2011).

e. Le facteur de transcription FOXO et la régulation des cibles de la voie IIS

Une des cibles de phosphorylation principale d'Akt est FOXO. FOXO régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, le métabolisme glucidique, la réponse aux stress oxydatifs et l'apoptose (Eijkelenboom and Burgering, 2013). Chez les mammifères, quatre FOXO ont été découverts (FOXO1,3,4,6). Pour le moment, un seul FOXO a été découvert chez la drosophile. La phosphorylation de FOXO par Akt entraîne la séquestration de FOXO dans le cytoplasme par la liaison à des protéines 14-3-3. FOXO active la gluconéogenèse et inhibe le métabolisme glucidique. La régulation négative de FOXO par la voie de signalisation insuline favorise l'utilisation du glucose et limite la synthèse de glycogène. FOXO active la transcription d'inhibiteurs du cycle cellulaire, des gènes pro apoptotiques et du facteur de traduction 4E-BP, régulé aussi par TOR, inhibiteur de la traduction des ARNm capés (Brunet et al., 1999)(Teleman et al., 2005). En accord avec l'action inhibitrice de FOXO sur la prolifération et le métabolisme cellulaire, une forme constitutivement active de FOXO conduit à un arrêt de la croissance cellulaire. Une surexpression de FOXO spécifiquement dans un tissu, aboutit à une réduction autonome de la taille du tissu, conséquence d'une réduction du nombre de cellules (Puig et al., 2003). Chez les mammifères comme chez la drosophile, FOXO est impliqué dans un mécanisme de rétrocontrôle sur la voie de l'insuline. FOXO contrôle la transcription de l'InR en réponse aux carences nutritionnelles. L'activité de la voie de l'insuline aboutit à une réduction de la transcription de l'InR par l'action inhibitrice de FOXO (Puig and Tjian, 2005).

f. Nutrition et croissance : la voie de signalisation TOR

Dans des conditions normales de développement, le taux de croissance des tissus larvaires est contrôlé par le niveau et le type de nutriments disponibles. Une masse minimale critique correspond au poids minimum nécessaire à une larve pour survivre à la métamorphose en condition de carence. La masse minimale critique signale la fin de la période de croissance dépendante de la nutrition, et le début d'un programme développemental indépendant de la nutrition. En absence de carence, la larve cesse de se nourrir à la fin du 3ème stade larvaire. Si la larve est carencée avant d'avoir atteint la masse critique, la croissance est suspendue et le programme développemental est différé. Un retard développemental est nécessaire pour accumuler une quantité suffisante de nutriments indispensables à la métamorphose.

Une restriction nutritionnelle lorsque la larve a atteint sa masse critique n'entraîne pas de retard développemental, mais entraîne un ralentissement coordonné de la croissance des organes, grâce à une réduction des Dilps circulants. Une suppression de la voie de signalisation insuline aboutit à une taille finale de l'adulte réduite (Colombani et al., 2003; Géminard et al., 2009). Ainsi, si la période de croissance est allongée ou diminuée expérimentalement après la masse critique atteinte, des adultes plus grands ou plus petits peuvent émerger. La nutrition peut donc affecter la taille finale de l'organisme tout en

préservant les proportions. Les voies de signalisation de l'insuline et TOR coordonnent le taux de croissance avec les signaux nutritionnels.

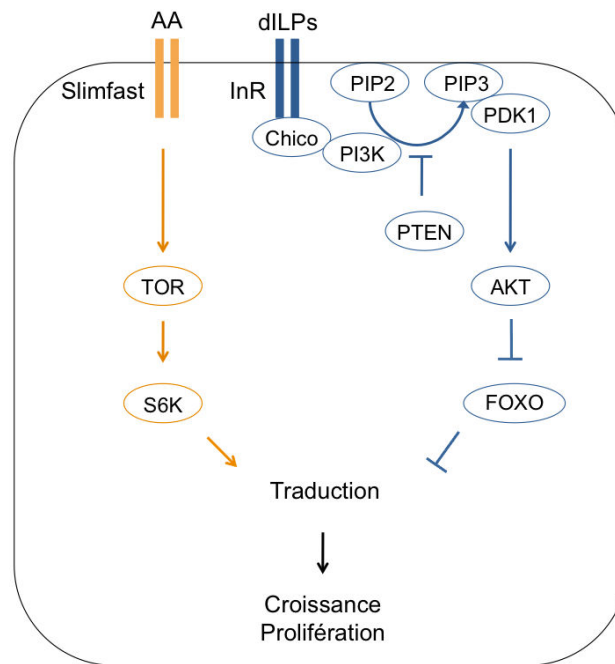


Figure 10 : Les voies de signalisation TOR et IIS.

La voie de régulation TOR est un senseur nutritionnel autonome cellulaire qui régule la croissance (Fig10) (Colombani et al., 2003). Le corps gras joue un rôle dans le couplage du statut nutritionnel perçu par la voie de signalisation TOR et la régulation de la croissance des tissus distants. A l'aide de la voie TOR, le corps gras est capable de ressentir les variations de disponibilité des nutriments au sein de l'hémolymph. Si le taux de nutriments est faible, des signaux humoraux sont sécrétés et inhibent la sécrétion des Dilps par les IPC, réduisant l'activité de la voie de signalisation IIS de façon systémique (Géminard et al., 2009). Les cibles transcriptionnelles et traductionnelles de la voie de signalisation TOR contrôlent divers mécanismes tels que le transport de nutriments, l'organisation du cytosquelette d'actine, la production de ribosome et l'autophagie. Au cours du développement, les voies de signalisation TOR et IIS agissent principalement sur la croissance. A l'âge adulte, elles interviennent dans les mécanismes de contrôle de la fertilité et du vieillissement (Schmelzle and Hall, 2000; Partridge et al., 2011).

Au cours de cette partie, j'ai pu montrer que les voies de l'insuline et TOR sont contrôlées par des facteurs extrinsèques. Cependant, des facteurs intrinsèques contrôlent aussi la croissance des organes, via les morphogènes et la voie de signalisation Hippo.

4. Croissance intrinsèque

a. Les morphogènes

Les morphogènes sont des molécules qui diffusent à partir d'une source et définissent l'expression de gènes cibles en fonction de leurs concentrations. Les cellules sont capables de ressentir la concentration de morphogènes ou la pente locale du gradient créée par la diffusion du morphogène. De nombreuses études ont focalisé leur attention sur les morphogènes *dpp* et *wnt*.

a) *Wingless*, un organisateur de l'aile

Wingless (homologue chez les vertébrés Wnt) est un morphogène agissant comme un organisateur induit par la voie de signalisation Notch. Il informe la cellule de sa position, sa destinée cellulaire et son potentiel prolifératif. *Wg* est exprimé dans une rangée de cellules de la bordure dorso-ventrale ainsi que dans 2 anneaux concentriques. L'anneau interne sépare les cellules distales (situées à l'intérieur de l'anneau), précurseurs de la pale de l'aile, des cellules précurseurs de l'articulation (hinge) et du thorax de l'aile. La formation d'une frontière dorso-ventrale est essentielle. En effet, une malformation de cette frontière entraîne des défauts de croissance dans l'intégralité du disque (Baker, 2007).

Une faible et uniforme surexpression de *wg* est suffisante pour restaurer la prolifération et la croissance des disques imaginaux d'aile mutant pour *wg* (Baena-Lopez et al., 2012). La notion de contribution du gradient à la croissance et à la différenciation des cellules productrices de l'aile est donc remise en question par l'équipe du Dr JP. Vincent. La même équipe a montré en 2014 qu'une forme de *wg* liée à la membrane est suffisante pour assurer une croissance et une morphologie normale des ailes (Alexandre et al., 2014).

b) *Dpp* et la structuration du disque

Dpp est un homologue des TGF β (facteur de croissance transformant). Au sein du disque imaginal d'aile, *dpp* agit comme un morphogène qui ordonne aux cellules d'adopter un destin spécifique selon leur position, indispensable par exemple pour la formation des veines de l'aile. *Dpp* est sécrété le long d'une bande de cellules constituant la frontière antéro-postérieure (A-P) à partir de laquelle il diffuse pour former un gradient de concentration (Nellen et al., 1996)(Lecuit et al., 1996). Une cascade de signalisation transforme la concentration locale de *Dpp* en un gradient de phosphorylation de MAD (P-MAD) à travers l'activation du récepteur appelé Thickveins (Tkv). Le gradient de P-MAD régule l'expression des gènes cibles qui possèdent différents niveaux d'activation, *sal*, *omb*, *brk* (Fig11)(Restrepo et al., 2014).

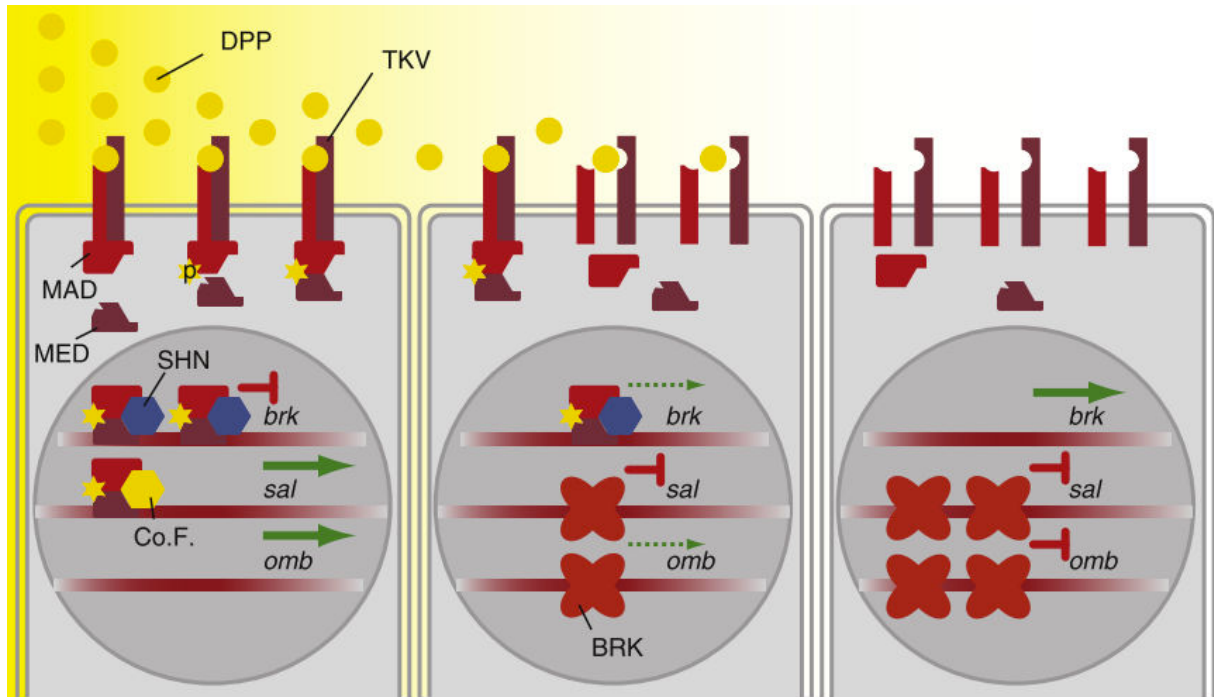


Figure 11 : La voie de signalisation du morphogène *dpp*.

La liaison de DPP à son récepteur TKV entraîne une cascade de signalisation. TKV phosphoryle le facteur de transcription MAD qui se lie à ses partenaires de liaison à l'ADN, MED et SHN. Ce complexe réprime l'activité du répresseur transcriptionnel BRK

D'après Restrepo, S., Zartman, J.J. & Basler, K., 2014. Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP

c) *Dpp* et la croissance

dpp promeut la croissance au sein du disque imaginal d'aile. L'augmentation des niveaux de *dpp* entraîne une augmentation de la taille finale de l'aile (Capdevila and Guerrero, 1994)(Teleman and Cohen, 2000). A l'inverse, des mutations qui réduisent les niveaux de *dpp* affectent la croissance du disque. Ces expériences suggèrent que *dpp* intervient au cours du développement dans la croissance du disque imaginal d'aile. Un des rôles les plus importants de *dpp* au cours de la spécification des tissus, est de limiter l'expression de l'inhibiteur transcriptionnel *Brinker* (Brk) (Fig12) (Schwank et al., 2008).

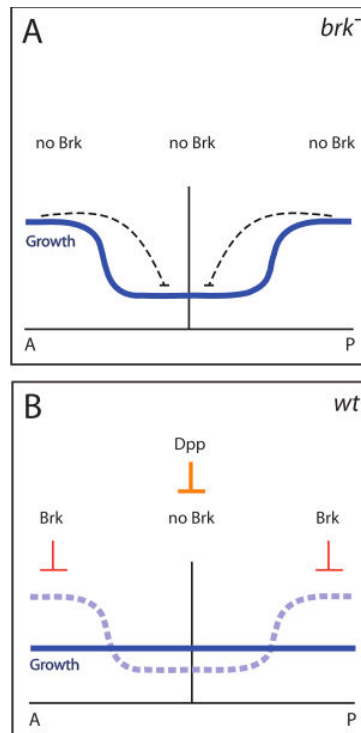


Figure 12 : Effet du duo antagoniste Brinker/Dpp sur la croissance.

Dans des disques mutants pour *brk*, les cellules de la région latérale prolifèrent, inhibant la croissance des cellules centrales. Dans des disques sauvages, l'expression de *dpp* inhibe l'expression de *brk* dans la zone centrale du disque. La croissance devient homogène dans toutes les régions du disque.

D'après Schwank, G., Restrepo, S. & Basler, K., 2008. Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development*

Une récente étude a permis de distinguer le rôle de *dpp* dans le contrôle spatial de la croissance du disque. En effet, deux modèles étaient proposés. Le premier modèle est celui de la règle temporelle où les cellules se divisent dès qu'elles ont atteint une augmentation de 50% de l'activité de *dpp*. Le deuxième modèle correspond au modèle d'égalisation, la présence de *dpp* serait seulement essentielle pour la prolifération de la zone centrale du disque. En utilisant la technique du morphotrap (protéine attachée à la membrane empêchant la formation d'un gradient), cette étude a permis d'invalider le modèle de la règle temporelle et de confirmer le modèle d'égalisation (Harmansa et al., 2015). Une deuxième étude parue récemment, montre qu'une inhibition conditionnelle de *dpp* dans sa rangée A/P d'expression, affecte l'expression de ses gènes cibles, *sal*, *omb*, et *brk* confirmant son rôle primordial dans le « patterning » du disque. Une inhibition de *dpp* en début du 3^{ème} stade larvaire dans son domaine endogène d'expression ne modifie pas les taux de prolifération cellulaire, ni la croissance du disque imaginal d'aile et n'altère pas la taille finale du disque. Ces résultats suggèrent que *dpp* contribue faiblement à la croissance du disque à la fin du développement larvaire. *dpp* est probablement impliqué, comme le propose le modèle d'égalisation, dans l'initiation de la croissance dans la zone centrale du disque au début du développement larvaire et le maintien du « patterning » du disque au cours du développement (Akiyama and Gibson, 2015).

d) *Dpp* et la voie de signalisation Hippo

Dpp, présent sous forme d'un gradient le long de la région antéro postérieure du disque, initie la croissance dans la zone centrale du disque. L'équipe de Irvine a montré que le gradient de *Dpp* agit via la voie de signalisation *Fat*. Le gradient de *Dpp* pourrait réguler la localisation et l'expression des différents composants du complexe *Fat*. La voie de signalisation *Fat*, via *Dachs* serait nécessaire pour transformer un gradient de *Dpp* en prolifération (Rogulja et al., 2008).

En 2011, l'équipe du Dr Basler a montré que l'expression et la localisation subcellulaire de *Fat* ne dépend pas du gradient de *Dpp*. Ainsi, une juxtaposition de cellules avec des niveaux différents d'expression de *dpp* n'est pas nécessaire pour activer la prolifération dans la zone centrale ou périphérique du disque. L'équipe de Basler propose que la combinaison des voies de signalisation *Fat* et *Dpp* aboutit à une prolifération homogène. *Fat* s'exprime selon un gradient opposé à celui de *dpp*. La plus haute concentration se situe sur la périphérie du disque. Puis la concentration diminue progressivement jusqu'à atteindre le centre du disque. Les actions de contrôle de la croissance de *Dpp* et *Fat* sont antagonistes. *Fat*, activateur de la voie Hippo, réprime la croissance principalement dans la région centrale. *Brk*, cible transcriptionnelle de *dpp* agit comme répresseur de la croissance dans les régions latérales du disque (Fig13A-B). Les voies de signalisation *Fat* et *Dpp* agissent de façon complémentaire, contrôlant une prolifération uniforme du disque. La régulation de la croissance par *Fat* est compatible avec le modèle d'égalisation dans lequel la présence de *dpp* est essentielle pour la prolifération de la zone centrale du disque (Schwank et al., 2011).

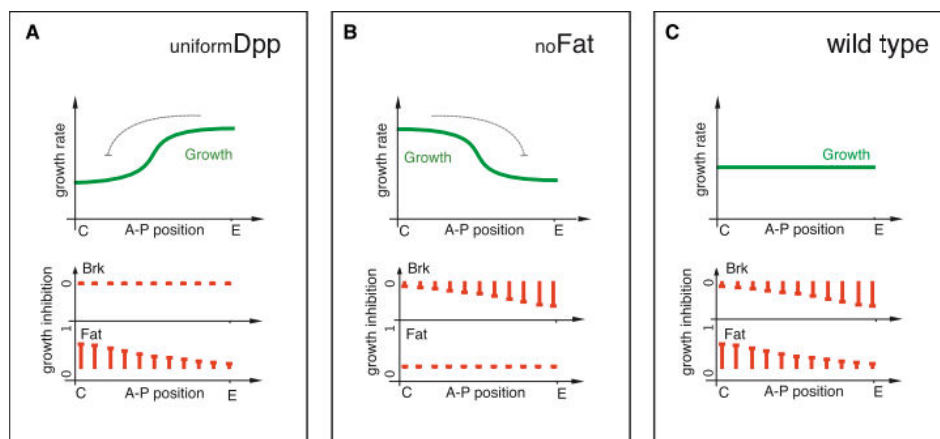


Figure 13 : Action antagoniste de *Dpp* et *Fat* contribuant à une croissance uniforme le long de l'axe antéro-postérieur du disque imaginal d'aile.

(A) Action inhibitrice de la croissance par *Fat* dans la zone centrale du disque en présence d'une absence d'expression de *Brk*. (B) Action inhibitrice de la croissance de *Brk* dans la zone périphérique du disque en l'absence de *Fat* (C) Au cours du développement normal, les voies de signalisation *Dpp/Brk* et *Fat* se complètent pour aboutir à une prolifération uniforme le long de l'axe antéro postérieur.

D'après Schwank, G. et al., 2011. Antagonistic Growth Regulation by *Dpp* and *Fat* Drives Uniform Cell Proliferation. *Developmental Cell*

Les morphogènes sont indispensables pour une structuration parfaite du disque, permettant aux tissus d'adopter différents destins cellulaires. J'ai montré que *dpp* est impliqué dans le contrôle de la croissance de la zone centrale du disque. Le contrôle de la croissance par *dpp* est complété par l'action antagoniste de *fat*. Fat est un régulateur en amont de la voie de signalisation Hippo. La voie de signalisation Hippo, découverte chez la drosophile, se place comme une des voies de signalisation les plus importantes dans le contrôle de la taille finale des organes.

b. La voie de signalisation Hippo

a) Conservation et mécanismes de la voie de signalisation Hippo

Au cours du développement normal, la taille finale du disque d'aile dépend d'un équilibre entre prolifération et mort cellulaire. La voie de signalisation Hippo est un important coordinateur de la croissance, de la division et la mort cellulaire, encourageant l'apoptose des cellules surnuméraires ou indésirables (Fig14). Découverte chez la drosophile, cette voie est extrêmement bien conservée chez les mammifères et de nombreux autres vertébrés. La voie de signalisation Hippo est impliquée dans de nombreux mécanismes. Ainsi, plusieurs acteurs de la voie de signalisation Hippo sont mutés dans des cancers humains.

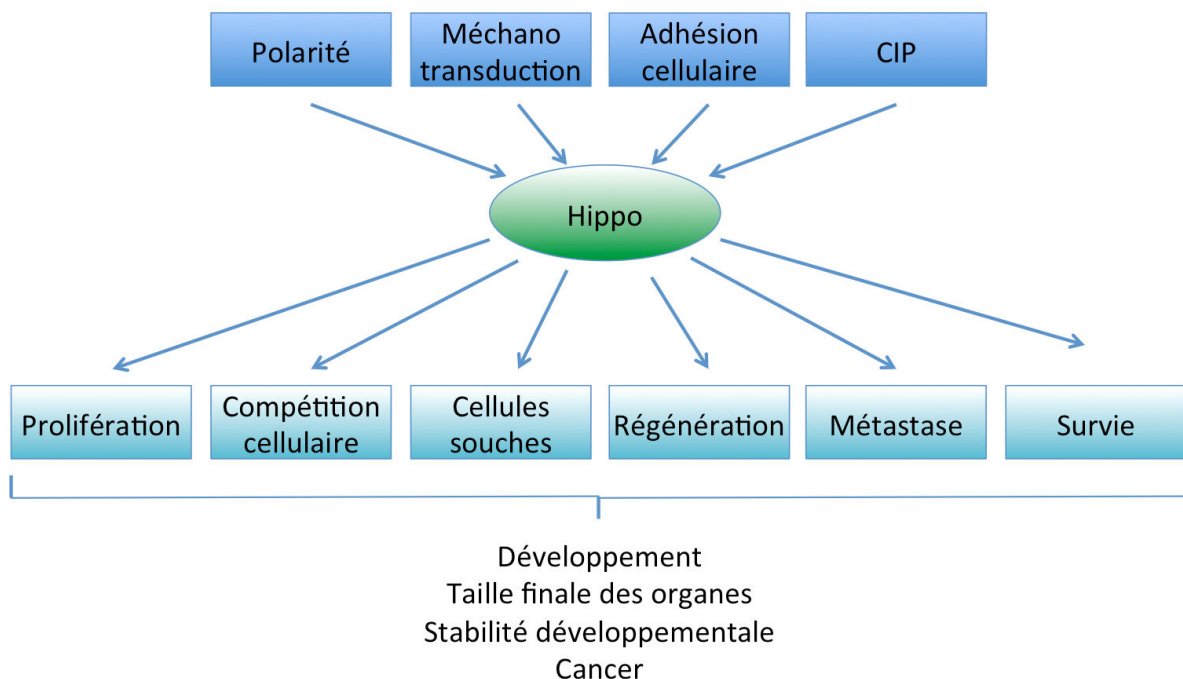


Figure 14 : La voie de signalisation Hippo impliquée dans de nombreux mécanismes.

De nombreux messages chimiques et physiques sont reçus par la voie de signalisation Hippo puis traduit en différents mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la compétition cellulaire, le maintien des cellules souches dans un état actif, la régénération tissulaire, le caractère invasif des métastases ou la survie cellulaire.

La voie de signalisation Hippo est composée d'un vaste réseau comprenant une cascade de kinases et une machinerie transcriptionnelle complexe (Mo et al., 2014).

La kinase principale à l'origine du nom de la voie est Hippo (homologue MST1/2). En effet, les mouches mutantes pour *hippo* présentent un phénotype caractéristique de surcroissance (Wu et al., 2003)(Fig15 B).

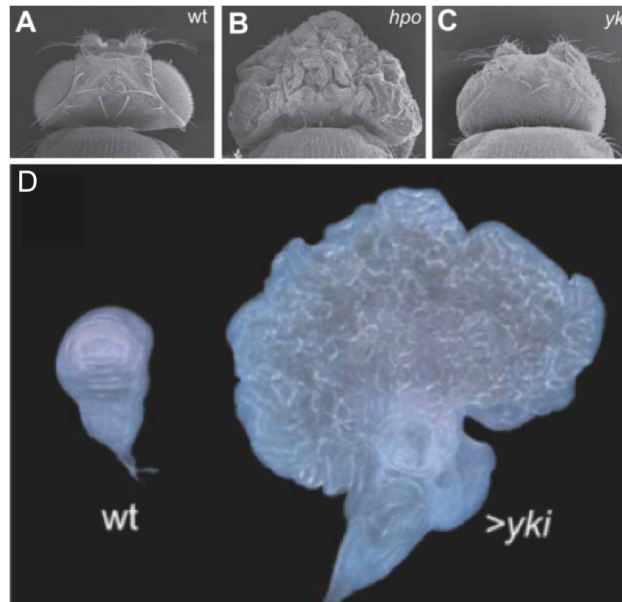


Figure 15 : Contrôle de la taille des organes par la voie de signalisation Hippo chez la drosophile.

(A) Animaux contrôle (B)(C) Animaux mutants pour *hippo* et *Yki* au niveau de la tête. Dans le cas d'une perte de fonction de *hippo* (B), on observe une surcroissance massive des tissus de la tête et des yeux comparés à la condition contrôle (A). A l'inverse, une inactivation de *yki* entraîne une réduction de la taille de la tête (Fig15C). Une surexpression de *yki* au sein du disque imaginal d'aile aboutit à une augmentation impressionnante de la taille du disque comparé à la situation contrôle (Fig15D)

D'après Pan, D., 2007. Hippo signaling in organ size control

Hippo, appartenant à la famille des Ste20 protéines kinases (homologues MST1/2) (Harvey et al., 2003), phosphoryle Warts (homologue LATS1/2) appartenant à la famille des DBF2 apparentées nucléaires (Justice et al., 1995). Une fois phosphorylée, Wts devient active. Une protéine facilite l'activité de Hippo, Salvador (homologue SAV1) (Tapon et al., 2002)(Kango-Singh, 2002). La protéine RASSF entre en compétition pour la liaison de Sav avec Hippo. RASSF possède une fonction de modulateur de l'activité de Hippo et de suppresseur de tumeur (Polesello et al., 2006). La protéine chaperonne Mats (homologue MOB1A/B) favorise l'activité de Warts (Lai et al., 2005)(Jia et al., 2003).

Sav est une protéine chaperonne contenant un domaine WW, contenant une séquence d'acides aminés spécifiques (tryptophane + proline). Hippo peut se lier à et phosphoryler Sav, favorisant la phosphorylation de Wts. Hippo peut aussi phosphoryler Mats, permettant une association Mats-Wts et augmentant l'activité enzymatique de Wts.

Récemment plusieurs kinases régulant l'activité de Hpo/Wts ont été découvertes. La première, nommée Misshappen (homologue MAP4K) régule, en parallèle avec Hpo, la phosphorylation de Wts (Meng et al., 2015). La seconde, Sik (homologue SIK) phosphoryle Sav pour inhiber son association avec Hpo (Fig16) (Wehr et al., 2013).

La forme activée de Wts peut phosphoryler et inactiver le coactivateur transcriptionnel Yorkie (homologue YAP/TAZ) (Huang et al., 2005). Yki n'est pas capable de se lier à l'ADN par lui-même. Dans sa forme active, il a besoin d'un co-partenaire de transcription. Son partenaire favori est Scalloped (Sd) (homologue TEAD) (Campbell et al., 1992)(Zhao et al., 2008)(Goulev et al., 2008). Le complexe Yki-Sd se translocalise au noyau permettant l'expression de nombreux gènes qui vont promouvoir la croissance. Une surexpression de *yki* entraîne une surcroissance par surprolifération et défaut d'apoptose (Fig15D)(Pan, 2007).

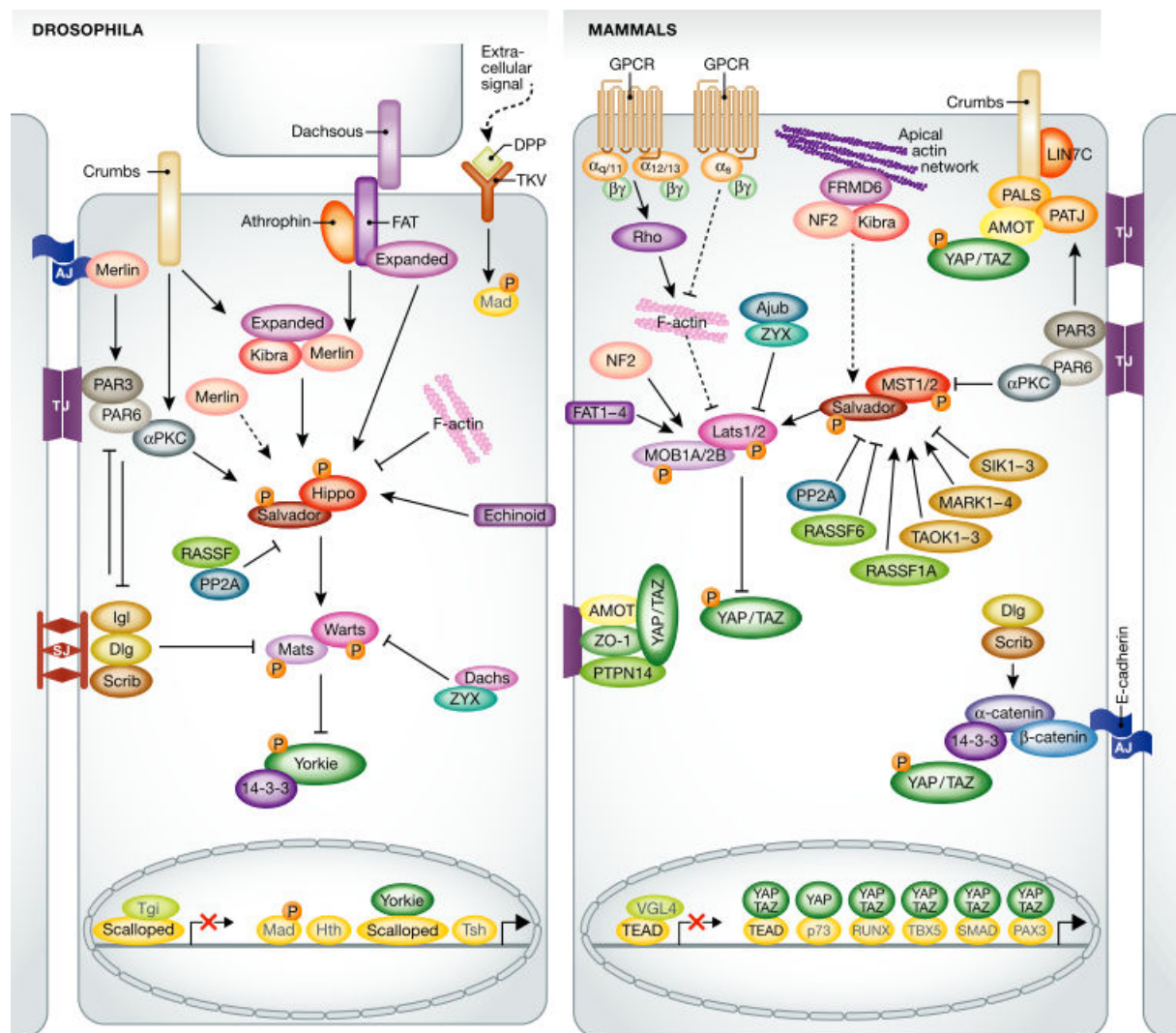


Figure 16 : Complexité de la voie de signalisation Hippo et comparaison Mammifères/Drosophile.

D'après Mo, J.-S., Park, H.W. & Guan, K.-L., 2014. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO report*

b) Rôle des forces mécaniques dans la croissance du disque imaginal d'aile et implication de la voie Hippo

De récents modèles de détermination de la taille finale d'un organe intègre une composante mécanique. Dans ces modèles nommés « rétrocontrôle mécanique », la croissance est tout d'abord induite en réponse à l'action des morphogènes présents au centre du tissu. En conséquence, des forces d'étirements et de compression sont établies, aboutissant à une activation (étirement des couches extérieures) ou à une inhibition (compression du corps central) de la croissance. Lorsqu'un équilibre est atteint entre les forces mécaniques et l'action des morphogènes, la croissance cesse, définissant la taille finale de l'organe (Fig17)(LeGoff et al., 2013).

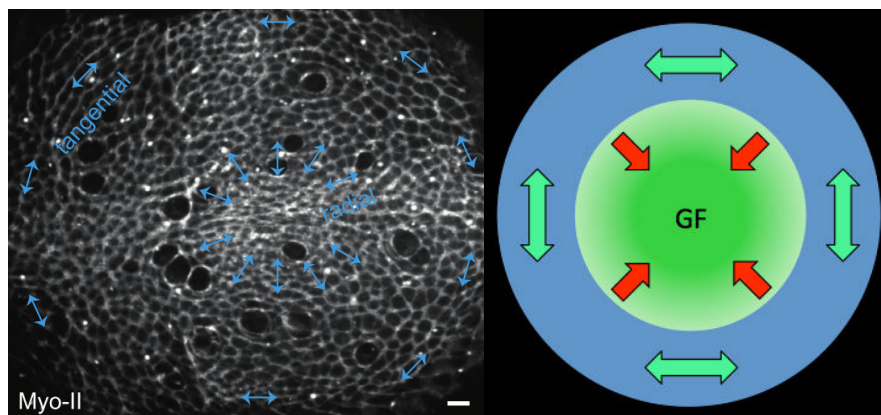


Figure 17 : Visualisation des tensions des filaments de myosine au sein d'un disque imaginal en croissance. Schéma récapitulatif du modèle de rétrocontrôle mécanique d'Aegerter-Wilmsen.

Un facteur de croissance sécrété au centre du disque active la croissance, entraînant un étirement de la périphérie du disque (flèches vertes). Cet étirement périphérique active la croissance périphérique et induit une compression au centre du disque (flèches rouges). La croissance cesse lorsque l'inhibition de croissance induit par la compression dépasse l'effet du facteur de croissance.

D'après LeGoff, L., Rouault, H. & Lecuit, T., 2013. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development*

Un lien doit être fait entre l'état de tension mécanique des tissus et le taux de croissance des cellules pour permettre aux tissus d'atteindre leur taille finale. Une des voies de signalisation intégratrice de l'état de tension des tissus et de leur état de croissance cellulaire est la voie de signalisation Hippo.

Ainsi de récentes expériences ont montré que la localisation cellulaire de YAP/Yorkie est dépendante des contraintes mécaniques reçues par les cellules. Les premières expériences suggérant un lien entre les tensions mécaniques et la localisation subcellulaire de YAP ont été réalisées en cellules et s'apparentent au mécanisme de CIP (contact par inhibition cellulaire).

c) Inhibition de la prolifération lors de contact cellulaire (CIP)

En culture, les cellules ont la caractéristique de cesser de croître lorsqu'elles ont atteint une forte confluence au sein de leur espace alloué de croissance. Ce mécanisme est appelé CIP (contact inhibition prolifération). Le CIP entraîne l'arrêt de la prolifération des épithéliums aboutissant à une différenciation ou à une mort cellulaire. Le mécanisme de CIP passe par la régulation de YAP et TAZ, sous formes nucléaires lorsque la densité cellulaire est faible. YAP/TAZ se délocalisent dans le cytoplasme lorsque la densité cellulaire est élevée (Zhao et al., 2007). Au cours du CIP, la localisation cytosolique de YAP/TAZ (état inactif) est liée à un renforcement des procédés d'adhésions cellulaires et une activation de la voie de signalisation Hippo (Fig18).

Récemment, des études ont montré que la confluence n'est pas le seul facteur influençant l'activité de YAP/TAZ. Le contexte mécanique joue aussi un rôle primordial. Les cellules étirées ont une activité YAP/TAZ renforcée, alors que les cellules de petites tailles et de forme arrondies ont une diminution de l'activité YAP/TAZ (Halder et al., 2012).

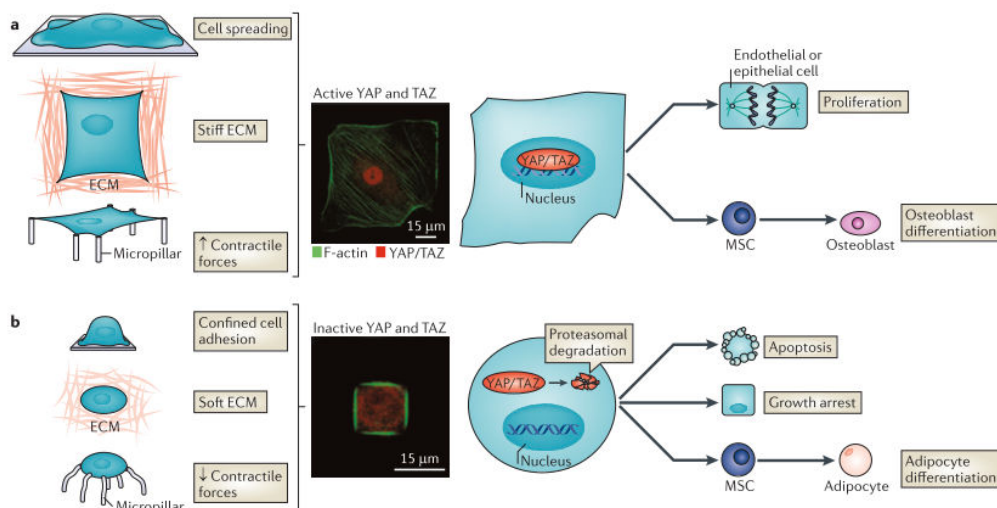


Figure 18 : Transduction des signaux mécaniques par YAP et TAZ.

D'après Halder, G., Dupont, S. & Piccolo, S., 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature reviews. Molecular cell biology*

Un des senseurs majeurs de l'état de tension mécanique d'une cellule est le réseau de filaments d'actine. Plusieurs protéines régulatrices de l'activité de la voie de signalisation Hippo sont associées avec le cytosquelette d'actine.

d) Actine et contractibilité : YAP/TAZ mécanosenseurs et méchanotransducteurs

Le cytosquelette d'actine génère des tensions et une contractilité au sein des cellules. Des cellules cultivées sur un milieu rigide et traitées avec un inhibiteur de la myosine 2, présentent un relâchement de la tension intracellulaire et une relocalisation nucléaire de YAP/TAZ. Réduire la polymérisation des filaments d'actine avec de la latrunculine entraîne une relocalisation cytoplasmique de YAP/TAZ et augmente la phosphorylation de la Sérine 127 (rétention cytoplasmique de YAP par phosphorylation et liaison aux protéines 14-3-3). Des protéines modulant l'activité de l'actine, telles que la Cofiline, CapZ et la Gésoline régulent la localisation nucléaire de YAP/TAZ et l'arrêt de la croissance par inhibition de contact (Aragona et al., 2013).

Des signaux agissant sur des GPCRs (activation $G\alpha_{12-13}$) tels que l'acide lysophosphatidique induisent une translocation nucléaire de YAP/TAZ par inhibition de la kinase LATS réversible lors de l'ajout de la latrunculine. A l'inverse, la protéine $G\alpha_S$ active LATS, inhibant l'activité YAP/TAZ (Yu et al., 2012).

Ces régulations sont dépendantes de la kinase LATS agissant sur le mécanisme de séquestration dans le cytosol de YAP par phosphorylation.

Des récentes études ont montré qu'il existe une régulation indépendante de LATS. RhoA, activateur de la formation du cytosquelette d'actine et de la contractilité de ce réseau d'actomyosine, régule l'activité de YAP/TAZ indépendamment de LATS (Dupont et al., 2011).

YAP est impliqué dans la néphrogénèse. Un mutant nul pour *YAP* présente, chez la souris des glomeruli anormaux, des canaux sans lumen et une vessie dépourvue d'urine. Une inactivation d'une protéine de la famille des Rho GTPase nommée CDC42 dans le rein, mime la perte de fonction de YAP. L'inhibition de *cdc42* entraîne une relocalisation nucléaire de YAP modifiant la morphogénèse du rein (Reginensi et al., 2013).

e) Quelques régulateurs sub apicaux de la voie de signalisation Hippo : Fat/Dachsous et Expanded

De nombreux régulateurs subapicaux de la voie de signalisation Hippo existent. Dans ce paragraphe, je n'aborderai que les régulateurs appartenant au complexe Fat et le trio Merlin/Expanded/Kibra (Genevet and Tapon, 2011)(Yu and Guan, 2013).

La protéine Fat est impliquée dans de nombreux mécanismes tels que la polarité planaire cellulaire (Thomas and Strutt, 2012), les jonctions cellulaires (Bosveld et al., 2012) et la morphogénèse mitochondriale (Sing et al., 2014). Dans ce paragraphe, je focaliserai sur le lien entre Fat-Dachsous et le contrôle de la croissance via la voie de signalisation Hippo.

Les protocadhérines Ft et Ds sont des suppresseurs de tumeurs qui bloquent l'expression des cibles transcriptionnelles de Yorkie (Bennett and Harvey, 2006). Ces deux protéines se comportent comme récepteur et ligand, formant des interactions hétérotypiques (Matakatsu and Blair, 2004). Cette liaison est permise grâce à l'action de Fj, une protéine kinase présente dans l'appareil de golgi qui phosphoryle les domaines cadhérines de Ft et Ds

(Cho and Irvine, 2004). L'expression de *ds* et *ft* se présente sous forme de gradients. Les gradients de Ds ou Ft semblent importants pour l'activation de la prolifération cellulaire et la croissance via la voie Hippo. En effet, un clone formé de cellules à fort niveau de Fj/Ds entouré de faibles niveaux de Fj/Ds induit une prolifération cellulaire et une activation des cibles de la voie Hippo (Cho et al., 2006). A l'inverse, une expression uniforme de Fj/Ds inhibe la prolifération cellulaire (Willecke et al., 2008).

Fat agit aussi directement sur une myosine nommée Dachs, empêchant la dégradation de Wts, aboutissant à l'activation de la voie de signalisation Hippo.

Ft est localisée dans la région subapicale de la cellule, et interagit avec Ex. En effet, des clones mutants *ft* montrent une relocalisation de la protéine Ex. Fat est requis pour une localisation apicale d'Ex. Les fonctions de *ex* et *ft* pourraient être additives.

Expanded (Ex) et Merlin (Mer) appartiennent à la famille des FERM (4.1 protein-Ezrin-Radixin-Moesin) (Hamaratoglu et al., 2006). Cette famille de protéines sert de relais entre les signaux provenant des récepteurs cellulaires de la membrane plasmique et le cytosquelette. Ex et Mer se localisent sur la partie apicale de la cellule et s'associent à une protéine adaptatrice contenant des domaines WW nommée Kibra, pour former un complexe (Genevet et al., 2010). Le complexe Ex-Mer-Kibra interagit directement avec Hpo, localisant la cascade de kinases Hpo/Wts à la membrane plasmique pour faciliter l'inactivation par phosphorylation de Yki. Ce complexe de régulateurs apicaux constitue un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation Hippo. En effet, leurs transcriptions sont activées par Yki. Des clones mutants pour *hpo*, *sav*, ou *wts* présentent une augmentation des niveaux d'expression des gènes *kibra*, *ex*, et une accumulation des protéines Kibra, Ex, et Mer (Genevet et al., 2010). La régulation des protéines Ex, Kibra et Merlin n'est pas documentée. Crb et Fat régulent les niveaux d'Ex. La localisation de Crb dépend de ses interactions avec les cellules voisines. Crb régule Ex en fonction des contacts établis avec les cellules voisines (Hafezi et al., 2012). Récemment, il a été montré que Mer recrute Wts à la membrane pour faciliter son activation par Hippo. Ce recrutement est dépendant de la densité cellulaire et du réseau de filaments d'actine (Yin et al., 2013). Mer est donc un candidat idéal pour intégrer le niveau des forces mécaniques, l'état du réseau de filaments d'actine et influencer l'inhibition ou l'activation de la croissance via la voie de signalisation Hippo.

f) Cibles régulées par YAP/TAZ et Yki

Le duo Yki/Sd induit la transcription de plusieurs cibles transcriptionnelles telles que *myc*, *cycE*, *diap*, *bantam*. *CycE* régule positivement le cycle cellulaire. Diap1 (Protéine inhibitrice de l'apoptose chez la drosophile) prévient l'apoptose grâce à sa capacité à inhiber les caspases, une famille de protéases impliquées dans l'induction du signal de mort cellulaire.

Yki active la transcription de Bantam, un micro ARN, régulateur positif de la croissance qui régule la prolifération et la survie cellulaire.

Yki régule la transcription de *myc*, un promoteur de la synthèse ribosomale et de la croissance cellulaire (Neto-Silva et al., 2010)(Ziosi et al., 2010). Myc, impliqué dans la

compétition cellulaire, favorise la sélection des cellules à la croissance rapide au détriment des cellules à la croissance lente.

Chez les mammifères, d'autres copartenaires de transcription possédant un domaine PPXY sont capables de se lier au domaine WW de YAP/TAZ, tels que Smad1 (facteur de transcription *dpp*), RUNX (différenciation des cellules souches hématopoïétiques), ErbB4 (récepteur épidermal facteur de croissance) et p73 (tumeur suppresseur relié à p53) pour YAP et RUNX, PPAR γ (récepteur nucléaire agissant sur les fonctions métaboliques), Pax3 (fermeture du tube neural), TBX5 (développement du cœur) et TTF-1 (facteur de transcription régulant des gènes spécifiques de la thyroïde, et du développement pulmonaire) pour TAZ (Zhao et al., 2011b).

La grande diversité des facteurs de transcription capables de se lier à YAP/TAZ/Yki montre la diversité de fonctions de la voie de signalisation Hippo. L'activité transcriptionnelle de Yki doit être strictement contrôlée, plusieurs mécanismes permettent d'inhiber les fonctions de Yki.

g) Inhibition de l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ et Yki

Plusieurs mécanismes inhibent l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ/Yki, soit en le bloquant dans le cytoplasme, soit en le dégradant.

La phosphorylation de Yki par Wts au niveau de la sérine 168 (ou sérine 127 chez les mammifères), favorise la liaison de Yki avec les protéines 14-3-3, qui vont bloquer Yki dans le cytoplasme et empêcher son transport jusqu'au noyau (Ren et al., 2010).

Les protéines YAP/TAZ/Yki possèdent un domaine WW capable de se lier au domaine PPXY. Les protéines Ex, Hpo et Wts possèdent ce domaine PPXY et sont capables de séquestrer Yki dans le cytoplasme, puis de le séquestrer à la membrane, limitant la croissance cellulaire (Badouel et al., 2009). Chez les mammifères, les protéines AMOT et α -caténine sont capables de fonctionner selon des mécanismes similaires (Zhao et al., 2011a).

Un processus d'ubiquitylation et de dégradation permet aussi d'inhiber l'activité de TAZ.

h) Taiman, corégulateur de Yorkie et du récepteur de l'ecdysone, active la croissance via la voie Hippo

Lorsque la voie de signalisation Hippo est dérégulée, la croissance des disques imaginaux devient excessive. L'équipe du Dr Moberg a montré que cette surcroissance peut être hormono-dépendante (ecdysone).

Taiman, coactivateur du récepteur à l'ecdysone, joue un rôle sur la croissance des tissus imaginaux. De plus, Taiman interagit directement avec Yki et EcR. Une forme mutée de Taiman, incapable de se lier à Yki, limite l'hyperplasie tissulaire dépendante de Yki. Une partie des cibles classiques de la voie de signalisation Hippo, telles que *ex* ou *cyclin E* sont régulés par Yki indépendamment de Taiman.

A l'inverse, certains gènes cibles de la voie Hippo sont partiellement dépendants de Taiman, tels que *piwi*, *nanos* et *dilp8*. Les gènes *piwi* et *nanos* sont impliqués dans la prolifération des cellules souches germinales.

La croissance hyperplasique induite par Yki dans les tissus imaginaux en présence de Taiman mime un programme transcriptionnel de type cellules souches germinales. De façon intéressante, la transcription de *dilp8* est partiellement régulée par Taiman. Dans des conditions de croissance hyperplasique, la présence de Dilp8 pourrait inhiber la croissance des tissus périphériques, facilitant la croissance du tissu hyperplasique. La fonction de *dilp8* serait donc bénéfique dans le cas d'un retard de croissance d'un des disques mais pourrait être délétère, dans le cas de surcroissance d'un des disques.

i) Hippo et cancer

Les tumeurs utilisent les propriétés biologiques de la voie de signalisation Hippo pour prospérer, favorisant leur prolifération, leur capacité invasive et leur pouvoir métastatique. L'étude d'échantillons biologiques humains a montré que des tumeurs telles que celle du côlon, du foie, de l'œsophage, des seins, de l'appareil reproducteur présente une dérégulation de l'activité des protéines YAP et TAZ (Steinhardt et al., 2008; Dong et al., 2007). En effet, les fonctions de ces protéines possèdent les caractéristiques typiques des cellules cancéreuses : prolifération incontrôlée, absence d'apoptose, et réactivation des cellules souches cancéreuses quiescentes. Les mécanismes par lesquels des cellules normales deviennent tumorales sont méconnus. Ils impliquent probablement l'acquisition de caractéristiques des cellules cancéreuses telles qu'une transition épithélium-mésenchyme, une résistance aux drogues, et une diminution de la sénescence.

Il a été montré récemment que la voie Hippo pourrait être requise pour la formation des cellules souches cancéreuses. Dans le cas du cancer du sein, TAZ stimule la formation des cellules souches cancéreuses *in vitro* (Cordenonsi et al., 2011). Dans des cellules MCF10A, la surexpression de TAZ potentialise la formation d'amas de cellules mammaires nommés mammosphère. De plus, TAZ augmente la proportion des cellules MCF10A adoptant un profil de cellules souches cancéreuses. A l'inverse, une perte de fonction pour TAZ empêche la formation de mammosphère. Chez l'humain, dans 85% des cancers du sein, TAZ est surexprimé. TAZ joue donc un rôle important dans l'initiation et la progression des cancers du sein.

j) Hippo et régénération

La voie de signalisation Hippo est impliquée dans la réparation des tissus lésés et la régénération. De façon intéressante, le poisson zèbre est capable de réaliser une régénération à l'identique de sa nageoire caudale après blessure (Poss et al., 2000). Cette régénération se déroule en 3 étapes, tout d'abord une cicatrisation, puis la formation d'un blastème et enfin une croissance tissulaire compensatrice. Récemment, Jacinto a montré que YAP est nucléaire dans l'ensemble de la nageoire caudale au cours de ces 3 étapes à l'exception de la région distante au site de régénération (Mateus et al., 2015). En jouant avec les niveaux de YAP, ils

ont pu montrer que YAP contrôle la prolifération cellulaire et la transcription de gènes cibles de la régénération tels que *fgf20a*, *lefl*, *shh* et *dkk1b*. De plus, la localisation nucléaire de YAP coïncide avec des changements de morphologie et de densité cellulaire. Ainsi l' α -caténine s'accumule dans les régions éloignées du blastème. YAP est alors cytoplasmique. A l'inverse, détruire le réseau de filaments d'actine (injection de JASP) entraîne une translocation nucléaire de YAP. Ces expériences suggèrent qu'un mécanisme de méchanotransduction couplant les changements de morphologie cellulaire, et l'état du cytosquelette contrôle la régénération tissulaire via un contrôle de la localisation cellulaire de YAP.

Chez la drosophile, l'équipe du Dr Duronio a montré que Yki et son copartenaire Sd sont requis pour le retour dans le cycle cellulaire des cellules quiescentes après une lésion de l'œil. En réalisant un crible génétique, ils ont pu montrer que lors d'une lésion de l'œil, Sd est nécessaire pour la prolifération cellulaire compensatoire. Yki, en se liant à Sd induit l'expression de *cyclineE*, forçant l'entrée en phase S des cellules quiescentes. L'équipe a aussi montré que cette entrée en phase S est dépendante d'Ajuba. Ajuba, senseur de l'état apoptotique des cellules, va promouvoir l'activité du duo Yki/Sd permettant une prolifération compensatoire et une réparation tissulaire (Meserve and Duronio, 2015).

La régénération est la capacité du disque à retrouver sa taille, sa forme et fonction initiale suite à une lésion. Cette capacité suggère que les tissus en cours de développement comme les tissus régénératifs sont capables de mesurer ces différents paramètres, et de les intégrer afin de maintenir une stabilité développementale.

En 2012, l'équipe du Dr Pan a montré qu'une surexpression de YAP transitoire entraîne une hépatomégalie via une augmentation du nombre de cellules sans augmentation de la taille des cellules. Lors de l'arrêt de la surexpression de YAP, le foie retrouve une taille normale confirmant un rôle majeur de la voie Hippo dans le contrôle de la taille de l'organe chez les mammifères et le maintien des hépatocytes dans un statut quiescent (Fig19)(Dong et al., 2007).

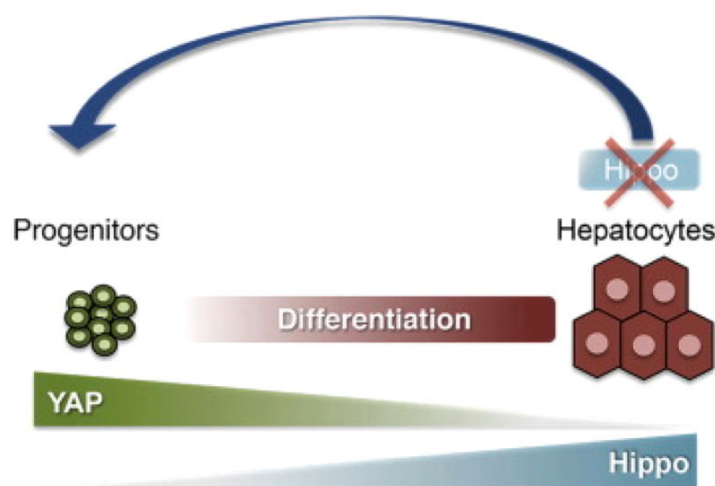


Figure 19 : Implication de la voie de signalisation Hippo dans la régénération du foie.

Une inactivation de la voie de signalisation Hippo est suffisante pour permettre un dédifférenciation des hépatocytes en cellules progénitrices capables d'une régénération hépatique.

D'après Yimlamai, D, Christodoulou, C, Galli, GG, Yanger, K, Pepe-Mooney, B, Gurung, B, Shrestha, K, Cahan, P, Stanger, BZ, Camargo, FD. 2014. Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate. Cell

Des chercheurs de l'institut de recherche sur les cellules souches à Boston, dirigés par le Dr Camargo, ont montré qu'il est possible de guérir un foie atteint d'une maladie chronique en forçant les cellules à retourner à l'état de cellules souches. Le Dr Camargo a montré que l'inactivation de la voie de signalisation Hippo dans des cellules matures de foie entraîne une forte dé-différenciation (Yimlamai et al., 2014). Les cellules du foie redeviennent unipotentes, formant des progéniteurs endodermaux capables de régénérer le foie lésé (Mo et al., 2014).

Dans cette partie, j'ai introduit la notion de croissance intrinsèque et extrinsèque. Ces deux croissances interviennent dans les mécanismes de croissance autonome des organes. Cependant la croissance autonome des différents organes doit être coordonnée pour donner naissance à un individu aux proportions correctes.

Je développerai donc dans la prochaine partie les mécanismes impliqués dans le contrôle de la coordination de la croissance et de l'horloge développementale ainsi que les mécanismes de coordination de la croissance inter-organes.

IV. Coordination de la croissance

1. Coordination de la croissance et de l'horloge développementale

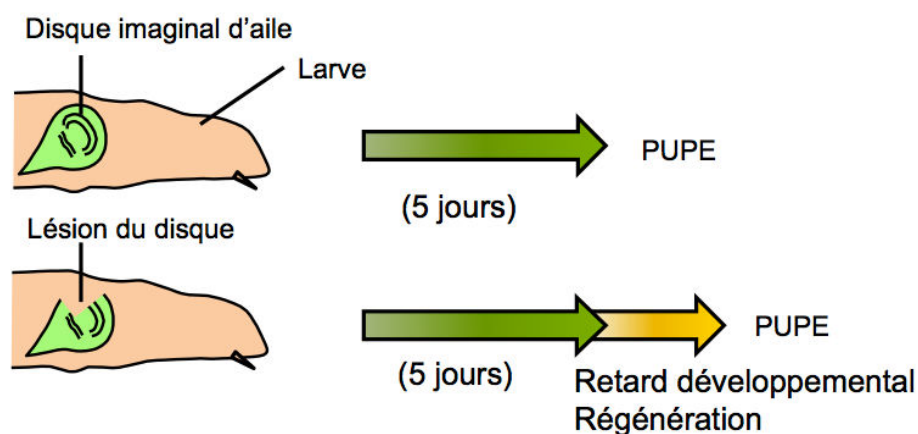


Figure 20 : Lésion d'un disque imaginal et régénération.

D'après Bryant, PJ, Simpson, P. 1984. Intrinsic and Extrinsic Control of Growth in Developing Organs. Q. Rev. Biol

Une altération de la croissance du disque imaginal d'aile par chirurgie ou par modifications génétiques entraîne un retard développemental. Ce retard permet au disque de poursuivre sa croissance, compensant son état d'immaturité. Lorsque le disque a une plus

longue période pour se développer dans son environnement larvaire, il ne forme pas un organe plus grand, confirmant qu'un mécanisme de contrôle de la taille stoppe la croissance à la taille appropriée, prévenant une surcroissance des disques (Fig20) (Martín and Morata, 2006) (Simpson and Morata, 1980). (Bryant and Simpson, 1984).

Le retard induit par une lésion du disque entraîne un retard dans l'expression des signaux circulants contrôlant les transitions développementales.

Chez les insectes, les transitions développementales sont contrôlées principalement par facteurs circulants régulés par le système neuroendocrine, l'hormone prothoracicotropique (PTTH), l'hormone juvénile (JH) et l'ecdysone. Le rôle de l'hormone juvénile étant assez méconnu chez la drosophile, je me concentrerai principalement sur le lien entre la PTTH et l'ecdysone.

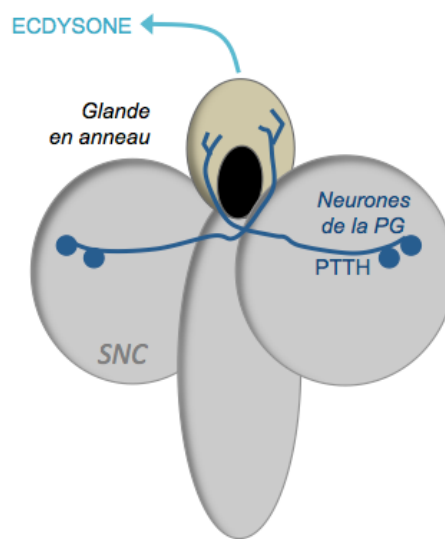


Figure 21 : Le système neuroendocrine simplifié chez la drosophile.

Produit par deux paires de neurones du cerveau projetant dans la glande en anneau, PTTH est un neuropeptide (Fig21). PTTH entraîne la sécrétion d'une hormone stéroïde, l'ecdysone, métabolisée au niveau du corps gras en sa forme active la 20-hydroxyecdysone (20E). Une forte augmentation du niveau d'ecdysone entraîne prématurément une entrée en métamorphose (Garen et al., 1977).

A des stades précis au cours du développement, en réponse à des stimuli environnementaux, des pics de la neurohormone prothoracicotropique (PTTH) contrôlent les transitions développementales. Ce neuropeptide entraîne la sécrétion par la glande anneau de l'hormone stéroïde ecdysone dans l'hémolymphe. Cette sécrétion sous forme de pics coordonne le développement postembryonnaire contrôlant les mues et l'initiation de la métamorphose. Le faible pic d'ecdysone présent à la fin des stades larvaires 1 et 2 entraîne une mue de la cuticule larvaire, s'adaptant à l'augmentation de la taille de l'animal.

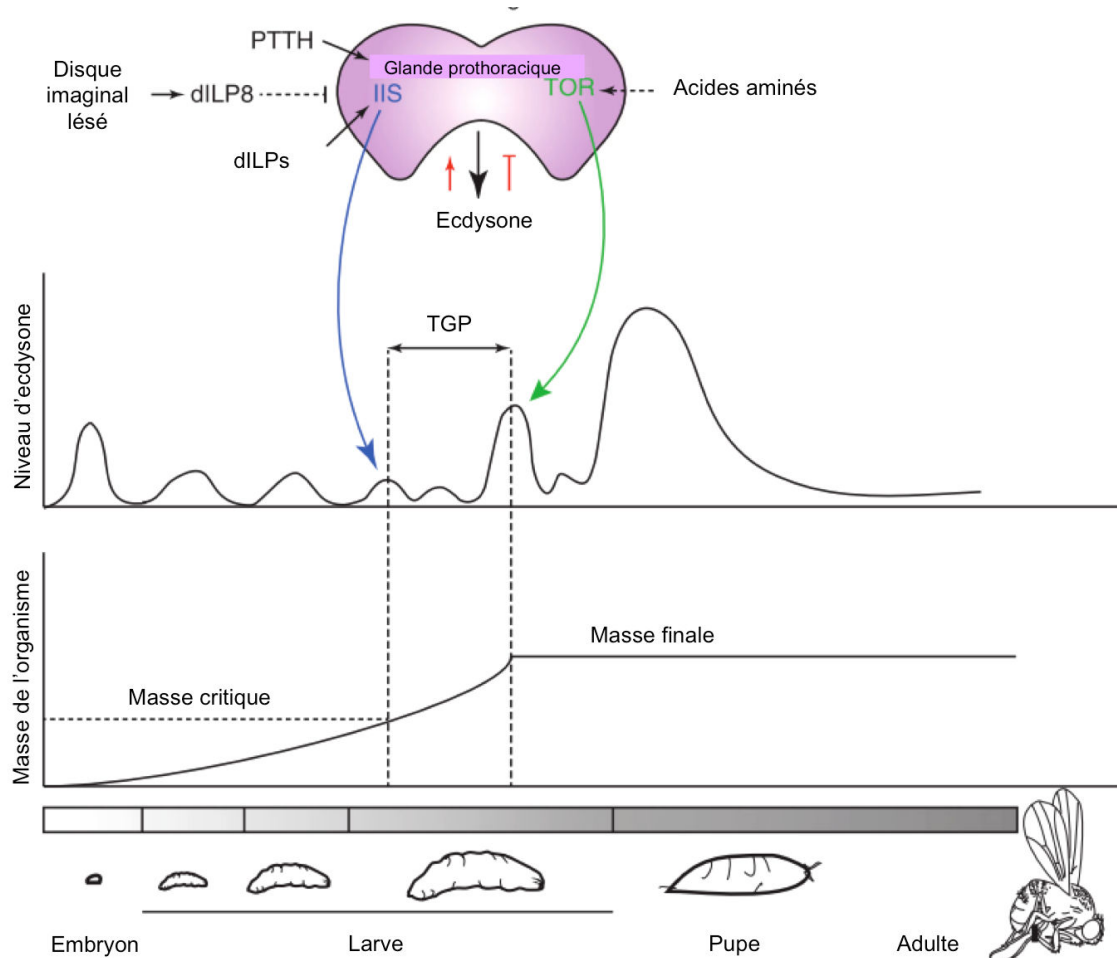


Figure 22 : Pics hormonaux contrôlant l'horloge développementale.

Des pics de sécrétion de faible amplitude d'ecdysone contrôlent les transitions larvaires. Un pic élevé induit l'entrée en pupaison.

D'après Gokhale, RH, Shingleton, AW. 2015. Size control: the developmental physiology of body and organ size regulation. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol

Ensuite, une série de faibles pics d'ecdysone pendant le 3^{ème} stade larvaire prépare l'animal pour sa métamorphose en induisant des changements comportementaux et développementaux (Warren et al., 2006), tels que l'arrêt de l'alimentation, le début du comportement d'errance le long des parois du tube, la synthèse de protéine glue par les glandes salivaires et l'initiation de l'autophagie du corps gras (Rusten et al., 2004)(Scott et al., 2004). A la fin du 3^{ème} stade larvaire, un pic élevé d'ecdysone déclenche l'entrée en pupaison, l'arrêt de la croissance et le début de la métamorphose (Gokhale and Shingleton, 2015)(Fig22).

La chute de l'hormone juvénile semble être permissive à une forte expression de PTTH. Cependant, l'ablation de la corpora allata, la glande responsable de la synthèse de l'hormone juvénile, n'altère pas la taille critique minimale et n'accélère pas la métamorphose (Riddiford et al., 2010). De nombreuses études récentes s'accordent sur la présence d'autres

facteurs agissant sur la glande prothoracique (PG) permettant la coordination de la synthèse et sécrétion d'ecdysone, telles que les voies de signalisation TOR et Insuline. Ces 2 voies sont impliquées dans l'évaluation de la masse critique et la détermination de la taille finale de l'adulte (Colombani et al., 2005)(Gibbens et al., 2011).

Le contrôle systémique de la croissance par des facteurs humoraux tels que les Dilps semble être essentiel pour la coordination de la croissance des organes en réponse à des perturbations extérieures telles qu'une réduction de la disponibilité en nutriments au cours du développement. Toutefois, lorsque la perturbation est interne et localisée, les Dilps « centraux » ne suffisent pas pour coordonner la croissance des disques imaginaux avec l'horloge développementale. Pour faire face à une perturbation locale de la croissance, le retard développemental du disque imaginal affecté doit être évalué et signalé aux autres organes de l'organisme. Les larves possédant un disque imaginal d'aile affecté retarde la transition développementale, permettant au disque lésé de se régénérer (Simpson et al., 1980)(Stieper et al., 2008)(Halme et al., 2010). Le signal envoyé par le disque lésé supprime la synthèse d'ecdysone, en retardant la production de PTTH (Halme et al., 2010). Les disques imaginaux non affectés ne surcroissent pas pendant cette période extensive de croissance (Parker and Shingleton, 2011).

L'ecdysone contrôle la durée de la période de croissance. L'ajout d'ecdysone sauve le retard développemental induit lors de la lésion d'un disque imaginal d'aile et lève l'inhibition de la croissance sur les disques non affectés (Parker and Shingleton, 2011), confirmant que l'ecdysone est un facteur limitant pour l'avancement du développement de la larve et la croissance des organes lorsqu'un disque d'aile est lésé. Ces données montrent que l'ecdysone régule l'horloge développementale ainsi que la croissance des disques imaginaux. Une récente étude réalisée par l'équipe du Dr Barrio montre que la réduction des taux d'ecdysone altère la croissance des organes, affectant la croissance cellulaire et la prolifération sans augmenter la mort cellulaire. A l'inverse une surexpression de 4EBP augmente la croissance des tissus imaginaux (Herboso et al., 2015). De plus, cette étude montre que l'ecdysone activerait la croissance des disques imaginaux de façon 4EBP dépendante.

L'ecdysone est impliquée dans différents points de contrôle développementaux qui régule l'horloge développementale et permet à l'organisme de s'adapter aux différentes conditions environnementales.

2. Coordination de la croissance des organes

Le maintien de la taille des différents organes en proportion avec la taille finale de l'organisme est un processus développemental complexe nommé coordination inter-organes. Précédemment, il a été montré que réduire artificiellement le taux de croissance d'un type de disque imaginal retarde la croissance des autres disques et le programme développemental. Ralentir, par exemple, la croissance du disque imaginal d'aile entraîne le ralentissement de la croissance du disque imaginal de la patte (Fig23). Les disques imaginaux grandissent à des

taux de croissance différents, cependant ces taux de croissance sont coordonnés (Parker and Shingleton, 2011).

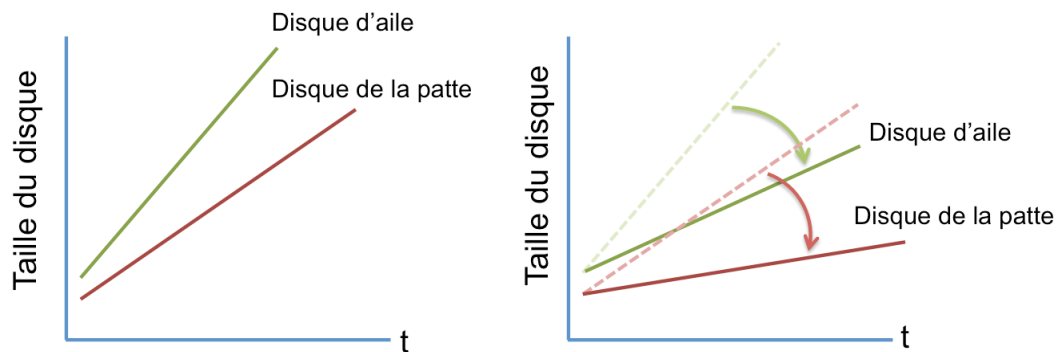


Figure 23 : Coordination de la croissance des disques.

Le taux de croissance du disque d'aile est représenté en vert, celui de la patte en rouge.

Les disques d'aile et de patte n'ont pas le même taux de croissance. Ralentir la croissance du disque d'aile entraîne un ralentissement de la croissance du disque de patte

Récemment, il a été montré que la coordination inter-organes peut être contrôlée par l'ajout d'ecdysone de façon exogène, suggérant que de faibles taux d'ecdysone sont responsables de la coordination inter organes (Herboso et al., 2015).

Une étude réalisée par le Dr Halme a montré que la voie de signalisation NOS participe à la coordination de la croissance entre organes. En effet, lorsque la croissance d'un ensemble de disques est affectée par irradiation, la croissance des tissus non affectés est ralentie. La voie de signalisation NOS limite la croissance du tissu non affecté en réduisant la biosynthèse de l'ecdysone. Le disque affecté exprime *dilp8*, induisant un retard développemental indépendant de la voie de signalisation NOS. La sensibilité du disque affecté est très probablement modulée afin de poursuivre une croissance efficace en présence d'une diminution du taux d'ecdysone systémique (Jaszczak et al., 2015).

Notion de bruit développemental

L'asymétrie fluctuante est une déviation par rapport à une symétrie parfaite. Elle provient d'une symétrie intermédiaire obtenue entre le bruit développemental, qui écarte l'organisme de la symétrie parfaite, et la stabilité développementale qui réduit cet effet (Debat and Peronnet, 2013).

En 2011, les équipes de Debat et Peronnet ont montré que la surexpression ou l'inactivation du gène de la *cycline G* produisent une asymétrie chez les animaux à symétrie bilatérale, tels que la drosophile (Debat et al., 2011). Affecter la régulation du cycle cellulaire aboutit à une élévation du niveau de bruit développemental. Curieusement, les mécanismes de mort cellulaire sont aussi indispensables pour maintenir une stabilité développementale. Des ailes mutantes pour le gène *Hid* deviennent asymétriques (Fig24)(Neto-Silva et al., 2009).

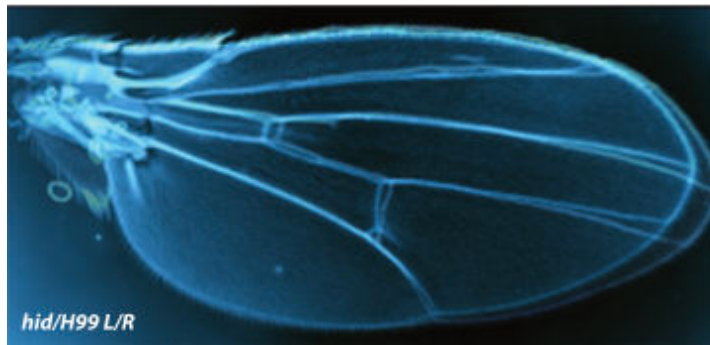


Figure 24 : L'apoptose indispensable pour maintenir une stabilité développementale : les mutants pour le gène *Hid* sont asymétriques.

D'après Neto-Silva, RM, Wells, BS, Johnston, LA. 2009. Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. Annu. Rev. Cell Dev. Biol

L'étude comparative des ailes droite et gauche permet l'observation, dans certains cas, d'une asymétrie bilatérale, reflet d'une stabilité développementale affectée. Pour quantifier cette asymétrie, j'ai utilisé un index appelé FAi pour index de l'asymétrie fluctuante. Pour calculer cet index, il faut mesurer la surface des ailes droite et gauche de chaque mouche. En utilisant ces valeurs de surface, on applique la formule suivante : $FAi = \sqrt{\frac{S^{aile\ droite} - S^{aile\ gauche}}{S^{aile\ droite} + S^{aile\ gauche}}}$. Cette formule traduit la variance de la valeur absolue de la différence de surface des ailes droite et gauche.

V. Dilp8, une nouvelle hormone de la coordination

Plusieurs pathologies peuvent entraîner chez l'homme des retards de croissance, une malnutrition, une déficience en hormones de croissance, un excès de corticostéroïdes ou encore une croissance restreinte au cours de la période de croissance intra-utérine. Une croissance de compensation se met en place. Elle consiste en une accélération de la vitesse de croissance de l'organe par rapport au stade développemental où il se situe mais pas par rapport à son état de maturation. L'organe continue donc à grandir pendant une période étendue alors que les individus contrôles ont cessé leur croissance.

Des molécules sont donc capables de contrôler l'horloge développementale et la croissance afin de s'assurer que chaque organe a atteint sa taille finale. Quelles sont les molécules qui contrôlent les transitions développementales chez la drosophile ?

1. Dilp8 et le contrôle de l'horloge développementale

Lorsque l'on affecte la croissance des tissus imaginaux chirurgicalement ou génétiquement, un retard développemental se met en place (Bryant and Simpson, 1984). Les tissus, dont le programme de croissance n'est pas terminé, doivent se synchroniser avec les autres organes larvaires avant la transition vers le stade pupal (Stieper et al., 2008)(Halme et al., 2010).

En l'absence de disques, des larves s'empupent sans aucun retard développemental, ce qui suggère que le signal sécrété par les organes lésés est inhibiteur. Ce signal inhibiteur prévient l'entrée en pupaison tant que les disques n'ont pas atteint le stade de maturation attendu. Curieusement, la nature de ce signal est restée très longtemps inconnue.

Un crible génétique a été réalisé au sein du laboratoire, dont le but était l'identification de gènes impliqués dans le retard de développement induit par une perturbation de croissance des disques imaginaux. Deux lignées génétiques ont été générées. Au sein d'une première lignée, l'inhibition du gène *avalanche*, impliqué dans les mécanismes précoces d'endocytose, entraîne la formation de surcroissances tissulaires appelées néoplasmes. Au sein d'une deuxième lignée, l'inhibition d'un gène *rpl7* codant pour une protéine ribosomique aboutit à un retard de croissance. 11000 gènes ont été testés pour leur capacité à sauver le phénotype de retard développemental induit dans le disque imaginal d'aile par l'inhibition des gènes *avalanche* et *rpl7*.

Ce crible a permis d'identifier le gène *dilp8*, une hormone de la famille des insulines/relaxines impliquée dans le lien entre l'horloge développementale et la maturation. L'équipe a pu montrer que *dilp8* inhibe la croissance tissulaire pour permettre une régénération du disque fragilisé. Au sein de disques dont la croissance est affectée génétiquement ou chirurgicalement, *dilp8* est surexprimé, agissant sur le système nerveux central pour inhiber la synthèse de l'ecdysone, empêchant la progression vers le stade pupal (Colombani et al., 2012) (Garelli et al., 2012).

2. Lien entre *dilp8*, l'ecdysone et le contrôle de la taille

Dilp8 est impliqué dans le contrôle de l'horloge développementale agissant sur la synthèse d'ecdysone. La réduction des niveaux de *dilp8* n'est pas suffisante pour engendrer une métamorphose prématurément, confirmant que Dilp8 est un signal permissif pour la poursuite du programme de croissance. L'expression de *dilp8* suggère que ce gène pourrait être lié au point de contrôle de la masse critique. Une chute de l'expression de *dilp8* intervient aux alentours de 80h après la ponte, période à laquelle la larve a déjà atteint sa masse critique (Fig25) (Stieper et al., 2008). Le SNC pourrait donc percevoir cette chute du niveau de Dilp8 systémique et en conséquence permettre la poursuite du développement. A l'inverse, lors de lésions des disques imaginaux, une élévation de la quantité de Dilp8 présent dans l'hémolymph bloque la poursuite du programme temporairement, permettant une réparation du disque avant d'entrer dans le prochain stade développemental. *dilp8* semble être un signal permissif. En effet, même en l'absence de tissus imaginaux, la larve entre en pupaison (Rewitz et al., 2013).

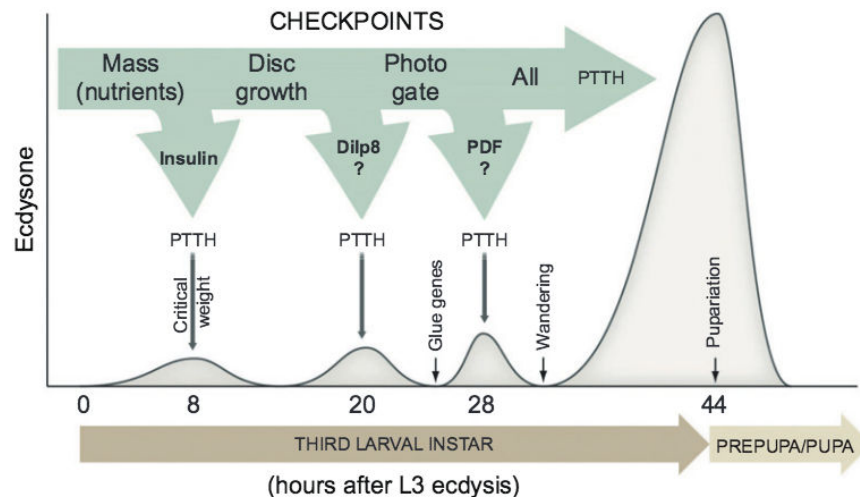


Figure 25 : *dilp8* impliqué dans le point de contrôle de la taille des disques imaginaux.

Un point de contrôle se situant aux alentours de 80h après formation de l'embryon vérifie que les disques imaginaux ont atteint une taille minimale pour permettre la poursuite du développement. L'expression de *dilp8* est particulièrement élevée à ce stade, suggérant que l'accumulation de Dilp8 pourrait agir comme un signal permissif de poursuite du programme développemental.

D'après Rewitz, K.F., Yamanaka, N. & O'Connor, M.B., 2013. *Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation*

Actuellement, le mécanisme d'action de *dilp8* sur le système nerveux central (SNC) est méconnu. *dilp8* semblerait agir sur le système endocrinien pour réprimer la synthèse ou la sécrétion d'ecdysone (Fig 26).

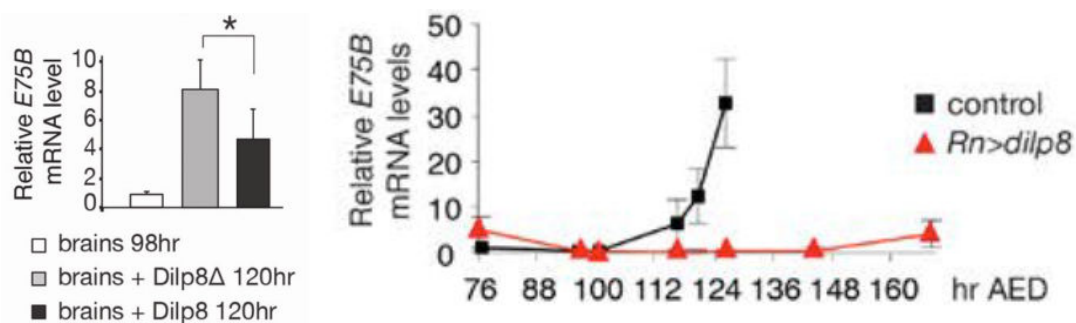


Figure 26 : *dilp8* réprime l'expression de l'ecdysone

D'après Colombani, J., Andersen, D.S. & Léopold, P., 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. *Science*

La surexpression de *dilp8* prolonge la période larvaire d'environ 3 jours. L'absence de PTTH ou de son récepteur Torso entraîne un retard similaire (Rewitz et al., 2009)(McBrayer et al., 2007). De plus, la surexpression de *dilp8* comme l'inhibition de PTTH retarde, mais ne bloque pas, l'entrée en métamorphose.

dilp8 pourrait agir sur la voie de signalisation de PTTH à plusieurs niveaux, sa production, sa disponibilité, ou sa transformation en une forme active. *dilp8* pourrait aussi agir sur la capacité de la PG à répondre à PTTH, en modulant la production de son récepteur Torso ou son activité. Une étude a montré qu'inhiber la croissance du disque par irradiation conduit à une réduction de l'expression de PTTH dans la PG (Halme et al., 2010). Cette étude suggère que *dilp8* pourrait agir en diminuant la synthèse de PTTH par les neurones projetant à la PG limitant la production d'ecdysone. Une quantité suffisante de *dilp8* produit par le disque imaginal prévient la production d'ecdysone et retarde la maturation. Comment *dilp8* agit-il sur le SNC ?

3. Dilp8 et son récepteur Lgr3 : circuit cérébral contrôlant l'horloge développementale

La récente découverte du récepteur de Dilp8 a permis de mieux comprendre son action sur le SNC. Dilp8 appartient à la famille des insulines/relaxines et ne semble pas agir au niveau du récepteur unique à l'insuline, l'InR. Un crible génétique au sein du laboratoire a été réalisé dans le but de découvrir le récepteur de Dilp8. Lors de la réalisation de ce crible, Dilp8 est surexprimé dans les tissus imaginaux provoquant un retard développemental. L'inhibition du récepteur de Dilp8 dans le tissu cible doit sauver ce retard développemental. En effet, des expériences de coculture réalisées avec des cerveaux entiers et une forme active de Dilp8 ou une forme inactive Dilp8 Δ , ont permis de montrer une augmentation des niveaux d'ecdysone produit par le cerveau en présence de Dilp8. En présence d'une forme inactive Dilp8 Δ , la production d'ecdysone n'est pas augmentée par rapport à la condition contrôle (cerveau seul). Cette expérience a permis de conclure que le tissu responsable du contrôle de l'horloge développementale par Dilp8, est le cerveau. Le crible a donc été réalisé avec 3 lignées Gal4 différentes, permettant une inhibition de Lgr3 dans la PG, les neurones et la glie. Ce crible a permis d'identifier Lgr3, l'un des deux récepteurs orphelins de la famille des relaxines. *dilp8* pourrait donc agir via un mécanisme plus proche de celui des relaxines que des insulines.

Le récepteur Lgr3 s'exprime dans une paire bilatérale de neurones nommés Growth Coordinating Lgr3 (GCL). Les neurones GCL ne projettent pas directement sur la PG. Ils jouent le rôle d'intermédiaire dans le circuit contrôlant la production d'ecdysone. Les neurones GCL ont une arborisation axonale dense et entourent les projections dendritiques des neurones PTTH. Les neurones PTTH projettent leurs axones sur la PG et contrôlent la production d'ecdysone par l'activation du récepteur Torso des cellules de la PG. Une expérience de GRASP a permis aussi de conclure à une proximité physique entre les neurones GCL et les neurones PTTH, suggérant qu'ils pourraient être des partenaires synaptiques. Ces résultats suggèrent que les neurones GCL contrôlent la synthèse d'ecdysone en modulant l'activité des neurones PTTH, et/ou le relargage et la production de PTTH (Colombani et al., 2015)(Garelli et al., 2015)(Vallejo et al., 2015)(Jaszczak et al., 2015).

4. Lien entre *dilp8* et l'état de croissance des tissus

a. Réponse au stress tissulaire *JNK/dilp8*

Au cours de différents stress environnementaux, la voie de signalisation JNK est activée. Dans les conditions *avalanche* et *rpl7*, JNK est induit (induction du rapporteur d'activation de la voie *puc-lacZ*). Une réduction de l'activité de la voie JNK dans les conditions *avalanche* et *rpl7*, en utilisant une surexpression de *puc* est suffisante pour réduire l'augmentation des niveaux d'ARNm de *dilp8* (Colombani et al., 2012).

En présence d'un stress chronique du réticulum endoplasmique induit par la *Preselinin*, la voie de signalisation JNK est activée dans les cellules apoptotiques via un mécanisme dépendant de PERK/ATF4. Cette induction de la voie JNK se traduit par un retard développemental dépendant de *dilp8* permettant un remplacement des cellules apoptotiques (Demay et al., 2014).

Lors de la lésion physique d'un disque en cours de développement, la régénération se met en place activant les voies de signalisation JNK et JAK/STAT. *Dilp8* est surexprimé, provoquant un retard d'entrée en pupaison, permettant au disque lésé de se régénérer (Fig27).

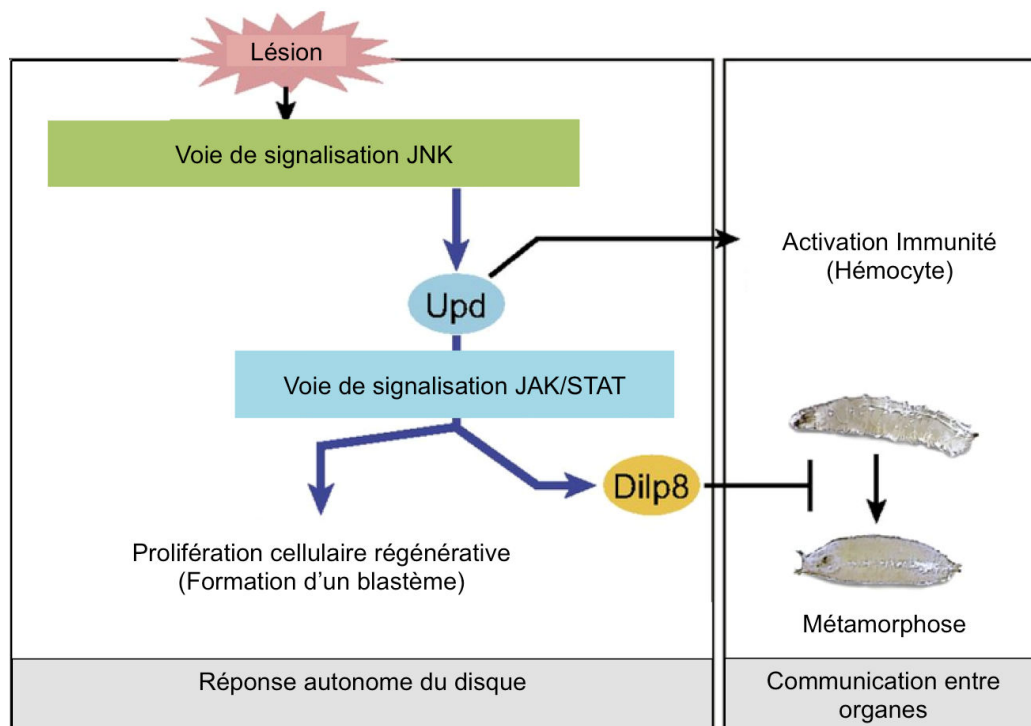


Figure 27 : Régulation de *dilp8* par la voie JAK/STAT lors des processus de régénération.

Face à une lésion, un processus de régénération dépendant des voies de signalisation JNK et JAK/STAT se met en place. Le ligand Upd est fortement sécrété entraînant l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT contrôlant l'expression de *dilp8*. L'induction de *dilp8* produit un retard développemental nécessaire à la régénération du tissu lésé.

D'après Katsuyama, T. et al., 2015. During Drosophila disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proceedings of the National Academy of Science*

Une lésion effectuée sur un disque mutant pour la protéine JAK encodée par le gène *hop* ne montre pas de surexpression de l'ARNm de *dilp8* par hybridation in situ. L'induction de *dilp8* dans un contexte de régénération pourrait donc être dépendante de la voie de signalisation JAK/STAT en aval de JNK (Katsuyama et al., 2015).

En présence d'une tumeur de type *eyeful*, qui produit une surcroissance massive de l'œil et l'apparition de métastases, *dilp8* est fortement surexprimé (Garelli et al., 2012). Cette surexpression est JNK dépendante. Des larves présentant des tumeurs de l'œil de type *rasv12scrib¹*, présentent une forte augmentation des niveaux d'ARNm de *dilp8*, un faible taux d'entrée en pupaison et un fort retard développemental. Les facteurs de transcription Fos et Ets21 sont requis pour la formation des tumeurs *ras^{v12}scrib¹*. L'inhibition de ces 2 facteurs de transcription par RNAi en contexte *ras^{v12}scrib¹* est suffisante pour améliorer la viabilité larvaire, l'horloge développementale et diminuer significativement les niveaux de *dilp8*. L'induction de *dilp8* dans les tumeurs *ras^{v12}scrib¹* est sous contrôle de la voie de signalisation JNK et implique les facteurs de transcription Fos et Ets21c (Külshammer et al., 2015).

En réponse à une lésion du disque, *dilp8* pourrait être surexprimé par la voie de signalisation JAK/STAT en aval de JNK. Dilp8 possède aussi de nombreuses fonctions au cours du développement normal.

5. Fonctions de *dilp8* au cours du développement normal

a. Dilp8 et son récepteur Lgr3 impliqué dans les fonctions reproductrices

Fru et *Dsx* sont deux facteurs de transcription qui contrôlent le développement du cerveau en fonction du genre (mâle ou femelle). *Lgr3* est également régulé par *Fru* et *Dsx*, en fonction du sexe, dans une population de neurones localisés dans le ganglion abdominal. De plus, il a été montré que Dilp8, ligand de Lgr3, est exprimé très fortement au sein des ovaires. La régulation sexe spécifique de Lgr3 pourrait permettre aux ovaires de signaler leur état reproductif au système nerveux périphérique afin d'obtenir le meilleur potentiel reproductif (Meissner et al., 2016).

b. Régulation post transcriptionnelle des niveaux d'ARNm de *dilp8* par l'exoribonucléase Pacman au cours du développement normal

Chez la drosophile, Pacman est la seule enzyme capable de dégrader les ARNm dans la direction 5'-3'. Les mutants nuls pour *pacman* présentent une réduction de la taille des disques imaginaux, un retard d'entrée en pupaison et une létalité au cours du premier stade pupal. La réalisation d'un séquençage d'ARN sur un extrait de larves mutantes pour *pacman* a permis de montrer que *dilp8* est régulé post transcriptionnellement par Pacman. Au cours du développement normal, *pacman* est donc impliqué dans la suppression de transcrits cruciaux pour le contrôle de la croissance, tels que *dilp8* (Jones et al., 2016).

c. *Dilp8* est impliquée dans l'homéostasie et la robustesse développementale

En 2012, l'équipe de Dominguez a montré qu'un mutant hypomorphe pour *dilp8* présente une asymétrie bilatérale des ailes suggérant son implication dans la stabilité développementale (Fig28).

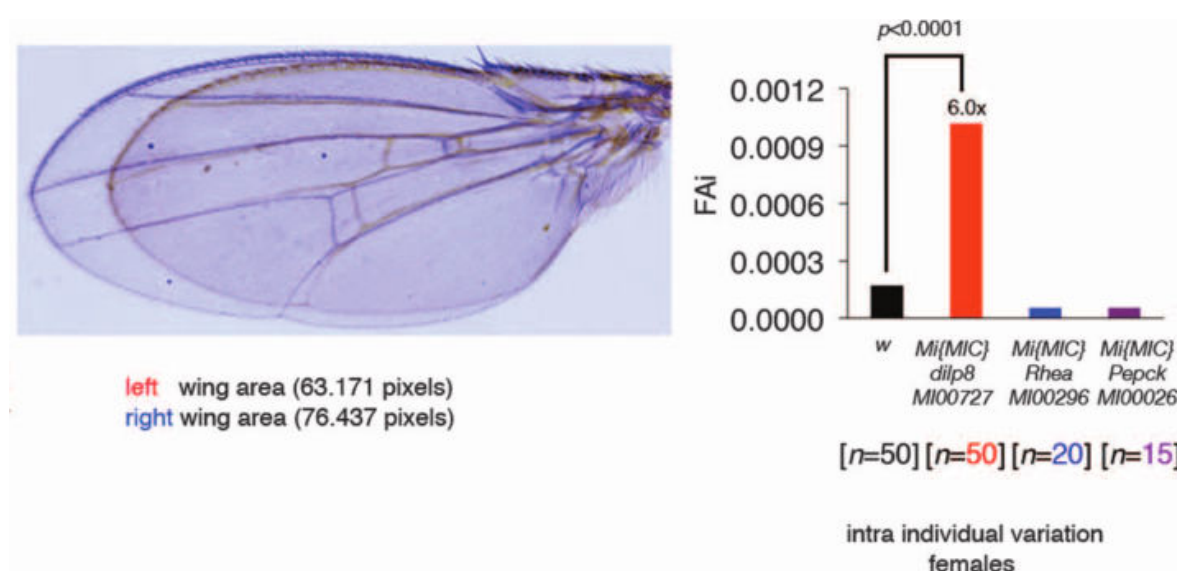


Figure 28 : Asymétrie d'un mutant hypomorphe pour *dilp8*.

D'après Garelli, A. et al., 2012. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science*

La synchronisation de la croissance des tissus périphériques est contrôlée par l'action de Dilp8 sur son récepteur Lgr3 au sein des neurones GCL. En effet, une inactivation de l'expression de *lgr3* dans les neurones GCL en présence d'une surexpression de *dilp8* entraîne une asymétrie (Fig29)(Colombani et al., 2015; Garelli et al., 2015; Vallejo et al., 2015).

Quels sont les inputs sur l'expression de *dilp8* au cours du développement normal d'un tissu permettant la comparaison de son état avec celui des tissus voisins ?

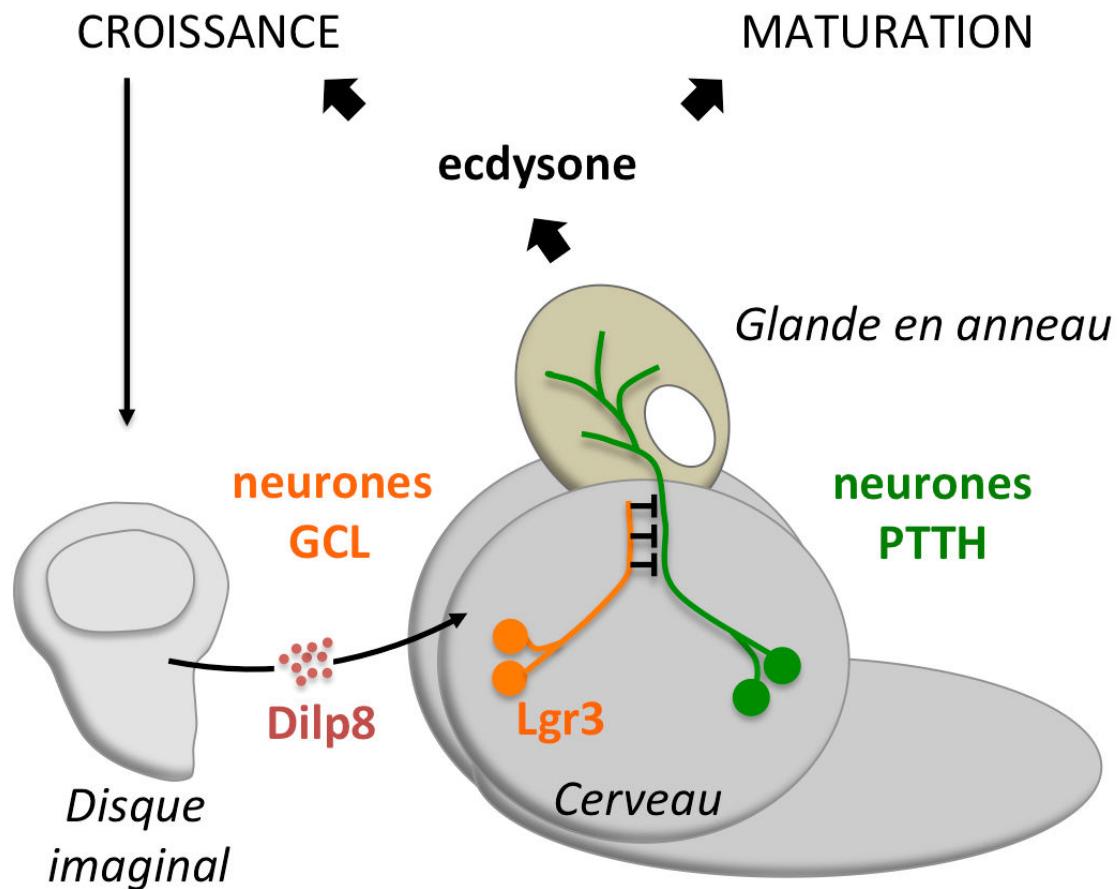


Figure 29 : Schéma récapitulatif de la fonction de *dilp8*.

Une paire bilatérale de neurones positifs pour Lgr3 (GCL growth coordinating Lgr3) régule la fonction de Dilp8. Ces neurones interagissent physiquement avec les neurones PTTH. La voie de signalisation Lgr3 dans les neurones GCL coordonne la croissance et limite la variabilité développementale.

D'après Colombani, J, Andersen, DS, Boulan, L, Boone, E, Romero, N, Virolle, V, Texada, M, Leopold, P. 2015. *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Curr. Biol*

Résultats

VI. Manuscrit

1. The Hippo signalling pathway coordinates organ growth and limits developmental variability by controlling *dilp8* expression

a. Introduction

Le but général de ma thèse est de comprendre comment la croissance individuelle et harmonieuse des organes forme des individus aux bonnes proportions. La croissance individuelle des organes doit être coordonnée et mise à l'échelle de la taille finale de l'individu pour donner naissance à un individu aux proportions correctes. En effet, de nombreuses expériences suggèrent que les organes suivent un programme autonome de croissance. Au cours d'expériences de transplantation réalisées dans les années 80, des disques de jeunes larves transplantés dans un environnement permissif de croissance (abdomen d'une femelle adulte) grandissent, atteignant la taille attendue à la fin du développement normal larvaire, juste avant la métamorphose. Par conséquent, un mécanisme de coordination doit s'assurer que chaque organe a atteint une taille appropriée avant de procéder à sa transition développementale. Un autre aspect de la croissance est essentiel. Bien que chaque type de disques grandisse à des taux de croissance différents, ces taux se coordonnent.

Au sein du laboratoire, Dilp8 a été identifié comme une hormone couplant la croissance des organes avec la maturation de l'animal. En effet, Dilp8 est sécrétée par des disques présentant une croissance anormale et agit sur le système nerveux central pour retarder la métamorphose.

Mon projet de thèse a consisté à essayer de comprendre comment ce mécanisme de coordination se met en place au cours du développement normal et quel est le couplage entre l'activité de *dilp8* et la croissance tissulaire. De façon surprenante, un mutant hypomorphe pour *dilp8* présente une asymétrie bilatérale, reflet du rôle de *dilp8* dans la coordination de la croissance des organes. La régulation de *dilp8* est méconnue. J'ai montré au cours de ma thèse que les membres de la voie de signalisation Hippo, son co-activateur transcriptionnel Yki et son partenaire de liaison à l'ADN, Sd, régulent directement l'expression de *dilp8* à travers 3 HREs dans le promoteur de *dilp8*. Cette régulation est pertinente fonctionnellement, puisqu'une mutation des 3 HREs par CRISPR aboutit à des animaux présentant une asymétrie bilatérale. La voie de signalisation Hippo joue un rôle clé dans les mécanismes d'évaluation de la taille permettant aux organes d'adapter leur croissance. Le couplage entre l'expression de *dilp8* et la voie de signalisation Hippo montre comment l'état instantané de croissance d'un organe est ressenti au niveau de l'individu et peut être centralisé par un circuit de rétrocontrôle systémique.

b. Manuscrit

The Hippo signalling pathway coordinates organ growth and limits developmental variability by controlling *dilp8* expression

Emilie Boone¹, Julien Colombani^{1*}, Ditte Andersen¹ & Pierre Léopold^{1*}

¹Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06100 Nice, France.

* Correspondence to: julien.colombani@unice.fr and leopold@unice.fr

Introductory paragraph:

Coordination of organ growth during development is required to generate fit individuals with fixed proportions. We recently identified *Drosophila* Dilp8 as a key hormone in coupling organ growth with animal maturation. Dilp8 is secreted from abnormally growing organs and acts on the central nervous system (CNS) to delay metamorphosis. In addition, *dilp8* mutant flies exhibit elevated levels of fluctuating asymmetry (FA) demonstrating a function for Dilp8 in coordinating organ growth and limiting developmental variability. The signals regulating Dilp8 activity are not yet known. Here we show that Hippo (Hpo) pathway members, the transcriptional co-activator Yorkie (Yki; YAP/TAZ) and its DNA-binding partner Scalloped (Sd), directly regulate *dilp8* expression through a Hpo Responsive Element (HRE) in the *dilp8* promoter. We further demonstrate that this regulation is functionally relevant, since mutation of the HRE by genome editing results in animals exhibiting increased levels of FA. The Hpo pathway is thought to play an instrumental function in organ size assessment. The coupling between Hippo signalling and *dilp8* function provides a mechanistic explanation for how the growth status of organs is sensed, allowing monitoring and coordinating organ growth trajectories through a feedback loop involving a central hormonal relay.

Main text:

The classic reciprocal grafting experiments of Twitty and Schwind (Twitty and Schwind, 1931) on salamanders have established more than 80 years ago that organs follow autonomous growth programs. The principle of autonomous organ growth was later confirmed in various animals including insects. Thus, when young larval imaginal discs are transplanted in heterologous environments, they reach final sizes that are comparable to those achieved *in situ* (Bryant and Simpson, 1984). To achieve individuals of correct size and proportions, mechanisms allowing organ growth to be coordinated and coupled with the developmental program are essential. Evidence that such coordination mechanisms exist comes from studies showing that artificially slowing down growth of a subset of discs reduces the growth rate of unperturbed discs and delays metamorphosis, allowing perturbed discs to complete their growth programs before entry into metamorphosis (Parker and Shingleton, 2011; Jaszczak et al., 2015). We and others recently identified the hormone Dilp8 as a central organiser of organ growth (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012). Dilp8 is secreted from abnormally growing organs and acts remotely on the central brain complex to delay metamorphosis (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012). Recent work shows that Dilp8 signals through the Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 3 (*Lgr3*) in a pair of bilateral brain (GCL) neurons activating a neuroendocrine circuit, which ultimately suppresses the synthesis of the moulting steroid hormone ecdysone (Colombani et al., 2015; Garelli et al., 2015; Vallejo et al., 2015). Interestingly, mutations in the *dilp8* and *lgr3* loci produce animals that exhibit fluctuating asymmetry (FA), implying an additional function of the *dilp8/lgr3* axis in coordinating organ growth (Colombani et al., 2015; Garelli et al., 2012, 2015). Reducing *lgr3* levels in the GCL neurons recapitulates the *lgr3* mutant phenotype consistent with organ growth being coordinated through a central relay (Colombani et al., 2015). The ability of *dilp8* to coordinate organ growth suggests that its expression should be controlled by signals central to organ size assessment mechanisms. To gain insight into how *dilp8* expression might be coupled with organ growth, we searched for regulators of *dilp8* expression among the 120 candidates recovered in our genome-wide screen (Colombani et al., 2012). The

condition used for this screen corresponds to a disc-specific knockdown of the syntaxin, Avalanche (Avl; *rn>avl* RNAi), which generates disc-specific neoplastic growth and a Dilp8-dependent 3-day delay in the pupa-to-larva transition (Colombani et al., 2012). We inferred that reducing the function of molecules regulating *dilp8* expression should rescue the delay of *rn>avl* RNAi animals. Indeed, altering JNK signalling, which efficiently rescues the delay, also suppresses the upregulation of *dilp8* transcription observed in *rn>avl* RNAi animals (Colombani et al., 2012). The ability of JNK signalling to induce *dilp8* transcription in response to various stress, including wound healing and tumour formation, likely represents an important checkpoint mechanism allowing the organism to recover before entering metamorphosis, but may not be important for coordinating organ growth in healthy animals (Colombani et al., 2012). In addition to JNK signalling, we identified the Hpo pathway as an important regulator of *dilp8* expression. Thus, altering Hpo signalling by reducing levels of the transcriptional co-activator Yki and its binding partner Sd efficiently rescues the delay and normalises *dilp8* transcript levels in *rn>avl* RNAi animals (Fig. 1a-b). Given the substantial evidence that crosstalk takes place between the Hpo and JNK signalling pathways (Rauskolb et al., 2014; Sun and Irvine, 2013), we tested whether Yki can regulate *dilp8* expression independently of JNK signalling. Indeed, we found that *dilp8* expression was still significantly upregulated by Yki overexpression in flies that are mutant for the JNK kinase, Hemipterous (Hep) (Fig. 1c-f). Interestingly, the Hpo tumour-suppressor pathway is an important regulator of organ growth and is thought to play a central role in the organ size assessment mechanism. The core components of the Hpo pathway include the Hpo (Mst1/2 in humans) and Warts/Lats kinases, which upon activation phosphorylates the transcriptional co-activator Yorkie (Yki; YAP/TAZ in humans) thereby causing its retention in the cytoplasm (Yu et al., 2015). When the Hpo pathway is inactive, Yki translocates to the nucleus where together with its DNA-binding partner Scalloped (Sd) it activates target genes and promotes organ growth (Huang et al., 2005; Dong et al., 2007; Zhang et al., 2008; Wu et al., 2008; Goulev et al., 2008; Zhao et al., 2008). Upstream positive regulators of the Hpo pathway include the two membrane-associated FERM-domain proteins, Merlin and Expanded (Ex), and their interacting protein Kibra (Yu et al., 2015; Schroeder and Halder, 2012; Gaspar and Tapon, 2014).

Given that Yki and Sd are required for the up-regulation of *dilp8* expression observed in our *rn>avl* RNAi condition (Fig 1a-b), we next tested whether overexpression of *yki* is sufficient to activate *dilp8* transcription. Using an enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) trap inserted in the first intron of the *dilp8* gene as a reporter for native *dilp8* expression, we could observe increased levels of eGFP in *yki* overexpressing clones (Fig 2a). Consistent with this, Dilp8 protein levels were also elevated in these clones (Fig 2a). Yki has been reported to activate transcription through its association with a number of different transcription factors including Sd (Zhang et al., 2008; Wu et al., 2008; Goulev et al., 2008; Zhao et al., 2008). In agreement with Yki regulating *dilp8* expression through its association with Sd, we found that reducing Sd levels in Yki overexpressing clones abolished the Yki-dependent upregulation of Dilp8 (Fig. 2b-d'). We next examined *dilp8* levels in clones carrying mutations in genes encoding upstream components of the Hpo pathway including *ex*, *hpo*, and *warts*. As expected, activating Yki by reducing the activity of upstream Hpo pathway members increases Dilp8 protein levels (Fig. 2e-g').

Genome-wide CHIP seq analyses using an anti-Yki antibody recently identified a number of potential Yki target genes (Oh et al., 2013; Zhang et al., 2008). Interestingly, Yki pulled down a 600 bp promoter fragment localised 1.5 kb upstream of the coding region in the *dilp8* locus. Close examination of this fragment revealed three potential Sd-binding sites (hereafter referred to as Hpo Responsive Element, HRE) (Oh et al., 2013), suggesting that *dilp8* expression might be directly activated by Yki and Sd (see Fig. 3a). To test this, we performed DNA pull-down assays by mixing lysates from cells expressing Sd-Flag and DNA fragments corresponding to a 600 bp fragment of the *dilp8* promoter region around the HRE (*dilp8 promoter fragment: dilp8-PF*) or a region in the *diap* promoter that is known to bind Sd (*diap-PF*) as positive control. We found that Sd-Flag binds the *dilp8-PF* and *diap-PF* with similar efficiency (Fig. 3b). Moreover, the binding of Sd-Flag to the *dilp8-PF* is abolished upon mutation of the three putative Sd binding sites (*dilp8-PF* Δ 123; Fig. 3b). To test the functional relevance of this binding, we analysed the potential of each of these fragments to promote transcription of the *luciferase* reporter gene in the presence of Sd and Yki. Consistent with the DNA pull-down results, the *diap-PF*

and *dilp8-PF*, but not the *dilp8-PF* Δ 123, were able to activate transcription in the presence of Yki and Sd (Fig.3c). To study the transcriptional regulation of *dilp8* by Yki *in vivo*, we next generated transgenic flies carrying constructs harbouring either the full *dilp8* promoter (*dilp8-full-prom*), *dilp8-PF*, *dilp8-PF* Δ 123, or intron 1 of the *dilp8* gene as a negative control, all fused to the *lacZ* coding sequence (Fig. 3a). We found that *dilp8-PF* was as efficient as *dilp8-full-prom* to induce *lacZ* expression in Yki overexpressing clones (Fig. 3d-f'''). The ability of Yki to induce *lacZ* expression depends on the integrity of the HRE, since mutations of all three Sd-binding sites prevented all *lacZ* expression in Yki overexpressing clones (Fig. 3g-g'''). Altogether these results are consistent with Yki activating *dilp8* gene expression through Sd bound to the HRE in the *dilp8* promoter.

We ultimately wanted to know whether the Yki-dependent regulation of Dilp8 function is central to the mechanism allowing organ growth coordination. To test the biological relevance of the HRE in the *dilp8* promoter, we carried out gene editing using a combination of CRISPR-induced double-stand breaks and ends-out homologous recombination (Baena-Lopez et al., 2013) to replace the endogenous *dilp8-PF* with either *dilp8-PF* Δ 123 or a control *dilp8-PF* at the *dilp8* locus. As expected, Yki-dependent induction of *dilp8* expression was efficiently suppressed in flies carrying mutations in the HRE (*dilp8-PF* Δ 123) (Fig. 4a-b'). By contrast, JNK-dependent regulation of Dilp8 expression was not compromised in this genetic background (Fig. 4c-d'). Finally, *dilp8-PF* Δ 123, but not *dilp8-PF* flies exhibit increased levels of fluctuating asymmetry comparable to that observed in *dilp8* null mutant flies (Fig. 4e-f). This contrasts with the observation that *hep75* mutant flies do not exhibit elevated levels of fluctuating asymmetry (data not shown). Altogether, these results are consistent with a central role of Yki in coordinating organ growth and limiting developmental variability through its effect on *dilp8* expression.

Discussion

Based on previous experimental data, two non-exclusive models can be proposed for organ growth coordination during development. According to the developmental checkpoint model, each tissue autonomously follows its growth trajectory and deviations that may occur due to developmental noise are resolved at the end of the growth period by adjusting the time of the next developmental transition. Alternatively, continuous coordination of growth rates and/or organ size could take place during development, allowing organs to adjust with each other while growing. Although experimental evidence exists for both mechanisms in response to large growth disruptions, it is not clear whether they apply for small perturbations usually encountered by larval organs during development. For both models however, coordination must rely on a molecular mechanism linking the status of organ growth with Dilp8 function. Based on a flurry of experimental approaches, different working models have been proposed to explain organ-autonomous size control operating in complex organisms. One unifying view is that the Hpo pathway plays an instrumental role in assessing and regulating organ growth. The ability of the Hpo pathway to integrate both short- and long-range signals makes it an ideal candidate for sensing organ size and regulate growth accordingly. Importantly, we demonstrate here direct molecular and functional links between Hpo/Yki signalling and *dilp8* expression during normal development. Furthermore, suppressing the sole input of Yki on *dilp8* expression suffices to increase developmental instability and recapitulates the effect of a *dilp8* loss-of-function mutation. The coupling between Hpo pathway activity and *dilp8* expression allows the growth status of organs to be transduced into a Dilp8 signal. Dilp8 acts through its receptor Lgr3, residing in two pairs of bilateral neurons to control the levels of the steroid hormone ecdysone. This in turn affects the timing of maturation, allowing for a checkpoint mechanism on the developmental transition (Colombani et al., 2015; Vallejo et al., 2015; Garelli et al., 2015). When ectopically expressed, Dilp8 also affects organ growth, suggesting that it may also participate in a continuous feedback taking place during development. Whether ecdysone acts downstream of Dilp8/Lgr3 to mediate such continuous feedback on organ growth remains to be determined. Several reports indicate that

ecdysone is required for imaginal tissue growth both in flies and in Lepidoptera (Jaszczak et al., 2015; Nijhout and Grunert, 2010) and previous data suggest that organ growth coordination relies on systemic effects mediated by ecdysone (Herboso et al., 2015). Interestingly, Taiman, a co-activator of ecdysone receptor (EcR) mediates Yki-dependent *dilp8* expression, therefore suggesting that the ecdysone signal itself feeds back on *dilp8* expression (Zhang et al., 2015).

Imaginal disc growth follows two distinct phases: exponential growth at a roughly constant rate followed by a gradual slowing as the disc nears its target size (Mao et al., 2013; Nienhaus et al., 2012). Therefore, the same feedback strategy is likely to have different effects in the two stages. During the exponential growth phase, more Yki in one disc can be interpreted as faster growth. In the decelerating phase, more Yki can be interpreted as delayed developmental growth since other discs are engaged in a gradual growth arrest. In this context Yki-dependent Dilp8 induction would trigger growth coordination. Further quantitative data on individual disc growth trajectories and Yki/Dilp8 coupling will be necessary to decipher these regulations.

Figure legends

Figure 1. Yki regulates *dilp8* expression independent of the JNK pathway. (a) Reducing Yki or Sd levels rescues the delay of *rn>avl* RNAi animals. Percentage of larvae that have pupariated at the indicated hours after egg deposition (AED) is shown (n > 90, triplicate experiments, error bars represent SEM). (b) Silencing of Yki or Sd efficiently suppresses the upregulation of *dilp8* mRNA levels observed in *rn>avl* RNAi animals. Relative *dilp8* mRNA levels were measured using qPCR on whole larvae of the indicated genotypes. (c-e') Yki induces *dilp8* expression independent of JNK signalling. Larval wing discs of the indicated genotypes were dissected 116 hrs AED and stained for Dilp8. (f) qPCRs on the indicated genotypes showing that the Yki-dependent induction of *dilp8* is still significant in a *hep*⁷⁵ mutant background.

Figure 2. Yki regulates *dilp8* transcription through Sd. (a-g) wing imaginal disc carrying GFP-labelled wildtype clones (b-b'), clones expressing Yki (a-a''', c-c') or Yki + Sd RNAi (d-d'), or GFP-negative clones mutant for *ex* (e-e'), *hpo* (f-f') or *wts* (g-g') dissected 116 hs AED and stained for Dilp8.

Figure 3. Yki directly regulates *dilp8* expression through a HRE in the *dilp8* promoter. (a) Schematic of the *dilp8* promoter region and the HRE harbouring the three putative Sd-binding sites (indicated as green squares). The *dilp8* promoter fragments used to study Yki-dependent regulation of *dilp8* expression *in vivo* are shown. (b) DNA pulldown experiments show that binding of Sd to the *dilp8*-PF is mediated by the three Sd-binding sites. The indicated DNA fragments were incubated with lysates from S2 cells transfected with Sd-Flag. Band intensities represents the average of three independent experiments: for *diap*-PF: 3.8±0.7 (positive control), for *act*: 1±0.2 (negative control), for *dilp8*-PF: 5.1±1.0, and for *dilp8*-PF Δ 123: 1.9±0.4. (c) Luciferase assay showing that Yki/Sd activate gene expression through the HRE in the *dilp8*-PF. The luciferase assay was performed using lysates from cells transfected with Yki and Sd. The ability of Yki/Sd to induce gene expression from the indicated promoter fragments was measured (error bars represent SEM). (d-g''') Yki induces *dilp8* transcription through the HRE *in vivo*. Wing

imaginal discs carrying GFP-labelled Yki expressing clones were dissected from transgenic flies carrying the indicated *dilp8* promoter fragments fused to the *LacZ*-encoding sequence.

Figure 4. Yki-dependent regulation of Dilp8 coordinates organ growth and limits developmental instability. (a-d') JNK-dependent regulation of *dilp8* expression is not affected in *dilp8-PF Δ123* animals. Wing discs were dissected from the indicated genotypes and stained for Dilp8. (e-f) Mutation of the three Sd-binding sites in the *dilp8* promoter by gene editing induces FA. Bar histograms shows FA indices (Fai) of left and right wing areas measured on individuals of the indicated genotypes.

Experimental procedures

Fly Strains and Food. Animals were reared at 25°C (or 26.5°C for Fai measurement) on fly food containing, per liter: 17g inactivated yeast powder, 83g corn flour, 10g agar, 60g white sugar, and 4.6g Nipagin M.

Cell culture. *Drosophila* S2R+ cells were grown in Complete Schneiders medium (CSM; Schneiders medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, BioWhittaker), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen)) at 25°C. Transfections were done using Effectene reagent (Qiagen).

Immunostainings of Larval Tissues. Tissues dissected from larvae in 1x phosphate-buffered saline (PBS [137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, pH8]) at the indicated hours AED were fixed in 4% formaldehyde (Sigma) in PBS for 20 min at room temperature, washed in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBT), blocked for 2 hours in PBT containing 10% FBS (PBS-TF), and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The next day, tissues were washed, blocked in PBS-TF, and incubated with secondary antibodies at 1/500 dilution (Cy3-conjugated donkey anti-rat or Alexa fluor 647 goat anti-rat, Cy3- conjugated donkey anti-chicken from Jackson ImmunoResearch) for 2 hours at room temperature. After washing, tissues were mounted in Vectashield containing DAPI for staining of DNA (Vector Labs). Fluorescence images were acquired using a Leica SP5 DS (20x and 40x objectives) and processed using Adobe Photoshop CS5 or Image J. Wing discs areas were measured using Image J.

Antibodies. The following primary antibodies were used, rat anti-Dilp8: 1/500 (Colombani et al., 2012) and chicken anti-beta-galactosidase: 1/1000 (GeneTek).

Plasmids. *dilp8*, *diap* and *actin* promoter sequences were PCR amplified from genomic DNA (DNA preparations made using DNeasy Blood and Tissue kit

(Qiagen)) and cloned in the pENTR/D-Topo vector (Invitrogen) using the following primers: for pENTR-dilp8-PF: sense, GTA TGA TAG CAG GGT TCT GTG and anti-sense, AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA TGA, for pENTR-diap-PF: sense, ATT TGC CCT TGT CTG TAG TTG C and antisense, ATC GAG CAA TGG ATA AAC CGT GAG, for pENTR-act-PF: sense, GGA CTC GTC GTA CTC CTG CTT G and antisense, CCC ATC TAC GAG GGT TAT GC. To generate the pENTR-dilp8-PF Δ 123 plasmid, mutations were introduced in pENTR-dilp8-PF using the kit QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the following primers: Dilp8 MutSd S1: TTC GCA CGT ATC CTT CTT CAT GTG CAT TCT CGC GCT CGT C, Dilp8 MutSd A1: GAC GAG CGC GAG AAT GCA CAT GAA GAA GGA TAC GTG CGA A, Dilp8 MutSd S3: CCA CTT GCT TTT CGC TTT CGT TGC ATG AAC GCA TGC GGA AAT GTT A, Dilp8 mutsd A3: TAA CAT TTC CGC ATG CGT TCA TGC AAC GAA AGC GAA AAG CAA GTG G, Dilp8mut S4: ACA CCG ACT TGG GTT CGG ATC CTG TGC GCT GGC CGT T, Dilp8 Mut A4: AAC GGC CAG CGC ACA GGA TCC GAA CCC AAG TCG GTG T. To generate the beta-galactosidase reporter plasmids, sequences corresponding to the full *dilp8* promoter, intron I, dilp8-PF and dilp8-PF Δ 123 were amplified from plasmids or genomic DNA and cloned into the pCASPER-attbN-hs43-lacZ plasmid (kind gift from Ulrike Lohr and Herbert Jackle, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany). The following primers were used: for intron I: sense, CTG CAA TGG AGG AGC GGG and antisense, GTG AGT TCG AGT TGA AGT TAA ACT, for dilp8-PF and dilp8-PF Δ 123: sense, GTA TGA TAG CAG GGT TCT GTG and antisense, AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA TGA, for the full dilp8 promoter region: sense, TTT AGT GGC GTT CTA GGA and antisense, AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA TGA. To generate transgenic reporter lines, the pCASPER-attbN-hs43-lacZ constructs were introduced into the germ line by injections in the presence of the PhiC31 integrase and inserted in the landing site 51C1 on the 2rd chromosome (Bloomington Drosophila Stock Center, BL24482, BestGene Inc).

Editing the *dilp8* locus by accelerated homologous recombination. To generate a *dilp8* null mutant, an approach combining the CRISPR technique and homologous recombination was employed as described in (Baena-Lopez et al., 2013). Double-

strand breaks (DSB) were induced by the CRISPR technique using single-stranded guide (sg)RNAs and a Cas9-encoding plasmid. For optimal targeting of the *dilp8* locus, sgRNA target sequences were selected as 20 nt sequences preceding an NGG PAM sequence in the genome (GN20GG). To generate pCFD4{*dilp8*^{KO}}, gRNAs targeting exon I and exon II in the *dilp8* locus were cloned into the tandem gRNA expression vector, pCFD4 (kind gift from Simon Bullock (Addgene plasmid # 49411)), using the *dilp8*-5'-KO-pCFD4-FORWARD: TAT ATA GGA AAG ATA TCC GGG TGA ACT TCg cca cta aaa tga gtt caa GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG and *dilp8*-3'-KO-pCFD4-REVERSE: ATT TTA ACT TGC TAT TTC TAG CTC TAA AAC tca ggc aac aga ctc cga tga cGA CGT TAA ATT GAA AAT AGG TC (*dilp8*-specific sequences are in lower case) primers as described in <http://www.crisprflydesign.org/wp-content/uploads/2014/06/Cloning-with-pCFD4.pdf>. For homologous recombination, two homology arms were amplified from genomic DNA using the following primers: for homology arm I, sense: **GGT ACC** TGA TGG GCA GCT CGT CGG GCA GCT TC and antisense: **GCG GCC GCG** TAA ATG GAT CTG TGT CCC TGG GA, for homology arm II, sense: **ACT AGT** AAC TCA TTT TAG TGG CGT TCT AGG ATC A and antisense: **AGA TCT** CAA ATG ATT ACC GCA TTA AAG CTA ATC AC (in bold are the added restrictions sites used for cloning into pTV2). The resulting PCR products were digested and cloned into the pTV2 vector (kind gift from Cyrille Alexandre and Jean-Paul Vincent, the Francis Crick Institute, London, UK) to generate pTV2{*dilp8*^{KO}}. To facilitate homologous recombination, embryos were injected with pTV2{*dilp8*^{KO}} in the presence of pCFD4{*dilp8*^{KO}} and a CAS9-containing plasmid. To confirm gene targeting the following primers were used: *dilp8* KO S: GGA CGG GTT AAC CAT TCA GCA AGT TAG and *dilp8* KO Rev: CGC GAA CTC GAT GGA CCT TCT GTC GC. After confirmed targeting, the majority of the targeting vector was removed by crossing to a strain expressing a constitutively active Cre (Bloomington stock BL1092) (procedure outlined in (Baena-Lopez et al., 2013)). The resulting strain is referred to as *dilp8*^{KO} in the manuscript.

To generate a *dilp8* mutant deleting a 600 bp fragment of the promoter encompassing the three scalloped-binding sites (*dilp8*^{pTV2 Δ PF}), gRNAs directed against sequences upstream and downstream of the scalloped-binding sites were cloned into pCFD4 as described above using the following primers: *dilp8* HR S: TAT ATA GGA

AAG ATA TCC GGG TGA ACT TCg aac ttt cac tgt cgt ttc tgt tGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC AAG and *dilp8 HR REV*: ATT TTA ACT TGC TAT TTC TAG CTC TAA AAC gtg gcg cga ttc ttt aga tcG ACG TTA AAT TGA AAA TAG GTC. The primers used to generate the homology arms for the pTV2 vector were: HRR S: **GCG GCC GCG GCG** GAC TCA CTG AGT CAC AGT CAC ATG, HRR AS: **GGT ACC** AGA AAC GAC AGT GAA AGT TCT ACA CTT TCG, HRL S: **ACT AGT** CTA AAG AAT CGC GCC ACT TG, HRL AS: **AGA TCT** CAG ACA TCT TAG TCA TGG TCT G (in bold are the added restrictions sites used for cloning into pTV2). To facilitate homologous recombination, embryos were injected with pTV2{*dilp8*- Δ PF} in the presence of pCFD4{*dilp8*- Δ PF} and a CAS9-encoding plasmid. The resulting strain, referred to as *dilp8*^{pTV2 Δ PF}, was used as a host for reintegration of the missing 600 bp promoter-fragment harbouring point mutations in the three scalloped-binding sites (*dilp8*-PF Δ 123) or not (*dilp8*-PF, control) via the attP site. For this purpose, *dilp8*-PF and *dilp8*-PF Δ 123 were PCR amplified from plasmids and cloned into the reintegration vector RIV^{cherry} (kind gift from Cyrille Alexandre and Jean-Paul Vincent, the Francis Crick Institute, London, UK) giving rise to RIV^{cherry}{*dilp8*-PF Δ 123, mini-white} and RIV^{cherry}{*dilp8*-PF, mini-white}. For the PCR amplification of *dilp8*-PF and *dilp8*-PF Δ 123 the following primers were used: RIV S: **ACT AGT** GTT CGG CTC TGC CTC TGT CTC TTT CGG and RIV AS: **AGA TCT** ATC AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA T (in bold are the added restrictions sites used for cloning into RIV^{cherry}). Reintegration was achieved by injecting a *dilp8*^{pTV2} strain expressing the PhiC31 integrase. After confirmed targeting of the reintegration vector into the *dilp8* locus, the majority of the targeting vector was removed by crossing to a strain expressing a constitutively active Cre (Bloomington stock BL1092) (procedure outlined in (Baena-Lopez et al., 2013)). Sequencing analysis of the *dilp8*-PF Δ 123 mutant were performed using the following primers: *Dilp8 HRE* S2: GGT AGG GGC ATT CGA CGG AGA TCG TTG and *Dilp8 HRE* Rev2: GGA AGG CCA GCG AAA TTG TTG TTA AAC

Luciferase assays. *dilp8*, *diap* and *actin* promoter sequences were PCR amplified and cloned into pGL3basic vector (Promega) using the kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). For luciferase assays, S2R+ cells were

transfected for 3 days with the following vectors: *Firefly-luciferase pGL3-promoter* (500ng), *pAct-Renilla-luciferase* (100 ng.), pAct-yki (600ng), pAct-sd (400ng). All experiments were performed in triplicate, and luciferase activities were normalized against *Renilla* luciferase activity following indications of the Dual Luciferase Reporter Assay System protocol (Promega).

DNA pull-down (adapted from (Sidor et al., 2013)). *Drosophila* S2 cells were plated in a 6-well plate at a density of 2×10^6 cells per well. Each well was transfected with 400 ng of pAC Flag-Sd (Kind gift from Clara Sidor and Barry Thompson, the Francis Crick Institute, London, UK). 48 hours later, cells were washed once in PBS and lysed in 500µl IP buffer (50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, 1 mM EGTA in the presence of protease (Complete mini tablets from Roche) and phosphatase (phosphatase inhibitor cocktail 1, Sigma) inhibitors for 10 min on ice. Cell extracts were then spun down at 13,000 rpm for 10 mins at 4°C to remove cell debris. Cells extracts were incubated for 1 hour at 4 °C on a rotating wheel with a short non-biotinylated actin probe to pre-clear the extracts from non-specific DNA binding proteins (10 µg probe per 100 µg protein). 30 µl Neutravidin beads slurry (Thermoscientific) were washed in IP buffer and incubated with biotinylated probes (Dilp8-PF, Dilp8-PF Δ 123, DIAP1 or Actc5) for 1 hour at 4 °C on a rotating wheel. Pre-cleared cell extracts and probe-bound beads were combined and incubated overnight at 4 °C on a rotating wheel. Beads were then washed 3 x 5 min in IP buffer and resuspended in 30 µl SDS loading buffer for Western blot analysis. DNA probes were amplified from genomic DNA using the following primers: for the DIAP1 probe (583bp) F: 5'-ATT TGC CCT TGT CTG TAG TTG C-3' and R: 5'-[Btn]ATC GAG CAA TGG ATA AAC CGT GAG-3', for the Act5C probe (606 bp) F: 5'GGA CTC GTC GTA CTC CTG CTT G-3' and R: 5'-[Btn]CCC ATC TAC GAG GGT TAT GC-3', for the Dilp8-PF probe (680 bp) F : 5'-[Btn]GTA TGA TAG CAG GGT TCT GTG - 3' and R: 5' – AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA TGA- 3', and for the Dilp8-PF Δ 123 probe (680 bp) F : 5'-[Btn]GTA TGA TAG CAG GGT TCT GTG - 3' and R : 5' – AGG TTG TGA AAT TGT ATT TAT GAA TGA- 3' (all probes were 5' biotinylated). Short *actin* probe for cell extract pre-clearing (60 bp) F and R oligonucleotides were annealed at a final concentration

of 1 µg/µl double-stranded DNA: F: 5'-GAG CAC GGT ATC GTG ACC AAC TGG GAC GAT ATG GAG AAG ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC-3' and R: 5'-GTA GAA GGT GTG GTG CCA GAT CTT CTC CAT ATC GTC CCA GTT GGT CAC GAT ACC GTG CTC-3'.

Quantitative RT-PCR. Larvae were collected at the indicated number of hours AED. Whole larvae or dissected larval wing discs were frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted from whole larvae or dissected tissues using a QIAGEN RNeasy lipid tissue minikit or microkit according to the manufacturer's protocol. RNA samples (2 µg per reaction) were treated with DNase and reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), and the generated cDNAs were used for real-time RT-PCR (StepOne Plus; Applied Biosystems) using PowerSYBRGreen PCR mastermix (Applied Biosystems), with 8 ng of cDNA template and a primer concentration of 300 nM. Samples were normalized to levels of ribosomal protein (rp)49 transcript levels. Three separate biological samples were collected for each experiment and triplicate measurements were conducted. Primers were designed using PrimerExpress software (Applied Biosystems). Primer sequences are available upon request.

Western blotting. Proteins were resolved by SDS-PAGE using 12% gels (NuPAGE Novex gel, Invitrogen) and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham). The membranes were incubated for 1 hour in blocking buffer (PBS, 5% milk) and incubated overnight at 4°C in the same buffer containing primary antibodies at 1:1.000 dilutions (mouse anti-Flag F3165 (Sigma)). Membranes were washed three times in PBS-T, blocked for 1 hour, and probed with secondary antibodies in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, chemiluminescence was observed using the ECL-Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences). Images were generated using the Fujifilm Multi Gauge software.

Pupariation curves. L1 larvae were collected 24-hr after egg deposition (AED) on agar plates with yeast (4-hr egg collections) and reared in tubes (thirty larvae

each) containing standard food (see above). The number of larvae that had pupariated at a given time AED was scored every 6 hours.

Measurement of the Fluctuating Asymmetry index (FAi). L1 larvae were collected 24 hours AED (4-hr egg collections) and reared at 30 animals per tube at 26.5°C. Adult flies of the appropriate genotypes were collected, stored in ethanol and mounted in an Euparal solution. Pictures of dissected wings were acquired using a Leica Fluorescence Stereomicroscope MZ16 FA with a Leica digital camera DFC 490. Wing areas were measured using Image J. We used the FA index (FAi) to assess intra-individual size variation between left and right wing areas as described in [23]. $Fai = \frac{Var(Ai)}{Mean(Ai)}$, where Ai are the normalised differences between left and right wing area within a given individual ($n > 22$). p values are the results of a F test provided by Microsoft Excel.

Statistics. p values are the results of a Student's test provided by Microsoft Excel (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Genotypes

Figure 1

- a: w^- ; *elav-Gal80/+; rn-Gal4/+*
 w^- ; *elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
 w^- ; *elav-Gal80/rh3 RNAi KK; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
 w^- ; *elav-Gal80/sd RNAi KK; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
 w^- ; *elav-Gal80/yki RNAi KK; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
- b: w^- ; *elav-Gal80/+; rn-Gal4/+*
 w^- ; *elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
 w^- ; *elav-Gal80/sd RNAi KK; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
 w^- ; *elav-Gal80/sd RNAi KK; rn-Gal4, UAS avl RNAi GD/+*
- c: w^- ; *spalt-Gal4/+; +*
- d: w^- ; *spalt-Gal4/+; UAS-yki/+*
- e: yw^- , *hep⁷⁵; spalt-Gal4/+; UAS-yki/+* (male)

- f: w^- ; *spalt-Gal4*/ +; +
 w^- ; *spalt-Gal4*/ +; UAS-*yki*/ +
 yw^- , *hep*⁷⁵; *spalt-Gal4*/ +; UAS-*yki*/ + (male)

Figure 2

- a: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>RFP*/ +; *dilp8-GFP/UAS-yki*
b: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ +; +
c: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ +; UAS-*yki*/ +
d: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ *sd RNAi* KK; UAS-*yki*/ +
e: yw^- , *hs-FLP*; +; *FRT82B*, *ex*^{e1}/*FRT82B*, *ubi-GFP*
f: yw^- , *hs-FLP*; *FRT42D*, *hpo*⁵⁻¹/*FRT42D*, *ubi-GFP*; +
g: yw^- , *hs-FLP*; +; *FRT82B*, *LATS*^{x1}/*FRT82B*, *ubi-GFP*

Figure 3

- d: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ *dilp8-full-promoter-LacZ*; UAS-*yki*/ +
e: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ *dilp8-PF-LacZ*; UAS-*yki*/ +
f: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ *dilp8-intron1-LacZ*; UAS-*yki*/ +
g: yw^- , *hs-FLP*; *Act>CD2>GFP*/ *dilp8-PFΔ123-LacZ*; UAS- *yki*/ +

Figure 4

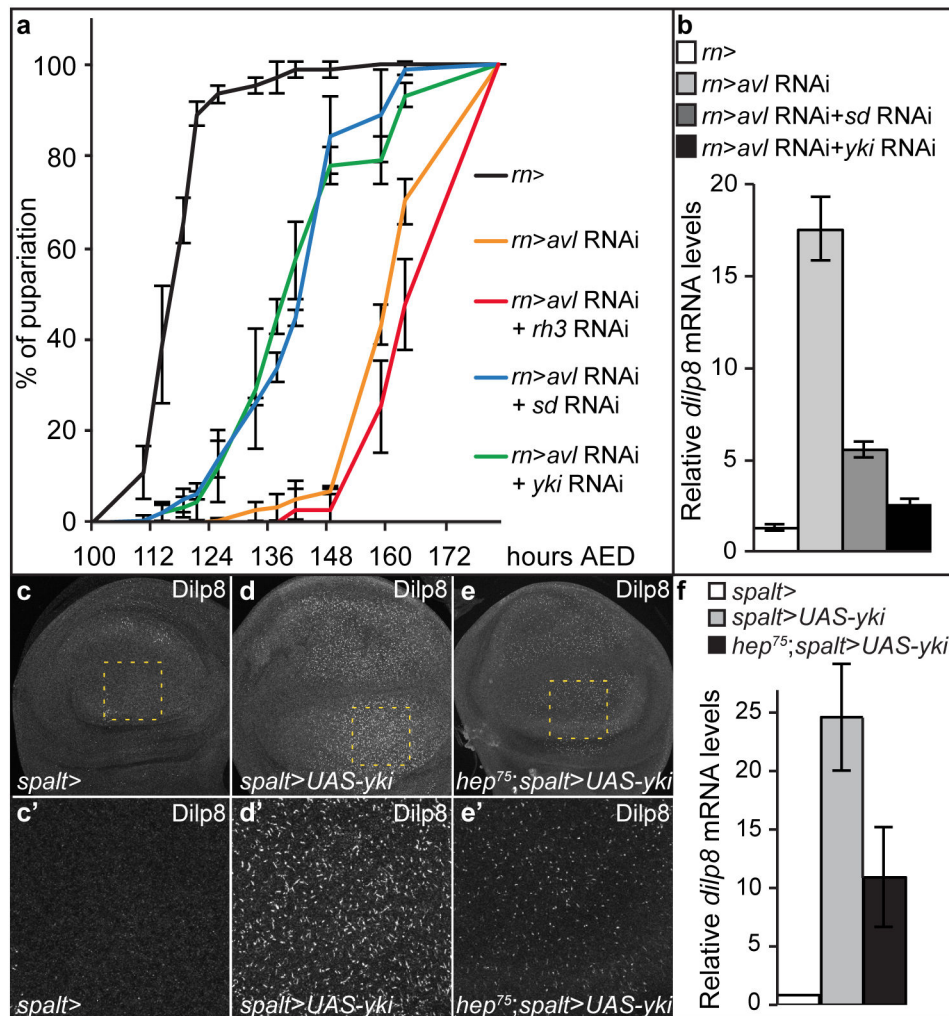
- a: w^- ; *nub-Gal4*/ UAS-*yki::GFP*; *dilp8*^{PFΔ123} / +
b: w^- ; *nub-Gal4*/ UAS-*yki::GFP*; *dilp8*^{PFΔ123} / *dilp8*^{PFΔ123}
c: w^- ; *nub-Gal4*/ UAS-*hep*^{CA}; *dilp8*^{PFΔ123} / +
d: w^- ; *nub-Gal4*/ UAS-*hep*^{CA}; *dilp8*^{PFΔ123} / *dilp8*^{PFΔ123}
e: w^- ; + ; *dilp8*^{PF123} / +
 w^- ; + ; *dilp8*^{PFΔ123} / +
 w^- ; + ; *dilp8*^{KO} / +
 w^- ; + ; *dilp8*^{PF123} / *dilp8*^{KO}
 w^- ; + ; *dilp8*^{PFΔ123} / *dilp8*^{KO}
f: w^- ; + ; +
 w^- ; + ; *dilp8*^{KO} / +
 w^- ; + ; *dilp8*^{KO} / *dilp8*^{KO}

References

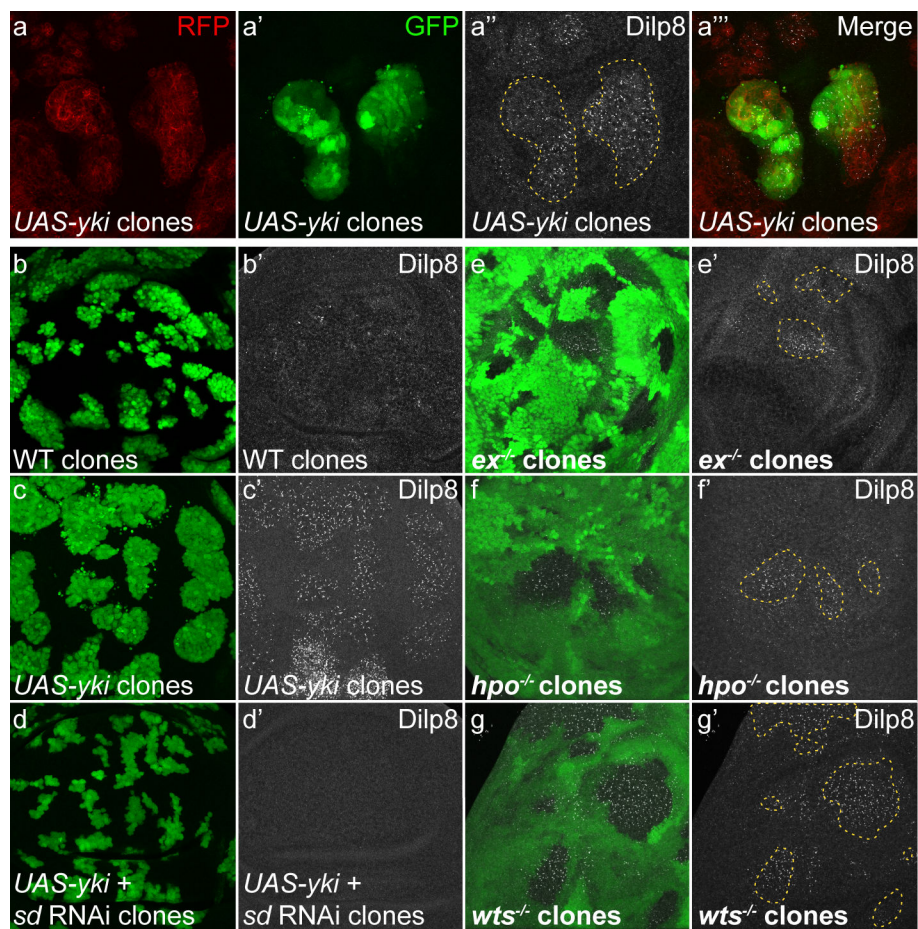
- Baena-Lopez, LA, Alexandre, C, Mitchell, A, Pasakarnis, L, Vincent, J-P. 2013. Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development* 140: 4818–25.
- Bryant, PJ, Simpson, P. 1984. Intrinsic and Extrinsic Control of Growth in Developing Organs. *Q. Rev. Biol.* 59: 387–415.
- Colombani, J, Andersen, DS, Boulan, L, Boone, E, Romero, N, Virolle, V, Texada, M, Leopold, P. 2015. *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Curr. Biol.* 25: 2723–2729.
- Colombani, J, Andersen, DS, Léopold, P. 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336: 582–5.
- Dong, J, Feldmann, G, Huang, J, Wu, S, Zhang, N, Comerford, S a, Gayyed, MF, Anders, R a, Maitra, A, Pan, D. 2007. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130: 1120–33.
- Garelli, A, Gontijo, AM, Miguela, V, Caparros, E, Dominguez, M. 2012. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336: 579–82.
- Garelli, A, Heredia, F, Casimiro, AP, Macedo, A, Nunes, C, Koyama, T, Gontijo, AM. 2015. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat. Commun.* 6: 1–14.
- Gaspar, P, Tapon, N. 2014. Sensing the local environment: actin architecture and Hippo signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 31: 74–83.
- Goulev, Y, Fauny, JD, Gonzalez-Marti, B, Flagiello, D, Silber, J, Zider, A. 2008. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18: 435–41.
- Herboso, L, Oliveira, MM, Talamillo, A, Pérez, C, González, M, Martín, D, Sutherland, JD, Shingleton, AW, Mirth, CK, Barrio, R. 2015. Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of Thor in *D. melanogaster*. *Sci. Rep.* 5: 12383.
- Huang, J, Wu, S, Barrera, J, Matthews, K, Pan, D. 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122: 421–34.

- Jaszczak, JS, Wolpe, JB, Dao, AQ, Halme, A. 2015. Nitric Oxide Synthase Regulates Growth Coordination During *Drosophila melanogaster* Imaginal Disc Regeneration. *Genetics* 200: 1219–1228.
- Mao, Y, Tournier, AL, Hoppe, A, Kester, L, Thompson, BJ, Tapon, N. 2013. Differential proliferation rates generate patterns of mechanical tension that orient tissue growth. *EMBO J.*: 1–14.
- Nienhaus, U, Aegerter-Wilmsen, T, Aegerter, CM. 2012. In-vivo imaging of the *Drosophila* wing imaginal disc over time: novel insights on growth and boundary formation. *PLoS One* 7: e47594.
- Nijhout, HF, Grunert, LW. 2010. The cellular and physiological mechanism of wing-body scaling in *Manduca sexta*. *Science* 330: 1693–5.
- Oh, H, Slaterry, M, Ma, L, Crofts, A, White, KP, Mann, RS, Irvine, KD. 2013. Genome-wide association of Yorkie with chromatin and chromatin-remodeling complexes. *Cell Rep.* 3: 309–18.
- Parker, NF, Shingleton, AW. 2011. The coordination of growth among *Drosophila* organs in response to localized growth-perturbation. *Dev. Biol.* 357: 318–25.
- Rauskolb, C, Sun, S, Sun, G, Pan, Y, Irvine, KD. 2014. Cytoskeletal Tension Inhibits Hippo Signaling through an Ajuba-Warts Complex. *Cell* 158: 143–56.
- Schroeder, MC, Halder, G. 2012. Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23: 803–11.
- Sidor, CM, Brain, R, Thompson, BJ. 2013. Mask Proteins Are Cofactors of Yorkie/YAP in the Hippo Pathway. *Curr. Biol.* 23: 223–8.
- Sun, G, Irvine, KD. 2013. Ajuba Family Proteins Link JNK to Hippo Signaling. *Sci. Signal.* 6: ra81–ra81.
- Twitty, VC, Schwind, JL. 1931. The growth of eyes and limbs transplanted heteroplastically between two species of *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.* 59: 61–86.
- Vallejo, DM, Juarez-Carreño, S, Bolivar, J, Morante, J, Dominguez, M. 2015. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science*: 1–16.
- Wu, S, Liu, Y, Zheng, Y, Dong, J, Pan, D. 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* 14: 388–98.

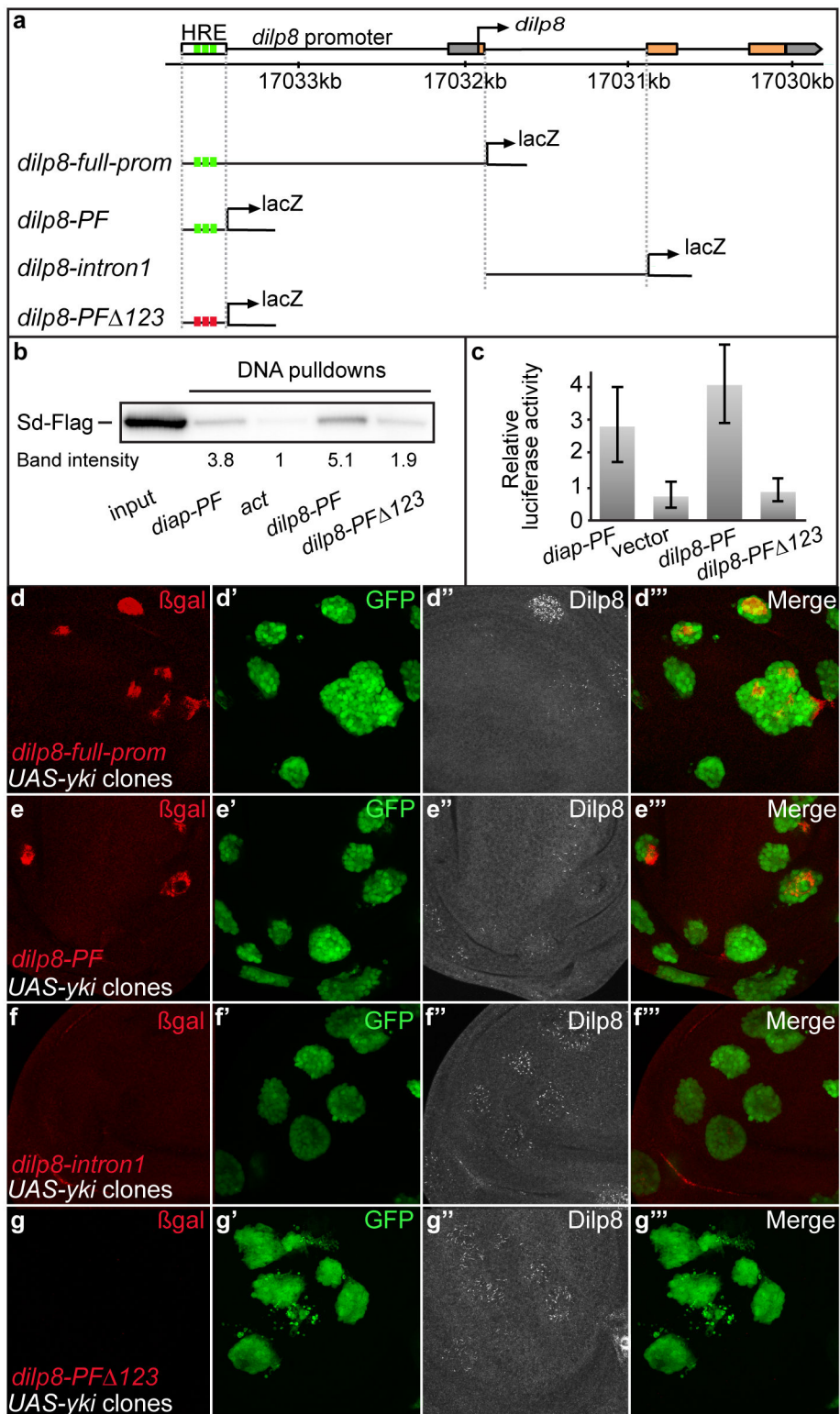
- Yu, F-X, Zhao, B, Guan, K-L. 2015. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163: 811–828.
- Zhang, C, Robinson, BS, Xu, W, Yang, L, Yao, B, Zhao, H, Byun, PK, Jin, P, Veraksa, A, Moberg, KH. 2015. The Ecdysone Receptor Coactivator Taiman Links Yorkie to Transcriptional Control of Germline Stem Cell Factors in Somatic Tissue. *Dev. Cell*: 1–13.
- Zhang, L, Ren, F, Zhang, Q, Chen, Y, Wang, B, Jiang, J. 2008. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* 14: 377–387.
- Zhao, B, Ye, X, Yu, J, Li, L, Li, W, Li, S, Yu, J, Lin, JD. 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.*: 1962–1971.



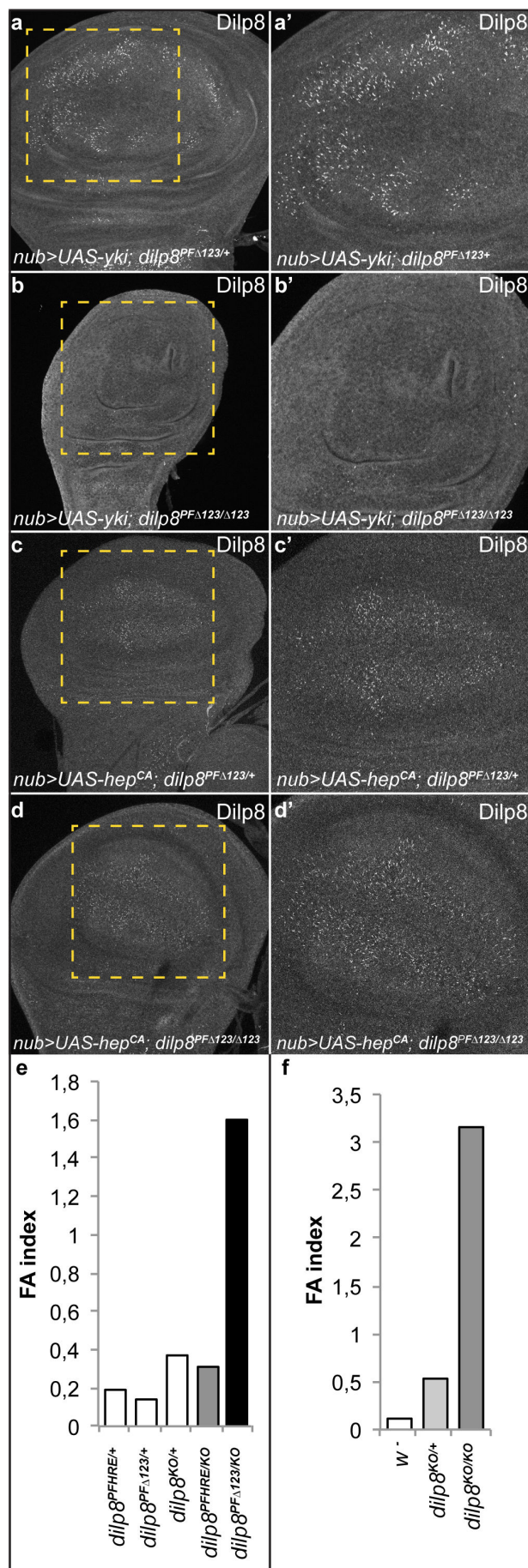
Boone et al. Fig.1



Boone et al. Fig.2



Boone et al. Fig.3



Boone et al. Fig.4

c. Conclusion

La coordination des organes au cours du développement doit générer des organismes aux proportions correctes en accord avec la taille finale de l'adulte. Au cours du développement normal, *dilp8* est régulé avec un pic d'expression au milieu de la période de croissance larvaire et une forte réduction au moment de l'arrêt de croissance. J'ai pu montrer que l'expression de *dilp8* est pertinente physiologiquement puisqu'un mutant nul pour *dilp8* présente une asymétrie fluctuante. Un mécanisme moléculaire doit faire le lien entre l'expression de *dilp8* et l'état de croissance des organes pour assurer la coordination inter organes. J'ai pu montrer un lien moléculaire et fonctionnel direct entre la croissance des organes contrôlée par la voie de signalisation Hippo et les niveaux d'expression de *dilp8* au cours du développement normal. La régulation de *dilp8* par la voie de signalisation Hippo est pertinente fonctionnellement, puisqu'une mutation des 3 HREs par CRISPR aboutit à des animaux présentant une asymétrie bilatérale.

VII. Articles publiés

1. Drosophila Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability

a. Introduction

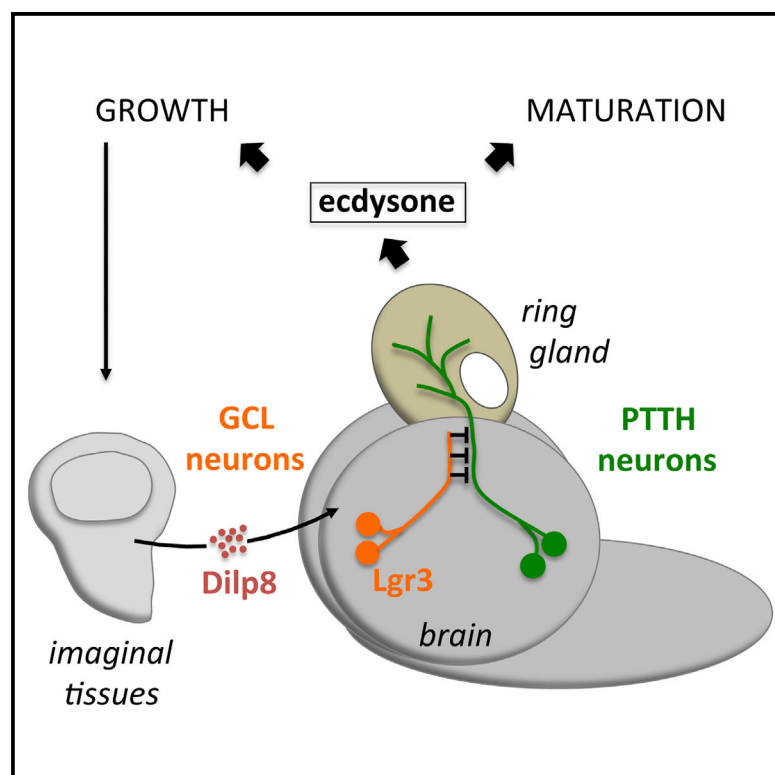
La stabilité développementale se traduit par une symétrie correcte des organes pairs. Dilp8 est impliqué dans le contrôle d'un mécanisme homéostatique qui coordonne la croissance avec la maturation des organes. Dans cet article, nous avons pu montrer que Lgr3 est le récepteur de Dilp8. La fonction homéostatique de Dilp8 passe par sa liaison à Lgr3 dans une population de neurones appelés GCL. Ces neurones sont en contact avec les neurones PTTH formant un relais entre les tissus en croissance et la PG, lieu de production de l'ecdysone. Ce circuit neuronal formé par les neurones GCL et PTTH pourrait être au centre de la régulation de la stabilité développementale par Dilp8.

b. Article

Current Biology

Drosophila Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability

Graphical Abstract



Authors

Julien Colombani, Ditte S. Andersen, Laura Boulan, ..., Virginie Virolle, Michael Texada, Pierre Léopold

Correspondence

ditte.andersen@unice.fr (D.S.A.), leopold@unice.fr (P.L.)

In Brief

In flies, the relaxin-like hormone Dilp8 coordinates organ growth and limits fluctuating asymmetry. Colombani et al. show that Dilp8 functions require Lgr3, a member of the relaxin-receptor family, in two pairs of neurons participating in a neurosecretory circuit that ultimately controls the production of the steroid ecdysone.

Highlights

- The relaxin family receptor Lgr3 controls Dilp8-induced developmental delay
- A single pair of bilateral Lgr3-positive (GCL) neurons mediates Dilp8 function
- GCL neurons physically interact with PTTH neurons
- Lgr3 signaling in GCL neurons coordinates growth and limits developmental variability



Colombani et al., 2015, Current Biology 25, 2723–2729
October 19, 2015 ©2015 Elsevier Ltd All rights reserved
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.020>

CellPress

Drosophila Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability

Julien Colombani,^{1,2,3,5} Ditte S. Andersen,^{1,2,3,5,*} Laura Boulan,^{1,2,3} Emilie Boone,^{1,2,3} Nuria Romero,^{1,2,3} Virginie Virolle,^{1,2,3} Michael Texada,⁴ and Pierre Léopold^{1,2,3,*}

¹University of Nice-Sophia Antipolis, Institute of Biology Valrose, 06108 Nice, France

²CNRS, Institute of Biology Valrose, 06108 Nice, France

³INSERM, Institute of Biology Valrose, 06108 Nice, France

⁴HHMI Janelia Research Campus, 19700 Helix Drive, Ashburn, VA 20147, USA

⁵Co-first author

*Correspondence: ditte.andersen@unice.fr (D.S.A.), leopold@unice.fr (P.L.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.020>

SUMMARY

Early transplantation and grafting experiments suggest that body organs follow autonomous growth programs [1–3], therefore pointing to a need for coordination mechanisms to produce fit individuals with proper proportions. We recently identified *Drosophila* insulin-like peptide 8 (Dilp8) as a relaxin and insulin-like molecule secreted from growing tissues that plays a central role in coordinating growth between organs and coupling organ growth with animal maturation [4, 5]. Deciphering the function of Dilp8 in growth coordination relies on the identification of the receptor and tissues relaying Dilp8 signaling. We show here that the orphan receptor leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 3 (Lgr3), a member of the highly conserved family of relaxin family peptide receptors (RXFPs), mediates the checkpoint function of Dilp8 for entry into maturation. We functionally identify two Lgr3-positive neurons in each brain lobe that are required to induce a developmental delay upon overexpression of Dilp8. These neurons are located in the pars intercerebralis, an important neuroendocrine area in the brain, and make physical contacts with the PTTH neurons that ultimately control the production and release of the molting steroid ecdysone. Reducing Lgr3 levels in these neurons results in adult flies exhibiting increased fluctuating bilateral asymmetry, therefore recapitulating the phenotype of *dilp8* mutants. Our work reveals a novel Dilp8/Lgr3 neuronal circuitry involved in a feedback mechanism that ensures coordination between organ growth and developmental transitions and prevents developmental variability.

RESULTS

A Functional Screen for the Dilp8 Receptor Identifies Lgr3

The development of *Drosophila* larvae is marked by an intense growth of imaginal structures called discs that stops with maturation or metamorphosis. Organ growth coordination is crucial during this period, allowing corrections for abnormal growth (injury, slow growth, or tumoral growth) as well as maintenance of proper body proportions. Growth coordination involves a checkpoint that delays the transition from juvenile development to maturation [1]. This mechanism ensures that organs reach their appropriate sizes before the end of larval development. In addition, a continuous growth feedback mechanism allows tissues to synchronize their growth while they develop [6]. We previously identified the coordination hormone Dilp8 in a genetic screen for molecules coupling organ growth with developmental transitions [4]. Dilp8 is secreted from injured or abnormally growing organs and acts remotely on the central brain complex to suppress production of the molting hormone ecdysone by the prothoracic gland (PG; a substructure of the larval ring gland), thereby delaying the developmental transition from larvae to pupae [4, 5]. Interestingly, *dilp8* mutant animals display increased fluctuating bilateral asymmetry, pointing to a role of Dilp8 in coordinating growth between organs in healthy animals [5]. To gain insight into Dilp8 function, we designed a genetic screen to identify its receptor and target tissue(s). We reasoned that silencing of the receptor for Dilp8 in its target tissue would rescue the delay induced by Dilp8 overexpression. For this purpose we made use of two binary systems [7] allowing the simultaneous disc-specific expression of *dilp8* (*m-LexA>lexAop-dilp8*) and RNAi-mediated knockdown of a collection of membrane receptors in candidate target tissues (*tissue-specific-GAL4>UAS-RNAi*) (Figure 1A). We previously showed that co-culturing ring gland/brain complexes with *dilp8*-expressing imaginal discs is sufficient to suppress ecdysone activity [4], implementing that Dilp8 acts either directly on the PG to control ecdysone production or through a neuronal relay localized in the brain. To distinguish between these possibilities, we designed three RNAi-mediated knockdown

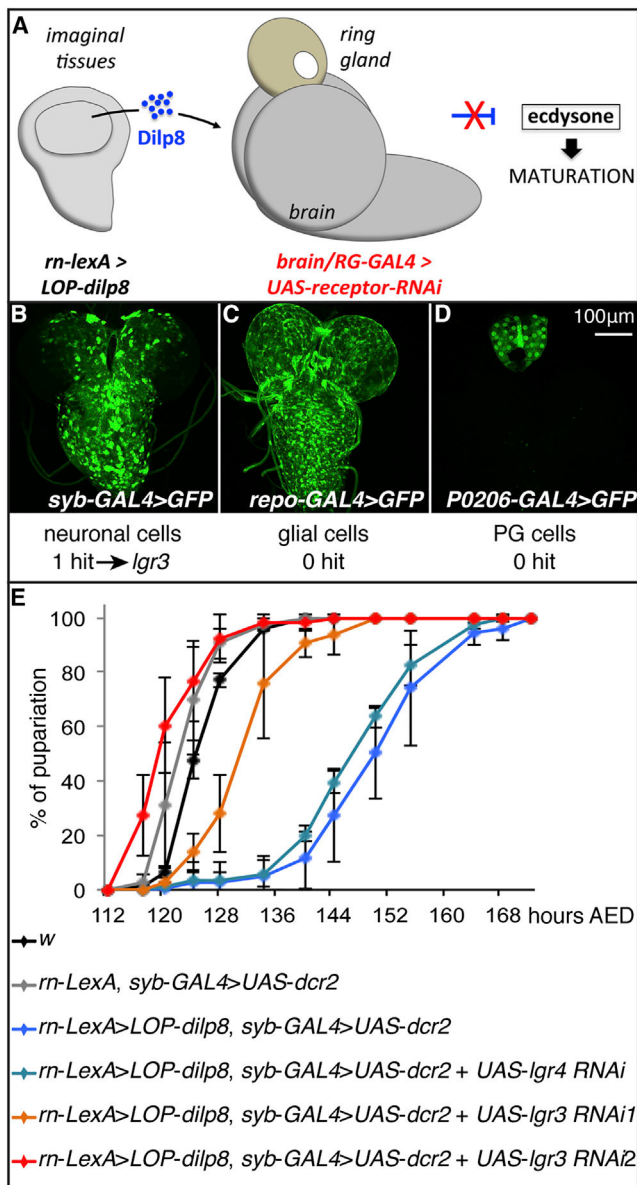


Figure 1. The Lgr3 Receptor Is Required in the Brain for the Dilp8-Induced Developmental Delay

(A) Screening scheme: the *rn-LexA/lexAop (LOP)-dilp8* construct allows overexpression of *dilp8* in discs and induces a developmental delay. This delay is used to screen a biased RNAi collection targeting membrane receptors in the glia, the brain neurons, or the prothoracic gland (PG) using the *GAL4/UAS* system.

(B–D) Larval brains and ring gland dissected 116 hr after egg deposition (AED). GFP highlights expression patterns of *syb-GAL4* in the brain neurons (B), *repo-GAL4* in the glia (C), and *P0206-GAL4* in the ring gland (PG + corpora allata; D). (E) Rescue of the Dilp8-induced delay at pupariation upon silencing *Lgr3* in the brain using the *syb-GAL4* driver. Silencing *Lgr4* has no effect on the pupariation time. Percentage of larvae that have pupariated at the indicated hours AED is shown ($n > 90$, triplicate experiments, error bars represent SEM).

strategies, targeting all G protein-coupled receptors (GPCRs) (see Table S1) and insulin-like receptors in the PG (*P0206-GAL4*) or in the CNS using glia (*repo-GAL4*) and neuron (*synaptobrevin (syb)-GAL4*) drivers (Figures 1B–1D). Individual knock-

down of each of these receptors in the glia and the PG did not rescue the delay induced by overexpression of Dilp8, suggesting that neither of these tissues is a direct target of Dilp8. By contrast, screening the same collection of receptors using the neuronal tester-line (*rn-LexA > lexAop-dilp8; syb-GAL4*), we identified one candidate RNAi line that fully rescued the delay (Figures 1B and 1E). This RNAi line targets the leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 3 gene (*Lgr3*). We confirmed the rescue of the delay using a second RNAi line targeting *Lgr3* expression (Figure 1E). *Lgr3* is an orphan receptor that belongs to the highly conserved family of relaxin family peptide receptors (RXFPs), sharing 34% identity with human RXFP1 and RXFP2 [8, 9]. We further observed that neuronal silencing of *Lgr4*, which encodes the other orphan fly member of the RXFP family, does not rescue the Dilp8-induced delay (Figure 1E).

Identification of the Dilp8-Responsive Neurons

To visualize the *Lgr3* expression pattern, we generated a transgenic line carrying a genomic bacterial artificial chromosome (BAC) containing the entire *Lgr3* locus with the first coding exon replaced by a *GAL4::VP16* cassette (aligned at the ATG initiation codon) and combined with a new 3' UTR (*Lgr3-GAL4*, see Figure 2A). We used the *Lgr3-GAL4* line to drive expression of GFP and observed a limited number of GFP-labeled neurons localized in the brain lobes and several along the ventral nerve cord (Figure 2B). Using this *GAL4* driver line, we could not detect GFP in other examined larval tissues including the PG, fat body and mitotic tissues, suggesting that *Lgr3* is predominantly expressed in the brain as reported in Fly Atlas and [9]. We next generated a tester line allowing *dilp8* expression in the discs while knocking down *Lgr3* using a *GAL4* driver of choice (*rn-LexA > lexAop-dilp8, Lgr3-RNAi*). Crossing this line to the *Lgr3-GAL4* driver fully rescues the 30-hr delay induced by overexpression of *dilp8* (Figure 2D). This shows that *Lgr3* signaling is required in one or several neurons targeted by the *Lgr3-GAL4* line to mediate the Dilp8-induced delay. To specify these *Lgr3*-positive neurons, we analyzed other transgenic lines expressing *GAL4* under the control of fragments of the *Lgr3* promoter (Janelia Rubin Gal4 collection; [10]). Out of five lines tested, only one (*R19B09-GAL4*, Figure 2C) efficiently rescued the delay induced by Dilp8 (Figure 2E). Therefore, a subpopulation of neurons targeted by both *Lgr3-GAL4* and *R19B09-GAL4* is needed to mediate this function. To identify these neurons, we conducted intersection-staining experiments combining *R19B09-LexA*-driving expression of a GFP (*R19B09-LexA > lexAop-GFP*) with *Lgr3-GAL4*-driving expression of a red fluorescent protein (RFP) (*Lgr3-GAL4 > UAS-RFP*). Strikingly, a single pair of bilateral neurons in the brain lobes stained positive for both GFP and RFP, hereafter referred to as growth coordinating *Lgr3* (GCL) neurons (Figures 3A–3A''). No overlap was observed in the ventral nerve cord (Figures 3A–3A''), suggesting that neurons in this area are not necessary for Dilp8-induced developmental delay. We confirmed this intersection by removing the transcription stop cassette of a *UAS > stop > GFP* using the *R19B09-LexA > LOP-flp* combined with *Lgr3-GAL4*. In this genetic context, only the two GCL neurons and their projections are labeled with GFP (Figure 3B), identifying them as necessary neurons for mediating the timing function of Dilp8. The cell bodies of the two GCL neurons are located in the anterior midline area of the brain known as the pars intercerebralis, which

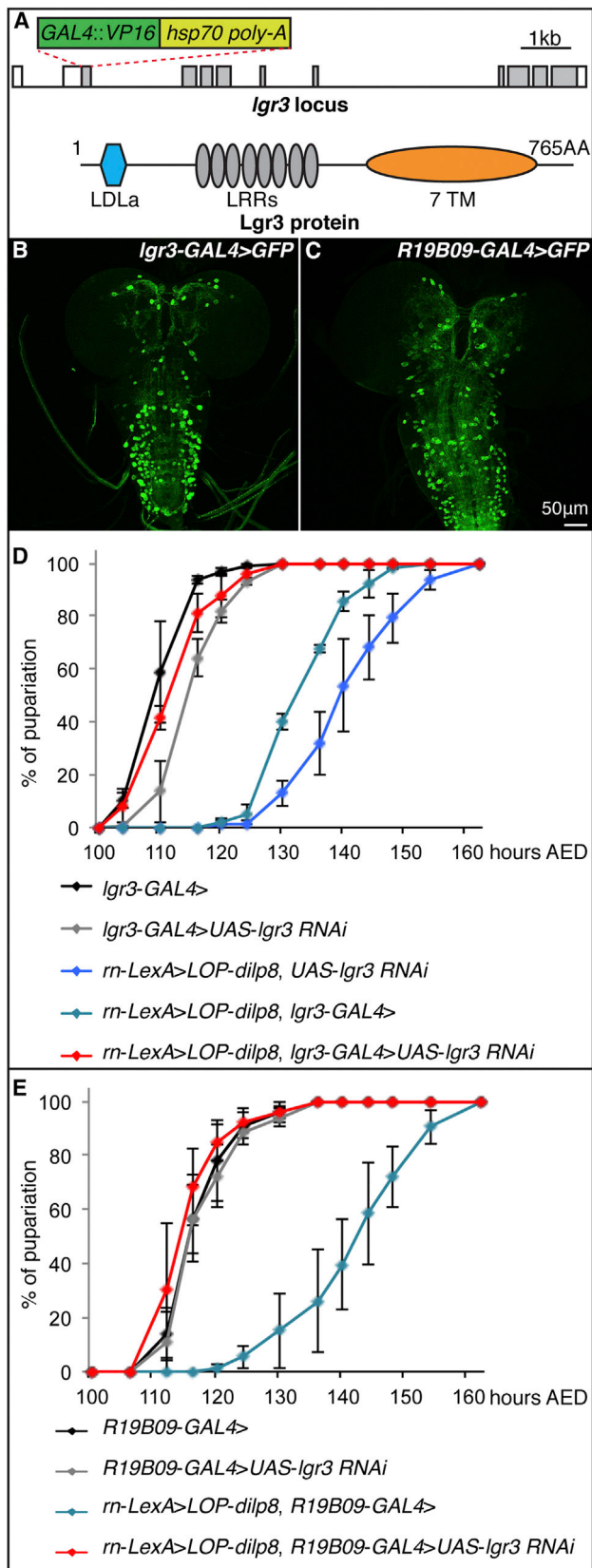


Figure 2. Lgr3 Is Expressed in a Subpopulation of Neurons in the Brain

(A) Schematics of the modified *lgr3* locus where part of the first coding exon is replaced by *GAL4::VP16* (top) and the structural domains present in the *Lgr3* protein (bottom). LDLa, low-density lipoprotein receptor domain class A; LRR, leucine-rich repeat; TM, trans-membrane domain.

(B and C) Larval brains dissected 110 hr AED. GFP is used to visualize the expression patterns of the *lgr3-GAL4* (B) and *R19B09-GAL4* (C) drivers.

(D and E) Rescue of the *Dilp8*-induced delay upon silencing of *lgr3* in neurons targeted by *lgr3-GAL4* (D) and *R19B09-GAL4* (E) driver lines. Percentage of larvae that have pupariated at the indicated hours AED is shown ($n > 90$, triplicate experiments, error bars represent SEM).

contains the majority of the neurosecretory cells (NSCs), some of which project onto the ring gland [11]. Close examination of the GCL neurons reveals that they do not project on the PG, suggesting that they may serve as intermediate neurons in the circuitry controlling ecdysone production. Interestingly, the GCL neurons present a dense axonal arborization projecting toward the medial-lateral part of the brain and surrounding the dendritic projections of PTTH-positive neurons (Figures 3C and S1A–S1C’). PTTH neurons project their axons onto the PG and control ecdysone production by activating the PTTH receptor Torso on PG cells [12, 13]. This suggests that GCL neurons control ecdysone biosynthesis by modulating PTTH neuron activity and/or the production and/or release of PTTH. In line with this, GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) [14, 15] reveals a cloud of GFP-positive dots in this area, indicative of physical connections between the two populations of neurons (Figures 3D and 3D’).

Lgr3 Signaling in GCL Neurons Systemically Controls Tissue Growth

We previously showed that overexpression of *Dilp8* in imaginal discs induces a reduction of their growth rate [4]. This suggests that in condition of growth perturbation, the secretion of *Dilp8* by slow-growing tissues could remotely inhibit growth of unaffected organs, thereby contributing to growth coordination. However, whether this growth inhibition involves local effects of *Dilp8* on peripheral tissues or systemic effects relayed by endocrine signals, or both, is not known. To address this question, we measured the size of wing discs from control, *m-LexA>lexAop-dilp8*, and *rn-LexA>lexAop-dilp8/lgr3-GAL4>lgr3-RNAi* animals. Overexpressing *dilp8* using *rn-LexA>lexAop-dilp8* recapitulated the disc growth inhibition previously reported with the analogous *GAL4/UAS* system (Figure 4A) [4]. Silencing *lgr3* using either *lgr3-GAL4* or *R19B09-GAL4* fully rescued disc growth inhibition (Figures 4A and S2), suggesting that *Lgr3* is required in the GCL neurons to inhibit the growth of peripheral tissues in a systemic manner. This suggests that *Dilp8/Lgr3* signaling in GCL neurons could modulate systemic growth through the control of ecdysone production. This is in line with previous findings showing that ecdysone promotes growth of imaginal tissues [16–19] and that feeding animals with ecdysone is sufficient to abrogate inter-organ growth coordination [6].

Lgr3 Signaling in GCL Neurons Is Required for the Maintenance of Bilateral Symmetry

dilp8 mutant individuals display strong deviations from bilateral symmetry [5], a phenotype referred to as fluctuating asymmetry

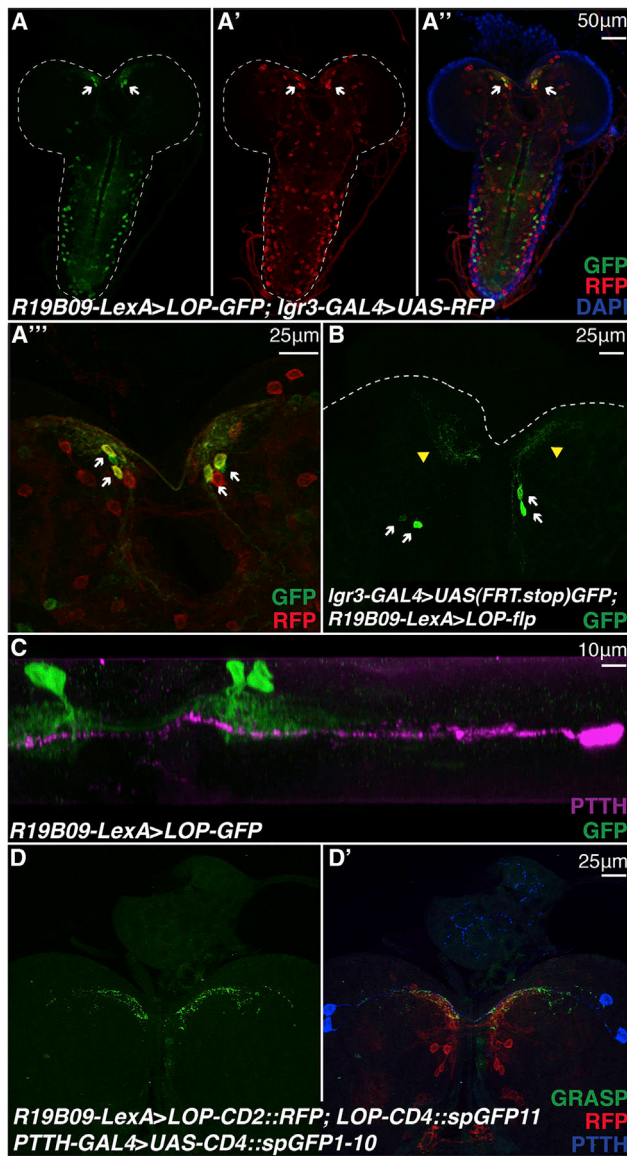


Figure 3. Identification of Lgr3 Neurons Relaying the Dilp8-Induced Delay

(A–A''') The expression patterns of *R19B09-LexA* and *lgr3-GAL4* were simultaneously visualized using *LexAop-GFP* (A and A''') and *UAS-RFP* (A' and A'''). Only one pair of bilateral neurons stains positive for both GFP and RFP (white arrows) on larval brains dissected 110 hr AED. DAPI was used to stain the nuclei (A'' and A''').

(B) *R19B09-LexA* induced expression of a flipase removing a transcriptional stop cassette and thus allowing labeling with GFP of the intersection with the *lgr3-GAL4* driver. Only one pair of bilateral neurons (white arrows) and their projections (yellow arrowheads) stain positive for GFP on larval brains dissected 110 hr AED.

(C) XZ section of dissected larval brains expressing GFP under the control of *R19B09-LexA* driver (green) and stained for PTTH (purple). Axons of the GFP-positive cells intersect with those of the PTTH neurons.

(D and D') GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) shows synaptic connections between Lgr3 and PTTH neurons. *R19B09-LexA* and *PTTH-GAL4* were simultaneously used to express membrane-tethered split-GFP. Reconstituted GFP is directly visualized in green (D and D'); Lgr3 neurons are labeled in red by a membrane-associated RFP (D), and PTTH neurons are labeled in blue (D').

(FA) that is frequently used to assess the level of developmental noise [20]. Thus, Dilp8 plays a central role in ensuring inter-organ growth coordination and developmental stability. We find that decoupling *dilp8* expression from organ growth by overexpressing *dilp8* in the discs also leads to an increase in FA (Figure 4B). Therefore, growth coordination relies on a tight coupling between *dilp8* levels and the growth status of organs. To test whether Lgr3 mediates this coupling, we reduced Lgr3 levels in the PG (*PO206-GAL4>lgr3-RNAi*) or the brain (*syb-GAL4>lgr3-RNAi*) in animals overexpressing Dilp8 in discs. Silencing *lgr3* in the PG had no effect on FA induced by Dilp8 expression, as expected given the absence of *lgr3* expression in this organ (Figure 4B). By contrast, silencing *lgr3* in the brain efficiently buffered the increase in FA induced by Dilp8 overexpression (Figure 4B). To test whether GCL neurons play a developmental role in controlling bilateral symmetry, we reduced Lgr3 levels in restricted subsets of neurons in otherwise wild-type animals and measured fluctuating asymmetry index (FAi). We found that the pan-neuronal knockdown of *lgr3* (*syb-GAL4>lgr3-RNAi*) recapitulates the FA phenotype observed in *dilp8* or *lgr3* mutant animals (Figures 4C, 4D, and S3). Furthermore, silencing *lgr3* in neurons targeted by either *lgr3-GAL4* or *R19B09-GAL4* induced a similar level of FA to that observed upon brain-wide knockdown (Figure 4C). This demonstrates that Lgr3 signaling in the two GCL neurons is required for the maintenance of bilateral symmetry and the control of developmental variability.

DISCUSSION

Dilp8 belongs to a diverse family of relaxin- and insulin-like hormones. Whereas some members of this family have well-defined roles in humans, others remain poorly characterized. We here identify the fly relaxin receptor Lgr3 as a downstream component of Dilp8 signaling in the coupling of organ growth with animal maturation. We identify two GCL neurons in the pars intercerebralis that make physical contacts with PTTH neurons and therefore serve as an intermediate relay between growing tissues and the PG. It will be of future interest to resolve how Lgr3 signaling in the GCL neurons mechanistically couples with PTTH activity and ecdysone production.

Knocking down Lgr3 in the GCL neurons recapitulates the elevated levels of FA observed in *dilp8* or *lgr3* mutant animals. Moreover, ectopic Dilp8 expression also induces FA, which is buffered by reducing neuronal Lgr3 levels. This indicates that levels of Dilp8 signaling during development are finely tuned in order to restrict developmental noise.

The results presented here are consistent with a model whereby Dilp8 signaling in GCL neurons acts on ecdysone production by modulating the activity of PTTH neurons (Figure 4E). This explains the observed effect of Dilp8 on the timing of the larva-to-pupa transition. Interestingly, our data also suggest that Dilp8/Lgr3 signaling in the GCL neurons controls growth coordination of peripheral organs through systemic ecdysone levels. It was previously proposed that inter-disc growth coordination relies on systemic effects mediated by ecdysone [6], and several reports indicate that ecdysone is required for imaginal tissue growth both in flies and in Lepidoptera [16–19, 21]. Future research will aim at deciphering the exact mechanism by which

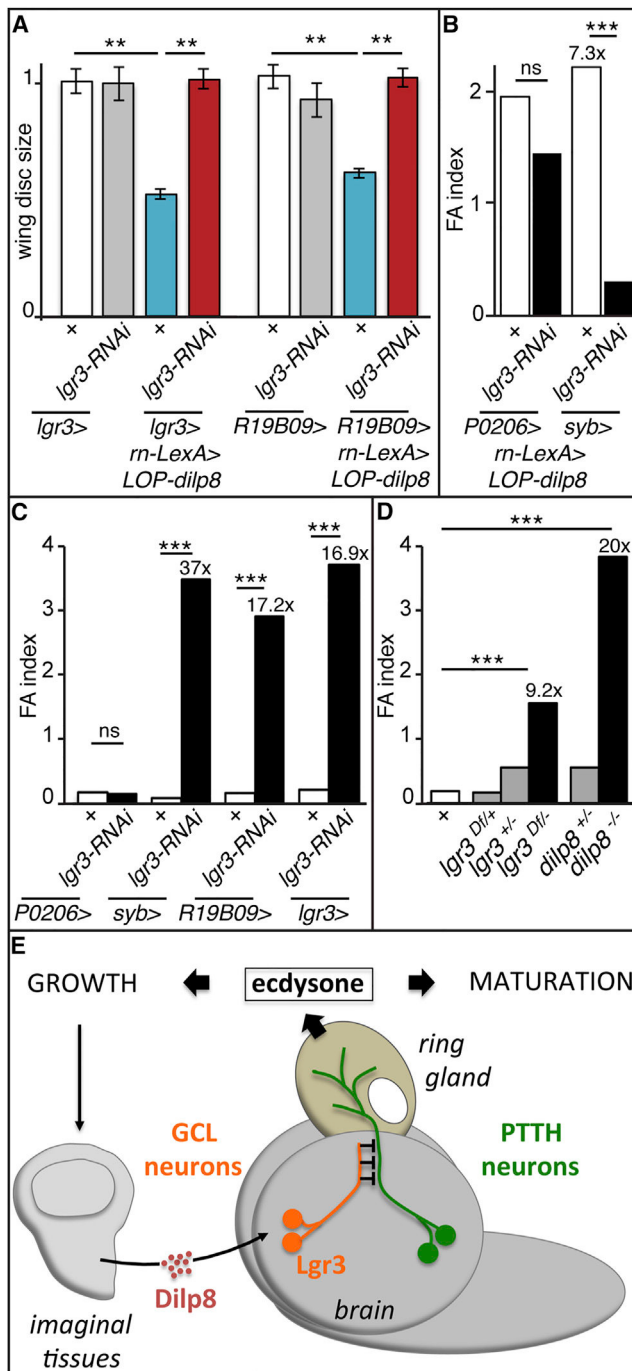


Figure 4. Lgr3 Signaling in the GCL Neurons Synchronizes Growth of Peripheral Tissues

(A) Bar histograms of wing disc size in the indicated genotypes, presented as percent of control disc. Silencing *lgr3* in GCL neurons is sufficient to rescue *Dilp8*-induced disc growth inhibition. Discs were dissected at 100 hr AED. Error bars represent SEM, ** $p < 0.01$.

(B–D) Bar histograms showing FA indices (FAi) of left and right wing areas measured on individuals of the indicated genotypes. Silencing *lgr3* in GCL neurons is sufficient to recapitulate the increase in FAi observed upon pan-neuronal *lgr3* knockdown or in *lgr3* mutant (ns, non-significant; ** $p < 0.00001$).

(E) Model for growth coordination by GCL neurons.

systemic ecdysone controls local tissue growth in order to mediate organ growth coordination.

Interestingly, the *Dilp8*-*Lgr3*-PG circuitry shares some characteristics with the hypothalamic-pituitary axis in humans in which the hypothalamus integrates and relays information about the state of the body to the pituitary gland through synaptic communication with other neurons or the release of hormones. The observation that mammalian RFPs are expressed in the hypothalamus [8] opens the possibility that similar relaxin/RXFP-dependent mechanisms monitoring the growth status of peripheral tissues are at play in humans. In line with this, reduced body mass, stress induced by heavy surgery, inflammatory diseases, and dietary restrictions have all been associated with a delay in puberty [22–24]. We therefore propose that the *Dilp8*-*Lgr3* axis represents an ancient surveillance mechanism ensuring developmental stability that may be conserved in higher animals.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fly Strains and Food

Animals were reared at 25°C (or 26.5°C for FAi measurement) on fly food containing, per liter, 17 g inactivated yeast powder, 83 g corn flour, 10 g agar, 60 g white sugar, and 4.6 g Nipagin M.

Transgenic Flies

The *Lgr3*-*GAL4*::*VP16* construct was generated by modification of the P[acman] BAC clone CH322-155A11 [25] (obtained from Children's Hospital Oakland Research Institute). The selectable markers in *pSK*+/+*rpsL*-*kana* were flanked by ~500-base pair homology arms (the 5' portion of *GAL4* and 3' termination sequences, respectively) amplified from the *GAL4* vector *pBPGUw* [10]. This construct was amplified by PCR to add *Lgr3*-specific homology arms using the following primers: sense agt aat tag ata agc gag cgt gca aaa cag gag caa acc gat aaa tcg cca TGA AGC TAC TGT CTT CTA TCG AAC AAG C and anti-sense tag gtt tgc gaa tga tgg aat ttt gaa agg aca tca ctc taa gga ctc acG ATC TAA ACG AGT TTT TAA GCA AAC TCA CTC CC (*Lgr3*-specific sequences are in lower case; *GAL4* and terminator sequences are capitalized), and the cassette was recombined into the BAC. In a second recombination step, this landing site was replaced with full-length *GAL4*::*VP16*-*HSP70* amplified from *pBPGAL4.2*::*VP16Uw* [26]. As a result, the coding portion of the first coding exon of *Lgr3* was replaced by *GAL4*::*VP16* (aligned at the ATG initiation codon) and a new 3' UTR. The final BAC was verified by sequencing the recombined regions and integrated into *attP40* and *attP2* sites (adapted from [27]). *m*-*LexA* was generated by conversion of *m*-*lacZ* enhancer trap line (P[*lArB*]*rn*⁸⁹) to *LexA* line using targeted transposition [28]. The *LexA*-*GAD* line is a kind gift from J. Berni and M. Landgraf, University of Cambridge. To generate the *lexAop*-*dilp8*, *dilp8* coding sequence was PCR amplified from BDGP EST cDNA clones IP06470 and cloned into the pLot vector (J. Berni and M. Landgraf, University of Cambridge) using the following primers: sense CAC CAT GAG TTC AAA GTT GCA T, antisense TTA GCA GAA GAA CTC CTC C. The construct has been introduced into the germline by injections in the presence of a helper plasmid and inserted on the second or third chromosome (BestGene). The following RNAi lines were obtained from the TRiP collection at the Bloomington Stock Center (*lgr3* RNAi valium10 [BL28789] and valium22 [BL36887]) or at the collection of the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) for *lgr3* RNAi (KK v108915). *R19B09*-*LexA*; *R19B09*-*GAL4*; *UAS*-*GFP*; *tub*-*GAL4*; *UAS*-*CD8*-*GFP*; *UAS*-*CD8*-*CherryRFP*; *lexAop*-*CD8*-*GFP*; *Syb*-*GAL4*; *repo*-*GAL4*; *UAS*-*dcrc2*; *dilp8*^{M100727}; *lexAop2*-*FLPL*; *UAS*(FRT.stop)*mCD8*-*GFP*; *UAS*-*DenMark*; *UAS*-*sytr.eGFP*; *lgr3*^{Df(3R)BSC321}; and *lexAop*-*rCD2*-*RFP*; *UAS*-*CD4*-*spGFP1-10*, *lexAop*-*CD4*-*spGFP11* were obtained from the Bloomington Stock Center. The *P0206*-*GAL4* line was obtained from Flyview, Universität Münster. The *PTTH*-*GAL4* line was a gift from M. O'Connor (University of Minnesota).

lgr3 Mutant

The *lgr3* mutant was obtained using the CRISPR/Cas9 technique [29]. To determine the best genomic region to be targeted, we selected single-guided

RNA (sgRNA) target sequences as 20 nt sequences preceding an NGG PAM sequence in the genome (GN20GG). Secondary structure and off-target effects were checked through the use of BLAST applied to the *Drosophila* genome. Sequences that perfectly matched the final 12 nt of the target sequence and NGG PAM sequence were discarded. We generated the construct in the pCFD4 (Addgene plasmid #49411) using the primers LGR3-5'-KO-pCFD4-FORWARD: TAT ATA GGA AAG ATA TCC GGG TGA ACT TC gca aac cga taa atc gcc atg gtc ta GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG and LGR3-3'-KO-pCFD4-REVERSE: ATT TTA ACT TGC TAT TTC TAG CTC TAA AAC tag atg tgg cat gcc aaa tca ata c GAC GTT AAA TTG AAA ATA GGT C (*Lgr3*-specific sequences are in lower case) and following the protocol as described in: <http://www.crisprflydesign.org/wp-content/uploads/2014/06/Cloning-with-pCFD4.pdf>. Putative mutants were screened by PCR to identify a deletion on the genomic DNA (DNA preparations made using DNeasy Blood and Tissue kit, QIAGEN). The mutant PCR product was sequenced, and DNA breaks point were identified. The *lgr3* mutation consists of a 670-bp deletion including the start codon (see Figure S3).

Genetic Screens

As an unbiased approach to identify receptors required downstream of disc-secreted Dilp8 to delay larva-to-pupa transition, we used three tester lines to screen a collection of 150 RNAi lines targeting GPCRs and insulin-like peptide receptors for their ability to rescue the delay at pupariation when expressed in the glia (*w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8*; *m-LexA*, *repo-GAL4*/ *TM6b*, *tub>GAL80*), neurons (*w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8*; *m-LexA*, *syb-GAL4*/ *TM6b*, *tub>GAL80*), or PG (*w*; *P0206-GAL4*; *m-LexA*, *LOP-dilp8* / *TM6b*, *tub>GAL80*). Twenty virgins of the tester line were crossed with ten males of each of the RNAi lines. Six replicates were collected from each cross with collections from 2 to 4 hr.

Immunostainings of Larval Tissues

Tissues dissected from larvae in 1 × PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, [pH 8]) at the indicated hours after egg deposition (AED) were fixed in 4% formaldehyde (Sigma) in PBS for 20 min at room temperature, washed in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBT), blocked for 2 hr in PBT containing 10% FBS (PBS-TF), and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The next day, tissues were washed, blocked in PBS-TF, and incubated with secondary antibodies at 1/500 dilution (Cy3 conjugated donkey anti-rabbit, Cy5 conjugated donkey anti-guinea-pig from Jackson ImmunoResearch, goat anti-chicken Alexa fluor 488 from Invitrogen) for 2 hr at room temperature. After washing, tissues were mounted in Vectashield containing DAPI for staining of DNA (Vector Labs). Fluorescence images were acquired using a Leica SP5 DS (20 × and 40 × objectives) and processed using Adobe Photoshop CS5 or ImageJ. Wing discs areas were measured using ImageJ.

Antibodies

Chicken anti GFP (1/10,000) from Abcam, rabbit anti-Dsred (1/200) from Clontech and guinea pig anti-PTTH (1/500) [30] were used.

Pupariation Curves

L1 larvae were collected 24 hr after egg deposition on agar plates with yeast (4-hr egg collections) and reared in tubes (30 larvae each) containing standard food (see above). The number of larvae that had pupariated at a given time AED was scored every 6 hr.

Measurement of the FAI

L1 larvae were collected 24 hr after egg deposition (4-hr egg collections) and reared at 30 animals per tube at 26.5°C. Adult flies of the appropriate genotypes were collected and stored in ethanol and mounted in a Euparal solution. Pictures of dissected wings were acquired using a Leica Fluorescence Stereomicroscope MZ16 FA with a Leica digital camera DFC 490. Wing areas were measured using ImageJ. We used the FAI to assess intra-individual size variation between left and right wing areas as described in [31]. $FAI = Var(A_i)$, where A_i are the normalized differences between left and right wing area within a given individual ($n > 22$). *p* values are the results of an F test provided by Microsoft Excel (***p* < 0.00001).

Statistics

p values are the results of a Student's test provided by Microsoft Excel (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

Genotypes

The genotypes for Figure 1B are as follows: *w*; *UAS-GFP/+*; *syb-GAL4/+*. The genotypes for Figure 1C are as follows: *w*; *UAS-GFP/+*; *repo-GAL4/+*. The genotypes for Figure 1D are as follows: *w*; *UAS-GFP/P0206-GAL4/+*. The genotypes for Figure 1E are as follows: *w*; +; + (black); *w*; *UAS-dcr2/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/+* (gray); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/+* (dark blue); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/ UAS-lgr3 RNAi KK*; *m-LexA*, *syb-GAL4/+* (light blue); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium10* (orange); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22* (red).

The genotypes for Figure 2B are as follows: *w*; *UAS-GFP/ lgr3-GAL4/+*. The genotypes for Figure 2C are as follows: *w*; *UAS-GFP/+*; *R19B09-GAL4/+*. The genotypes for Figure 2D are as follows: *w*; *lgr3-GAL4/+*; + (black); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (gray); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (dark blue); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *m-LexA*, *LOP-dilp8/+* (light blue); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (red). The genotypes for Figure 2E are as follows: *w*; +; *R19B09-GAL4/+* (black); *w*; +; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ R19B09-GAL4* (gray); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8/ R19B09-GAL4* (light blue); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ R19B09-GAL4* (red).

The genotypes for Figure 3A are as follows: *w*; *R19B09-LexA/ UAS-CD8-cherryRFP*; *lgr3-GAL4/ LOP-CD8-GFP*. The genotypes for Figure 3B are as follows: *w*; *R19B09-LexA/ UAS(FRT.stop)mCD8-GFP*; *lgr3-GAL4/ LOP-FLP*. The genotypes for Figure 3C are as follows: *w*; *R19B09-LexA/+*; *LOP-CD8-GFP/+*. The genotypes for Figure 3D are as follows: *w*; *R19B09-LexA/ LOP-CD2.RFP*, *CoinFLP*; *PTTH-GAL4/ UAS-CD4-splitGFP1-10*, *lexAop-CD4-splitGFP11*.

The genotypes for Figure 4A are as follows: *w*; *lgr3-GAL4/+*; + (left, white); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (left, gray); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (left, blue); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (left, red); *w*; +; *R19B09-GAL4/+* (right, white); *w*; +; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ R19B09-GAL4* (right, gray); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8/ R19B09-GAL4* (right, blue); *w*; +; *m-LexA*, *LOP-dilp8*, *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ R19B09-GAL4* (right, red). The genotypes for Figure 4B are as follows, from left to right: *w*; *P0206-GAL4/+*; *m-LexA*, *LOP-dilp8/+* (white); *w*; *P0206-GAL4/+*; *m-LexA*, *LOP-dilp8/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22* (black); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/+* (white); *w*; *UAS-dcr2*, *LOP-dilp8/+*; *m-LexA*, *syb-GAL4/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22* (black). The genotypes for Figure 4C are as follows, from left to right: *w*; *P0206-GAL4/+*; + (white); *w*; *P0206-GAL4/+*; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (black); *w*; +; *syb-GAL4/+* (white); *w*; +; *syb-GAL4/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22* (black); *w*; +; *R19B09-GAL4/+* (white); *w*; +; *R19B09-GAL4/ UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22* (black); *w*; *lgr3-GAL4/+*; + (white); *w*; *lgr3-GAL4/+*; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/+* (black). The genotypes for Figure 4D are as follows, from left to right: *w*; +; + (white); *w*; +; *lgr3^{DF}/+* (gray); *w*; +; *lgr3^{mut}/+* (gray); *w*; +; *lgr3^{DF}/ lgr3^{mut}* (black); *w*; +; *dilp8^{M100727}/+* (gray); *w*; +; *dilp8^{M100727}/ dilp8^{M100727}* (black).

The genotypes for Figures S1A and S1C–S1C''' are as follows: *w*; *lgr3-GAL4/+*; *UAS-DenMark*, *UAS-syt.eGFP/+*. The genotypes for Figure S1B are as follows: *w*; +; *PTTH-GAL4/ UAS-DenMark*, *UAS-syt.eGFP*.

The genotypes for Figure S2 are as follows, from left to right: *w*; +; *tub-GAL4/+* (white); *w*; +; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ tub-GAL4* (gray); *w*; +; *syb-GAL4/+* (white); *w*; +; *UAS-lgr3 RNAi TRIP valium22/ syb-GAL4* (gray).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes three figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.020>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.C., D.S.A., L.B., E.B., and P.L. designed the research. J.C., D.S.A., L.B., E.B., M.T., N.R., and V.V. performed experiments. J.C., D.S.A., L.B., E.B., and P.L. analyzed the data. J.C., D.S.A., and P.L. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Mauri, G. Jarretou, and the Molecular Biology/Biochemistry Facility of the IBV for technical assistance; the Vienna *Drosophila* RNAi Centers, the *Drosophila* Genetics Resource Center, and the Bloomington Stock Center for providing stocks; and laboratory members for comments on the manuscript. We thank L.-A. Baena-Lopez, C. Alexandre, J.-P. Vincent, and I. Miguel-Alíaga for discussions, and we especially thank G. Meissner for fruitful discussions on neuronal circuitry. This work was supported by the CNRS, INSERM, ARC (postdoctoral salary to L.B.), the European Research Council (Advanced grant no. 268813 to P.L.), the Labex Signalife program (grant ANR-11-LABX-0028-01 to P.L.), and the HHMI Janelia (funding to M.T.).

Received: June 22, 2015

Revised: August 21, 2015

Accepted: September 8, 2015

Published: October 1, 2015

REFERENCES

- Bryant, P.J., and Simpson, P. (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q. Rev. Biol.* 59, 387–415.
- Lui, J.C., and Baron, J. (2011). Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr. Rev.* 32, 422–440.
- Twitty, V.C., and Schwind, J.L. (1931). The growth of eyes and limbs transplanted hetero-plastically between two species of *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.* 59, 61–86.
- Colombani, J., Andersen, D.S., and Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336, 582–585.
- Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguéla, 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.
- Parker, N.F., and Shingleton, A.W. (2011). The coordination of growth among *Drosophila* organs in response to localized growth-perturbation. *Dev. Biol.* 357, 318–325.
- del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., and Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* 9, 47–55.
- Bathgate, R.A., Halls, M.L., van der Westhuizen, E.T., Callander, G.E., Kocan, M., and Summers, R.J. (2013). Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol. Rev.* 93, 405–480.
- Van Hiel, M.B., Vandersmissen, H.P., Proost, P., and Vanden Broeck, J. (2015). Cloning, constitutive activity and expression profiling of two receptors related to relaxin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 68, 83–90.
- Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Lavery, T.R., et al. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9715–9720.
- Siegmund, T., and Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 431, 481–491.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.P., Beckstead, R.B., Warren, J.T., Thummel, C.S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., and O'Connor, M.B. (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev. Cell* 13, 857–871.
- Rewitz, K.F., Yamanaka, N., Gilbert, L.I., and O'Connor, M.B. (2009). The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science* 326, 1403–1405.
- Feinberg, E.H., Vanhove, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., and Bargmann, C.I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* 57, 353–363.
- Gordon, M.D., and Scott, K. (2009). Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron* 61, 373–384.
- Nijhout, H.F., and Callier, V. (2015). Developmental mechanisms of body size and wing-body scaling in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 141–156.
- Herboso, L., Oliveira, M.M., Talamillo, A., Pérez, C., González, M., Martín, D., Sutherland, J.D., Shingleton, A.W., Mirth, C.K., and Barrio, R. (2015). Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of Thor in *D. melanogaster*. *Sci. Rep.* 5, 12383.
- Jaszczak, J.S., Wolpe, J.B., Dao, A.Q., and Halme, A. (2015). Nitric Oxide Synthase Regulates Growth Coordination During *Drosophila melanogaster* Imaginal Disc Regeneration. *Genetics* 200, 1219–1228.
- Delanoue, R., Slaidina, M., and Léopold, P. (2010). The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Dev. Cell* 18, 1012–1021.
- Dongen, S.V. (2006). Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *J. Evol. Biol.* 19, 1727–1743.
- Nijhout, H.F., and Grunert, L.W. (2002). Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15446–15450.
- Ballinger, A.B., Savage, M.O., and Sanderson, I.R. (2003). Delayed puberty associated with inflammatory bowel disease. *Pediatr. Res.* 53, 205–210.
- Frisch, R.E., and Revelle, R. (1970). Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* 169, 397–399.
- Kennedy, G.C., and Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.* 166, 408–418.
- Venken, K.J., Carlson, J.W., Schulze, K.L., Pan, H., He, Y., Spokony, R., Wan, K.H., Koriabine, M., de Jong, P.J., White, K.P., et al. (2009). Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods* 6, 431–434.
- Pfeiffer, B.D., Ngo, T.T., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W., and Rubin, G.M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* 186, 735–755.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3312–3317.
- Sepp, K.J., and Auld, V.J. (1999). Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151, 1093–1101.
- Port, F., Chen, H.M., Lee, T., and Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E2967–E2976.
- Yamanaka, N., Romero, N.M., Martín, F.A., Rewitz, K.F., Sun, M., O'Connor, M.B., and Léopold, P. (2013). Neuroendocrine control of *Drosophila* larval light preference. *Science* 341, 1113–1116.
- Palmer, A., and Strobeck, C. (1986). Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17, 391–421.

Current Biology

Supplemental Information

***Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth
with Maturation
and Ensures Developmental Stability**

Julien Colombani, Ditte S. Andersen, Laura Boulan, Emilie Boone, Nuria Romero,
Virginie Virolle, Michael Texada, and Pierre Léopold

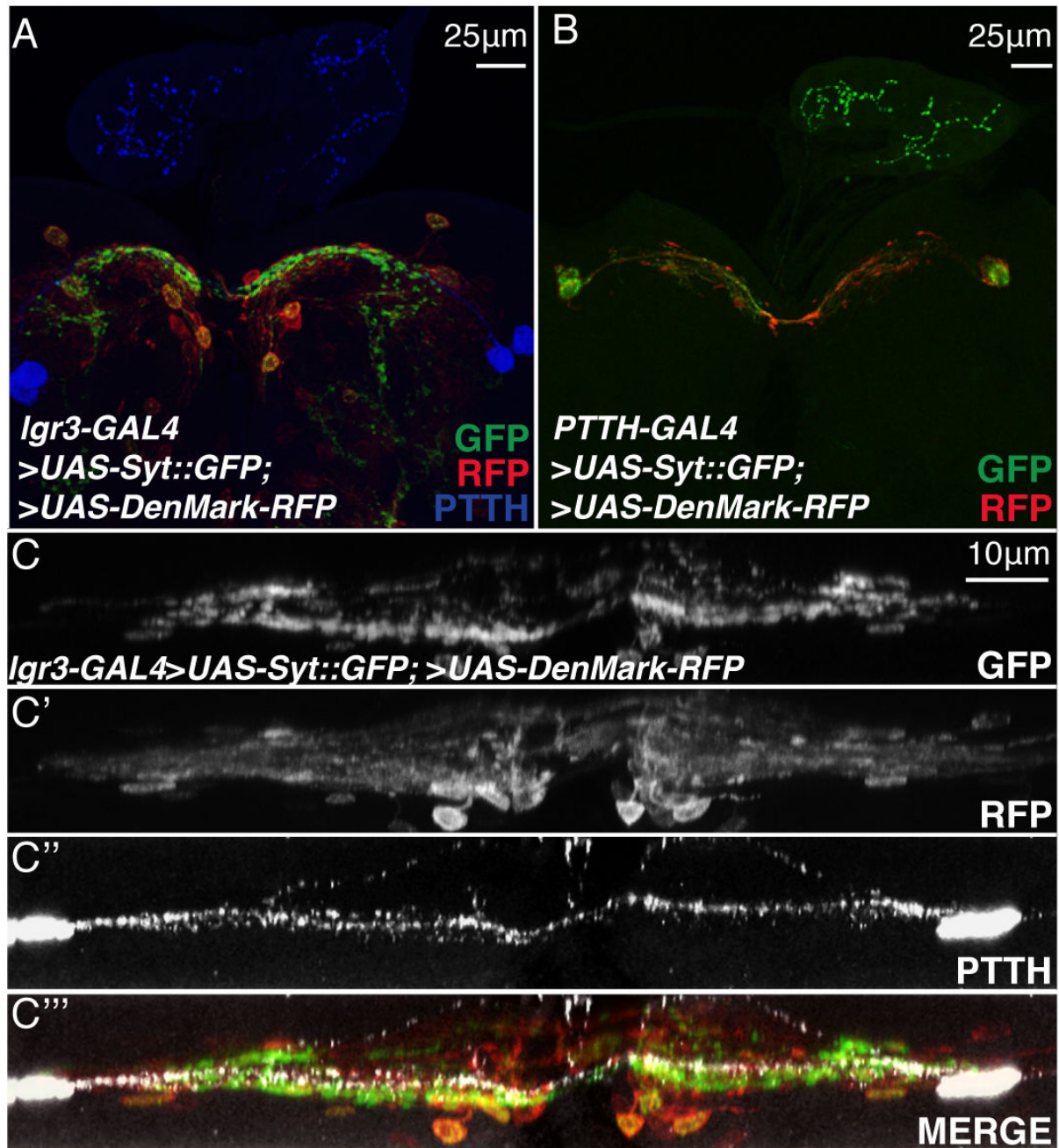


Figure S1. Axonal projections from *Lgr3* neurons intersect with *PTTH* neurons (related to main Fig. 3).

lgr3-GAL4 (A, C-C''') and *PTTH-GAL4* (B) drive expression of the dendritic marker (DenMark) and a synaptotagmin-eGFP fusion construct marking axonal projections. Brains are stained with anti-DsRed (DenMark, red, postsynaptic) and anti-GFP (synaptotagmin, green, presynaptic) antibodies. (A) and (B) represent XY sections. (C-C''') represent XZ sections of the same preparation as (A). Axonal projections from *Lgr3* neurons intersect with dendritic projections of the *PTTH* neurons.

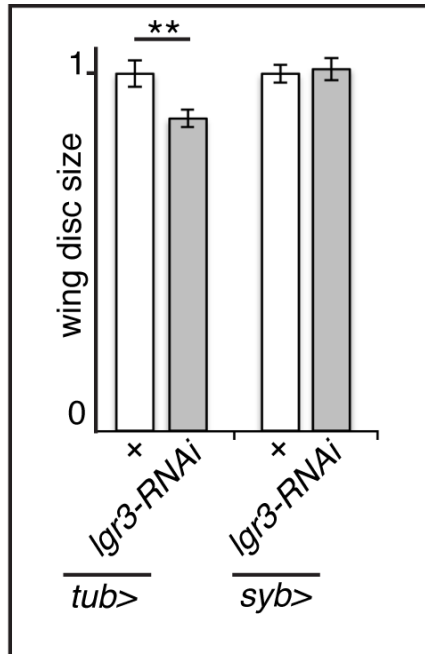


Figure S2. Pan-neuronal knockdown of *lgr3* has no effect on growth of peripheral tissues (related to main Fig. 4).

Bar histograms of wing-disc size in the indicated genotypes, presented as percent of control disc. Silencing *lgr3* in neurons using *syb-GAL4* does not affect disc growth. Discs were dissected at 100 Hr AED. Error bars represent SEM, ** $p < 0.01$. Ubiquitous silencing of *lgr3* induces a mild reduction of disc growth.

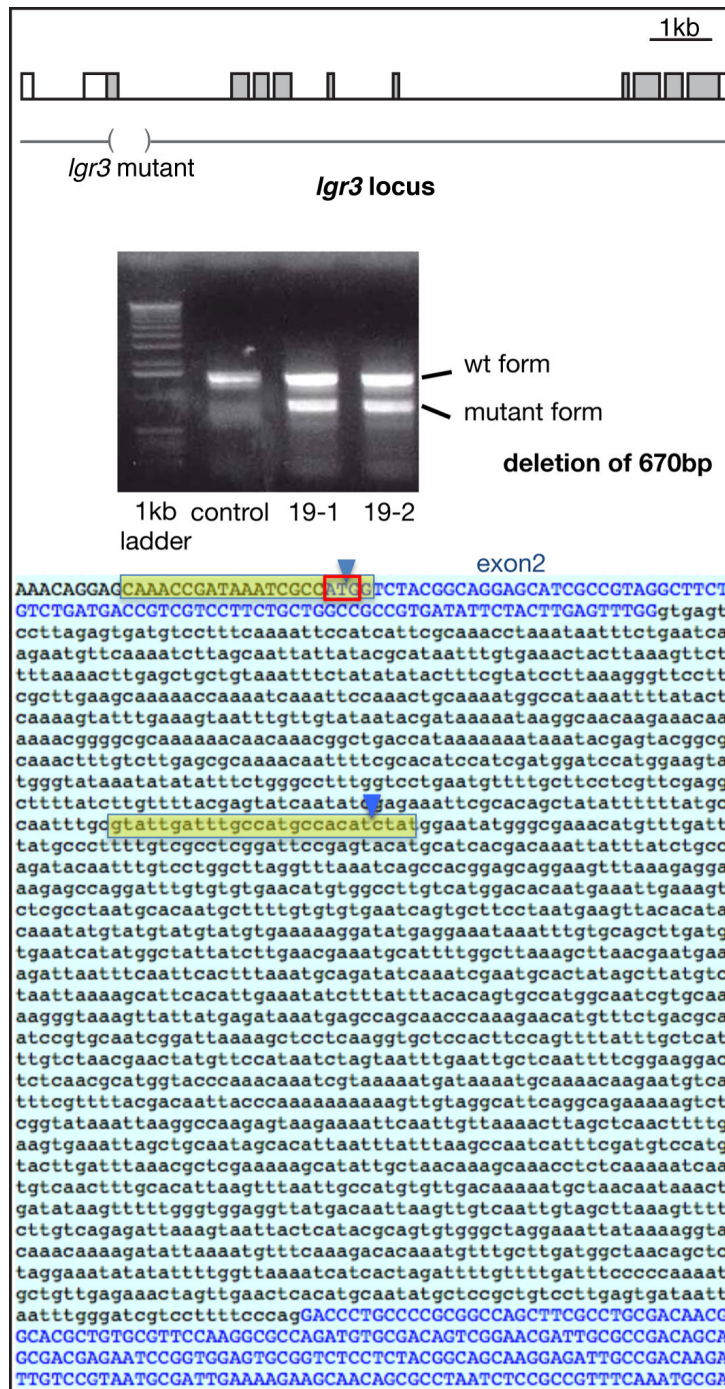


Figure S3. Molecular characterization of the *lgr3* mutant (related to main Fig. 4).

An *lgr3* mutant was obtained by CRISPR/Cas9 gene editing. Selected sgRNA target sequences are shown in yellow. Two identical *lgr3* mutants (19-1 and 19-2) were isolated by genomic PCR as showing a 670bp deletion including the start codon and all exon 2 (blue arrow heads).

Table S1: List of GPCR-encoding genes tested in the genetic screen

CG32476	CG7918	CG14593	CG4395	CG12532	CG9990
CG1004	CG7285	CG7887	CG33517	CG6705	CG17795
CG7485	CG10702	CG13995	CG42301	CG17061	CG2872
CG4356	CG5911	CG32540	CG30361	CG11144	CG8784
CG12073	CG7665	CG8930	CG17697	CG11895	CG10698
CG11325	CG31760	CG8795	CG12290	CG33696	CG9918
CG6965	CG42829	CG1214	CG5192	CG6936	CG4626
CG42796	CG5811	CG6530	CG10565	CG10626	CG16720
CG1147	CG34381	CG3022	CG16992	CG13803	CG12370
CG16766	CG6919	CG31660	CG8422	CG9753	CG10823
CG6706	CG7431	CG6986	CG13575	CG13579	CG7395
CG11561	CG2114	CG16785	CG6530	CG8985	CG13995
CG18314	CG18741	CG14575	CG13758	CG9652	CG6515
CG10001	CG3171	CG17084	CG4322	CG3856	CG15744
CG13229	CG32447	CG31714	CG7497	CG42244	CG4313
CG4521	CG33639	CG15113	CG33166	CG12370	CG9739
CG2872	CG2872	CG2872	CG2872	CG2872	CG7285
CG7285	CG13702	CG13702	CG34411	CG34411	CG31096
CG31096	CG33704	CG3837	CG2086	CG2086	CG10702
CG10702	CG4187	CG6881	CG5936	CG17415	CG6111
CG16740	CG5638	CG13948	CG14979	CG32261	CG7189
CG7303	CG10888	CG11318	CG12796	CG15556	CG15779
CG2061	CG30340	CG31714	CG32475	CG32853	CG34372
CG4168	CG4550	CG4875	CG7476	CG8285	CG9668

c. Conclusion

Au cours de ma participation à cet article, j'ai étudié le rôle des neurones GCL dans le contrôle de la stabilité développementale. J'ai pu montrer qu'une inhibition de *Lgr3* dans les neurones GCL reproduit le phénotype d'élévation de la FA observé dans les mutants *dilp8* ou *Lgr3*. De façon intéressante, le circuit neuronal formé par les GCL et la PG possède certaines caractéristiques du système hypothalamus-hypophyse chez l'homme. L'hypothalamus intègre et transmet des informations sur l'état de croissance des organes à l'hypophyse qui communique avec d'autres populations de neurones et relargue des hormones (par exemple l'hormone de croissance). Des récepteurs de type relaxine sont exprimés au sein de l'hypothalamus, suggérant que des relaxines pourraient être sécrétées par des tissus en croissance et informeraient de l'état de croissance des tissus périphériques au SNC. Le duo *Lgr3*-*Dilp8* pourrait représenter un mécanisme de contrôle de la stabilité développementale conservée chez les animaux supérieurs.

2. The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth

a. Introduction

La perte de la polarité épithéliale est un événement clé de la croissance néoplasique. La voie de signalisation JNK joue un rôle important dans la progression de certaines tumeurs malignes épithéliales. Cependant, le lien entre la perte de polarité et la voie de signalisation JNK reste méconnu. Au sein d'un crible génétique construit pour identifier des molécules impliquées dans la croissance néoplasique, *grindelwald* a été découvert. *grindelwald* est un gène codant pour une protéine transmembranaire homologue de la famille des récepteurs TNF. L'équipe a montré que Grnd traduit la fonction apoptotique d'Eiger, l'unique TNF chez la drosophile. La surexpression d'une forme active de Grnd dans laquelle le domaine extracellulaire est manquant, est suffisante pour activer la voie de signalisation JNK *in vivo*. Grnd active aussi la capacité invasive des tumeurs *Ras^{V12}/scrib^{-/-}* à travers l'expression de la métalloprotéase MMP1 dépendante d'Eiger. Grnd se localise dans le domaine sub-apical de la membrane accolé au déterminant de polarité cellulaire Crumbs. Grnd couple la perte de polarité induite par Crumbs avec l'activation de la voie de signalisation JNK et la croissance néoplasique grâce à une interaction avec Veli/Lin7. Par conséquent, Grnd représente le premier exemple d'un récepteur TNF intégrant les signaux provenant Egr/TNF et des déterminants de la polarité apicale pour induire une mort cellulaire JNK dépendante et une croissance tumorale.

b. Article

The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth

Ditte S. Andersen^{1,2,3,4*}, Julien Colombani^{1,2,3,4*}, Valentina Palmerini⁵, Krittalak Chakrabandhu^{1,2,3,6}, Emilie Boone^{1,2,3,4}, Michael Röthlisberger⁷, Janine Toggweiler⁷, Konrad Basler⁷, Marina Mapelli⁵, Anne-Odile Hueber^{1,2,3,6} & Pierre Léopold^{1,2,3,4}

Disruption of epithelial polarity is a key event in the acquisition of neoplastic growth. JNK signalling is known to play an important part in driving the malignant progression of many epithelial tumours, although the link between loss of polarity and JNK signalling remains elusive. In a *Drosophila* genome-wide genetic screen designed to identify molecules implicated in neoplastic growth¹, we identified *grindelwald* (*grnd*), a gene encoding a transmembrane protein with homology to members of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. Here we show that Grnd mediates the pro-apoptotic functions of Eiger (Egr), the unique *Drosophila* TNF, and that overexpression of an active form of Grnd lacking the extracellular domain is sufficient to activate JNK signalling *in vivo*. Grnd also promotes the invasiveness of *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} tumours through Egr-dependent Matrix metalloprotease-1 (Mmp1) expression. Grnd localizes to the subapical membrane domain with the cell polarity determinant Crumbs (Crb) and couples Crb-induced loss of polarity with JNK activation and neoplastic growth through physical interaction with Veli (also known as Lin-7). Therefore, Grnd represents the first example of a TNFR that integrates signals from both Egr and apical polarity determinants to induce JNK-dependent cell death or tumour growth.

We recently carried out a genome-wide screen to identify molecules that are required for neoplastic growth¹. The condition used for this screen was the disc-specific knockdown of *avalanche* (*rotund* (*rn*)>*avl*-RNAi; *avalanche* also known as *syntaxin 7*), a gene encoding a syntaxin that functions in the early step of endocytosis². *rn*>*avl*-RNAi results in ectopic Wingless (Wg) expression, neoplastic disc overgrowth² (Fig. 1a, b), and a 2-day delay in larva-to-pupa transition¹. We screened a collection of 10,100 transgenic RNA interference (RNAi) lines for their ability to rescue the pupariation delay and identified 121 candidate genes¹. Interestingly, only eight candidate genes also rescued ectopic Wg expression and neoplastic overgrowth (Extended Data Fig. 1a). These included five lines targeting core components of the JNK pathway (Bendless, Tab2, Tak1, Hemipterous and Basket; Extended Data Fig. 1b). Using a *puckered* enhancer trap (*puc-lacZ*) as a readout for JNK activity, we confirmed that JNK signalling is highly upregulated in *rn*>*avl*-RNAi discs (Fig. 1a, b, right). One of the remaining lines targets *CG10176*, a gene encoding a transmembrane protein. Reducing expression of *CG10176* by using two different RNAi lines was as efficient as *tak1* silencing to restore normal Wg pattern and suppresses JNK signalling and neoplastic growth in the *rn*>*avl*-RNAi background (Fig. 1c, d and Extended Data Fig. 1c–e). Sequence analysis of *CG10176* identified a cysteine-rich domain (CRD) in the extracellular part with homology to vertebrate TNFRs (Fig. 1e and Extended Data Fig. 2) harbouring a glycosphingolipid-binding motif (GBM) characteristic of many TNFRs including Fas³

(Fig. 1e and Extended Data Fig. 2). We named *CG10176* *grindelwald* (*grnd*), after a village at the foot of Eiger, a Swiss mountain that lent its name to the unique *Drosophila* TNF, Egr. Immunostaining and subcellular fractionation of disc extracts confirmed that Grnd localizes to the membrane (Extended Data Fig. 1f–h). Moreover, co-immunoprecipitation experiments showed that both Grnd full-length and Grnd-intra, a form lacking its extracellular domain, directly associate with Traf2, the most upstream component of the JNK pathway (Fig. 1f–h). This interaction is disrupted by a single amino acid substitution within a conserved Traf6-binding motif⁴ (human TRAF6 is the closest homologue to Traf2; Fig. 1f–h and Extended Data Fig. 3). Overexpression of Grnd-intra, but not full-length Grnd, is sufficient to induce JNK signalling, ectopic Wg expression and apoptosis (Fig. 1i–j and Extended Data Fig. 4a–c), and Grnd-intra-induced apoptosis is efficiently suppressed in a *hep*⁷⁵ (JNKK) mutant background (Extended Data Fig. 4d, e), confirming that Grnd acts upstream of the JNK signalling cascade.

The *Drosophila* TNF Egr activates JNK signalling and triggers cell death or proliferation, depending on the cellular context⁵. We therefore tested whether Grnd is required for the small-eye phenotype generated by Egr-induced apoptosis in the retinal epithelium^{6,7} (*GMR*>*egr*; Fig. 2a, b). As previously shown, inhibition of JNK signalling by reducing *tak1* (ref. 6) or *traf2* (ref. 8) expression, or by overexpressing *puckered*⁷, blocks Egr-induced apoptosis and rescues the small-eye phenotype (Extended Data Fig. 5a–d). In contrast to a previous report⁹, RNAi silencing of *wengen* (*wgn*), a gene encoding a presumptive receptor for Egr, does not rescue the small-eye phenotype (Extended Data Fig. 5e). Furthermore, the small-eye phenotype is not modified in a *wgn*-null mutant background (Fig. 2c and Extended Data Fig. 5h, m, n), confirming that Wgn is not required for Egr-induced apoptosis in the eye. By contrast, reducing *grnd* levels partially rescues the Egr-induced small-eye phenotype, producing a ‘hanging-eye’ phenotype (Fig. 2d) that is not further rescued in a *wgn*-knockout (*wgn*^{KO}) mutant background (Extended Data Fig. 5e–i). A similar phenotype was previously reported as a result of non-autonomous cell death induced by a diffusible form of Egr¹⁰ (Extended Data Fig. 5k, l). This suggests that Grnd prevents Egr from diffusing outside of its expression domain. Co-immunoprecipitation experiments show that both full-length Grnd and Grnd-extra, a truncated form of Grnd lacking the cytoplasmic domain, associate with Egr through its TNF-homology domain (Fig. 2j, k). Although Grnd-extra can bind Egr, it cannot activate JNK signalling. Therefore, we reasoned that Grnd-extra expression might prevent both cell-autonomous and non-autonomous apoptosis by trapping Egr and preventing its diffusion and binding to endogenous Grnd. Indeed, *GMR*-Gal4-mediated expression of *grnd-extra* fully rescues the Egr small-eye phenotype (Fig. 2e and Extended Data Fig. 5j). To confirm that the removal of Grnd induces Egr-mediated non-autonomous cell death, we generated wing disc

¹University of Nice-Sophia Antipolis, Institute of Biology Valrose, Parc Valrose, 06108 Nice, France. ²CNRS, Institute of Biology Valrose, Parc Valrose, 06108 Nice, France. ³INSERM, Institute of Biology Valrose, Parc Valrose, 06108 Nice, France. ⁴Genetics and Physiology of Growth laboratory, Institute of Biology Valrose, Parc Valrose, 06108 Nice, France. ⁵Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology, Via Adamello 16, 20139 Milan, Italy. ⁶Death receptors Signalling and Cancer Therapy laboratory, Institute of Biology Valrose, Parc Valrose, 06108 Nice, France. ⁷Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Switzerland.

*These authors contributed equally to this work.

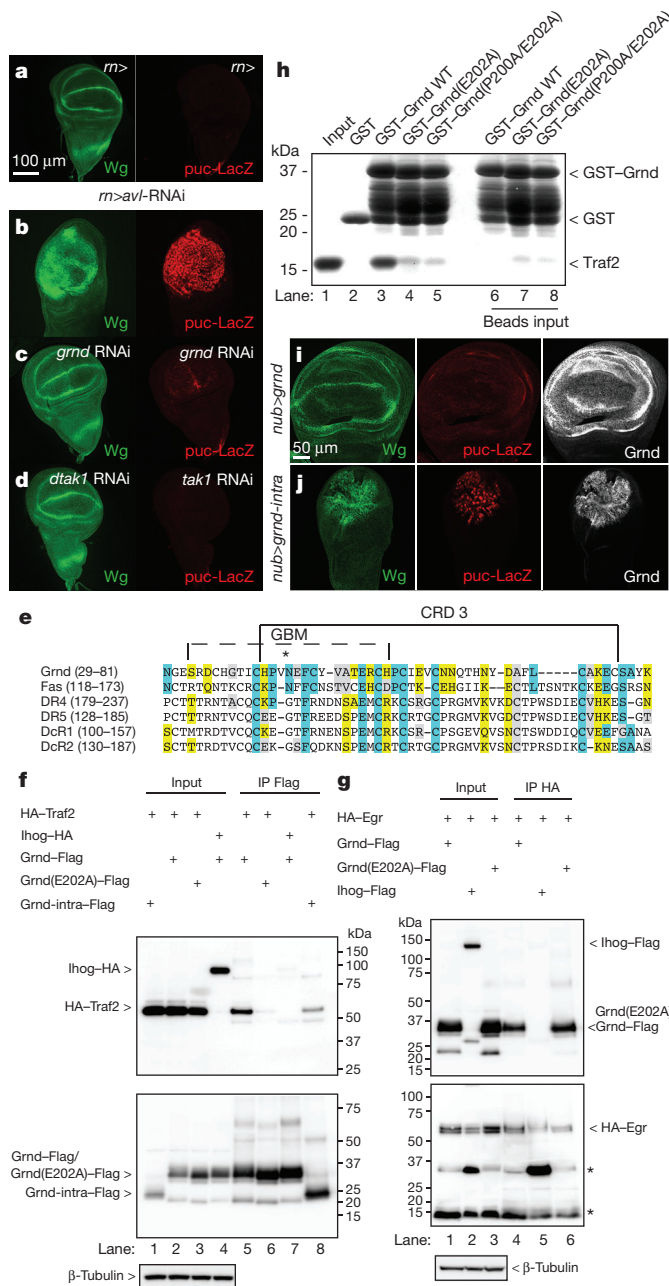


Figure 1 | Grnd is a novel member of the TNFR superfamily. **a–d**, Wing discs stained for Wg (left) or LacZ (right). **e**, Sequence alignment of Grnd and human TNFRs. Blue, identity; yellow, strong similarity to Grnd; grey, weak similarity to Grnd. **f, g**, Co-immunoprecipitation experiments from S2R⁺ cells co-expressing haemagglutinin (HA)–Traf2 or Ihog–HA (control), and either Grnd–Flag, Grnd-intra–Flag or Grnd(E202A)–Flag (**f**), or HA–Egr and either Grnd–Flag, Grnd(E202A)–Flag or Ihog–Flag (control) (**g**). Input loading is quantified using β -tubulin. **h**, Pull-down experiments of Traf2 with various truncated forms of glutathione S-transferase (GST)–Grnd. Coomassie blue staining is used to visualize the bound species. WT, wild type. **i–j**, Wing discs stained for Wg (left), LacZ (middle) and Grnd (right).

clones expressing *egr* alone, *egr* + *tak1* RNAi, or *egr* + *grnd* RNAi (Fig. 2f–i). As expected, reducing *tak1* levels in *egr*-expressing clones prevents their elimination by apoptosis (Fig. 2f, g). Similarly, reducing *grnd* levels prevents autonomous cell death, but also induces non-autonomous apoptosis (Fig. 2h, i). This suggests that Egr, like its mammalian counterpart TNF- α , can be processed into a diffusible form *in vivo* whose interaction with Grnd limits the potential to act

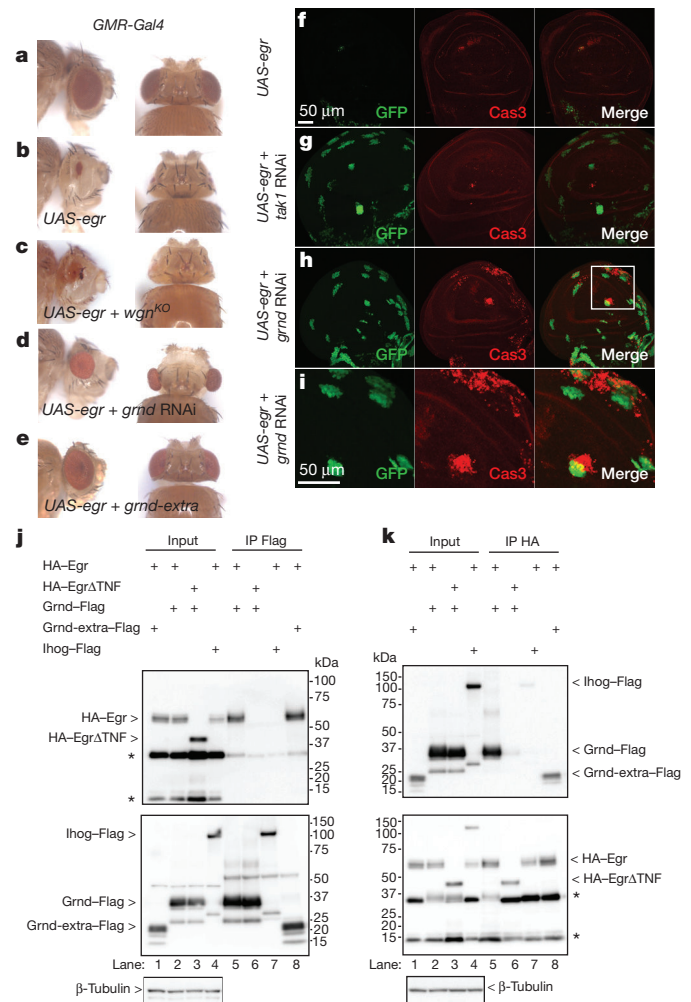


Figure 2 | Grnd is required for Egr-induced apoptosis. **a–e**, Light micrographs of *Drosophila* adult eyes of the indicated genotypes (all animals carry the *GMR-Gal4* driver). Original magnification, $\times 30$. **f–i**, Wing discs carrying green fluorescent protein (GFP)-labelled clones (green) expressing *egr* (**f**), *egr* + *tak1* RNAi (**g**) or *egr* + *grnd* RNAi (**h**, **i**) and stained for Caspase 3 (Cas3; red). A close-up shows non-autonomous cell death around the *egr* + *grnd* RNAi clones. **j, k**, Co-immunoprecipitation (IP) experiments from S2R⁺ cells expressing HA-Egr or HA-Egr Δ TNF (Egr lacking its TNF-homology domain; amino acids 278–415) and either Grnd-Flag, Grnd-extra-Flag or Ihog-Flag (control). Input loading is quantified using β -tubulin.

at a distance. Flies carrying homozygous (*grnd*^{Minos/Minos}) or transheterozygous (*grnd*^{Minos/Df}) combinations of a transposon inserted in the *grnd* locus express no detectable levels of Grnd protein (Extended Data Fig. 6a, b) and are equally resistant to Egr-induced cell death (Extended Data Fig. 6e–j). In addition, *grnd*^{Minos/Minos} mutant flies are viable and display no obvious phenotype (Extended Data Fig. 6c, d), suggesting that Grnd, like Egr, participates in a stress response to limit organismal damage. Collectively, our data demonstrate that Grnd is a new *Drosophila* TNF receptor that mediates most, if not all, Egr-induced apoptosis.

TNFs probably represent a danger signal produced in response to tissue damage to rid the organism of premalignant tissue or to facilitate wound healing. Disc clones mutant for the polarity gene *scribbled* (*scrib*) induce an Egr-dependent response resulting in the elimination of *scrib* mutant cells by JNK-mediated apoptosis^{11,12}. To test the requirement for Grnd in this process, we compared *scrib*-RNAi and *scrib*-RNAi + *grnd*-RNAi clones obtained 72 h after heat shock induction. As expected, *scrib*-RNAi cells undergo apoptosis and detach from

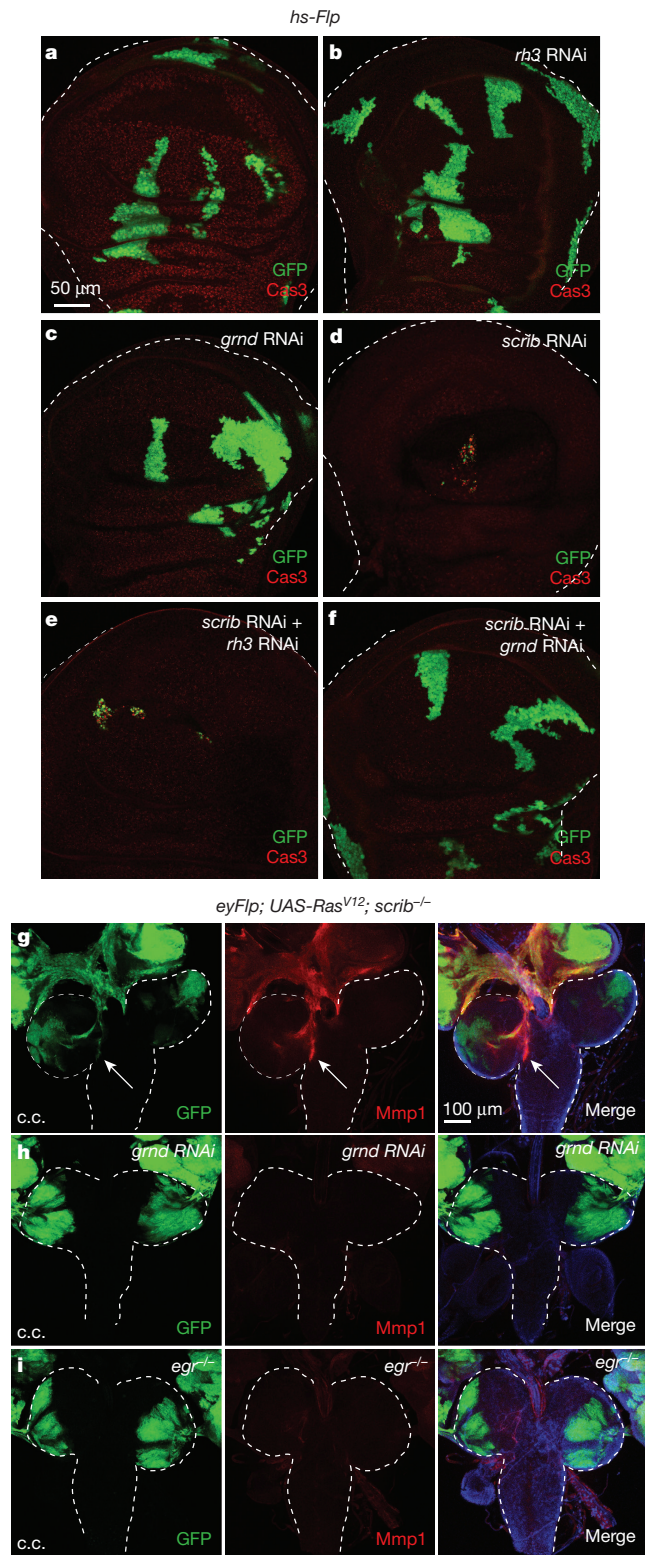


Figure 3 | Grnd is required for the Egr-induced invasiveness of *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} tumours. a–f, Wing discs dissected 5 days after egg deposition (AED) stained for Cas3 (red) and carrying GFP-labelled clones (green) of the indicated genotypes induced 2 days AED. a, b, e, Wild-type clones (a) and clones expressing the control *Rh3* RNAi (b) to exclude a Gal4 titration effect (e). g–i, Eye–brain complexes dissected 7 days AED carrying *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} (g) or *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} + *grnd* RNAi (h) clones (labelled by GFP), or *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} GFP-labelled clones in an *egr* mutant background (i) stained for Mmp1 (g–i, middle, red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} clones invade the ventral nerve cord (g, white arrow). c.c., cephalic complex.

the epithelium (Fig. 3a–d). By contrast, *scrib*-RNAi clones with reduced *grnd* expression survive (Fig. 3e, f), indicating that Grnd is required for Egr-dependent elimination of *scrib*-RNAi cells. Similar results were obtained by generating *scrib*^{-/-} mutant clones in the eye disc (Extended Data Fig. 7a–d).

In both mammals and flies, TNFs are double-edged swords that also have the capacity to promote tumorigenesis in specific cellular contexts⁵. Indeed, *scrib*^{-/-} eye disc cells expressing an activated form of *Ras* (*Ras*^{V12}) exhibit a dramatic tumour-like overgrowth and metastatic behaviour, a process that critically relies on Egr¹³. *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} metastatic cells show a strong accumulation of Grnd and Mmp1, and invade the ventral nerve cord^{11,14,15} (Fig. 3g and Extended Data Figs 7e, 8a). Primary tumour cells reach peripheral tissues such as the fat body and the gut, where they form micro-metastases expressing high levels of Grnd (Extended Data Fig. 7f, g). Reducing *grnd* levels in *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} clones is sufficient to restore normal levels of Mmp1 and abolish invasiveness in a way similar to that observed in an *egr*^{-/-} background¹³ (Fig. 3h, i and Extended Data Fig. 8a–c). Therefore, Grnd is required for the Egr-induced metastatic behaviour of *Ras*^{V12}/*scrib*^{-/-} tumorous cells. Similarly, reducing *grnd*, but not *wgn* levels, strongly suppresses Mmp1 expression in *Ras*^{V12}/*dlg*-RNAi cells and limits tumour invasion (Extended Data Fig. 8d–g), indicating that Wgn does not have a major role in the progression of these tumours.

Perturbation of cell polarity is an early hallmark of tumour progression in epithelial cells. In contrast to small patches of polarity-deficient cells, for example, *scrib*^{-/-} clones, organ compartments or animals fully composed of polarity-deficient cells become refractory to Egr-induced cell death and develop epithelial tumours. The formation of these tumours requires JNK/MAPK signalling, but not Egr^{13,16}, suggesting Egr-independent coupling between loss of polarity and JNK/MAPK-dependent tumour growth. In line with these observations, we noticed that, in contrast to Grnd, Egr is not required to drive neoplastic growth in *rn>avl*-RNAi conditions (Extended Data Fig. 9a, b). This suggests that, in addition to its role in promoting Egr-dependent functions, Grnd couples loss of polarity with JNK-dependent growth independently of Egr. Disc immunostainings revealed that Grnd co-localizes with the apical determinant Crb in the marginal zone, apical to the adherens junction protein E-cadherin (E-cad) and the atypical protein kinase C (aPKC; Fig. 4a and Extended Data Fig. 9c, d). In *avl*-RNAi discs, Grnd and Crb accumulate in a wider apical domain² (Extended Data Fig. 9e, g). Apical accumulation of Crb is proposed to be partly responsible for the neoplastic growth induced by *avl* knockdown, since overexpression of Crb or a membrane-bound cytoplasmic tail of Crb (Crb-intra) mimics the *avl*-RNAi phenotype² (Extended Data Fig. 9f). We therefore examined whether Grnd might couple the activity of the Crb complex with JNK-mediated neoplastic growth. Indeed, reducing *grnd* levels, but not *wgn*, in *rn>crb-intra* discs suppresses neoplastic growth as efficiently as inhibiting the activity of the JNK pathway (Fig. 4c–f and Extended Data Fig. 9h, i). Notably, Yki activation is not rescued in these conditions (Extended Data Fig. 9j–l), illustrating the ability of Crb-intra to promote growth independently of Grnd by inhibiting Hippo signalling through its FERM-binding motif (FBM)^{17,18}. Indeed, neoplastic growth and polarity defects induced by a form of Crb-intra lacking its FBM (CrbΔFBM-intra) are both rescued by Grnd silencing (Fig. 4i, j). As expected, the size of *rn>crbΔFBM-intra;grnd*-RNAi discs is reduced compared to the size of *rn>crb-intra;grnd*-RNAi discs (compare Fig. 4e, f with Fig. 4j).

Crb, Stardust (Sdt; PALS1 in humans), and Pals1-associated tight junction protein (Patj) make up the core Crb complex¹⁹, which recruits the adaptor protein Veli (MALS1–3 in humans)^{20–22}. In agreement with previous yeast two-hybrid data²³, we find that Grnd binds directly and specifically to the PDZ domain of Veli through a membrane-proximal stretch of 28 amino acids in its intracellular domain (Extended Data Fig. 10a–e). Grnd localization is unaffected in

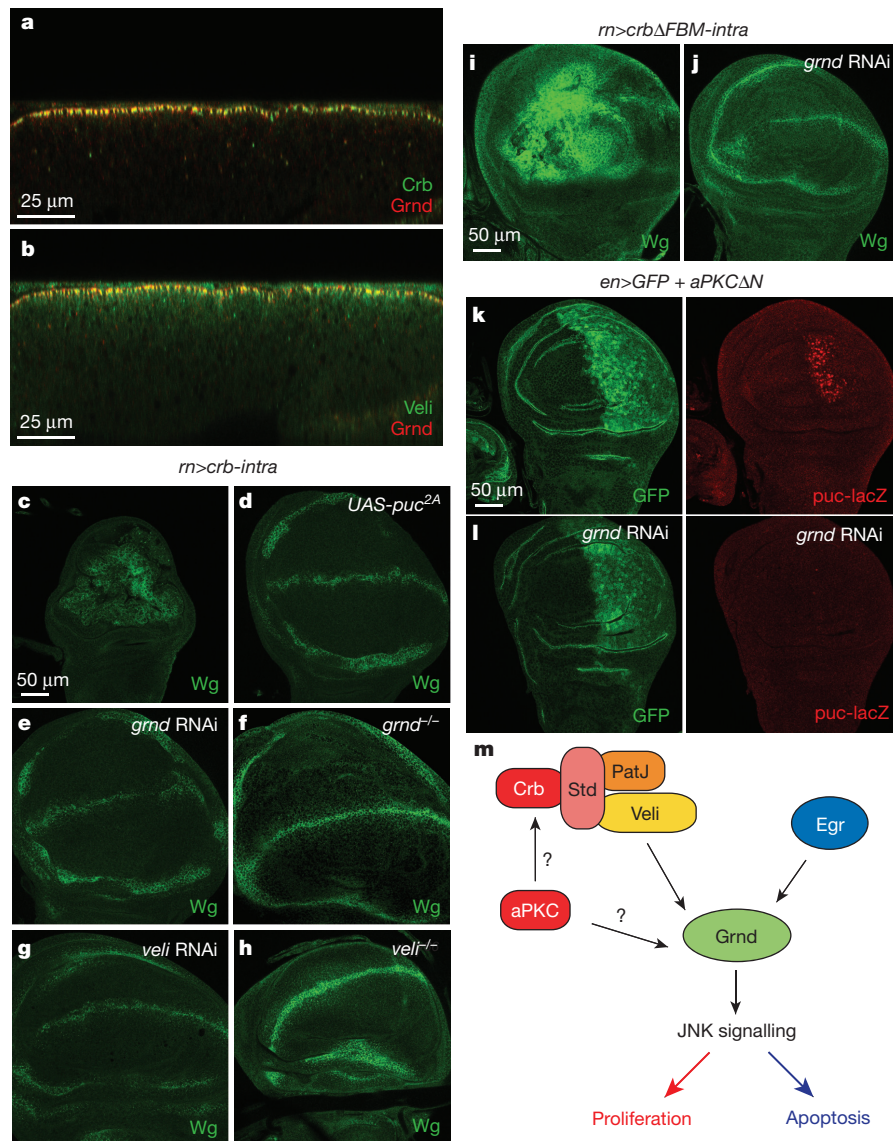


Figure 4 | *grnd* is required downstream of the apical Crb polarity complex for JNK-dependent neoplastic growth. **a, b**, Transverse sections of wild-type discs stained for Grnd (red), Crb (**a**, green) or Veli (**b**, green). **c–h**, Discs expressing *crb-intra* alone (**c**), or combined with the indicated genotypes (**d–h**), dissected 6 days AED, stained for Wg (green). **i, j**, Discs expressing

crb-intra lacking its FBM (*crbΔFBM-intra*) alone (**i**) or with *grnd* RNAi (**j**) stained for Wg (in green). **k, l**, Discs from *puc-LacZ* animals expressing activated aPKC (aPKCΔN)²⁶ in the posterior domain alone (**k**) or together with *grnd* RNAi (**l**). **m**, A model for Grnd function.

crb^{-/-} and *veli* RNAi mutant clones (Extended Data Fig. 10f–h). However, reducing *veli* expression rescues the patterning defects and disc morphology of *rn>crb-intra* mutant cells (Fig. 4g, h), suggesting that Grnd couples Crb activity with JNK signalling through its interaction with Veli. Interestingly, aPKC-dependent activation of JNK signalling¹⁶ also depends on Grnd (Fig. 4k, l). aPKC is capable of directly binding and phosphorylating Crb, which is important for Crb function²⁴. This suggests that aPKC, either directly or through Crb phosphorylation, activates Grnd-dependent JNK signalling in response to perturbation of apico-basal polarity.

Our data are consistent with a model whereby Grnd integrates signals from Egr, the unique fly TNF, and apical polarity determinants to induce JNK-dependent neoplastic growth or apoptosis in a context-dependent manner (Fig. 4m). Recent work reveals a correlation between mammalian Crb3 expression and tumorigenic potential in mouse kidney epithelial cells²⁵. The conserved nature of the Grnd receptor suggests that specific TNFRs might carry out similar functions in vertebrates, in which the link between apical cell polarity and tumour progression remains elusive.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 25 September 2013; accepted 9 February 2015.

Published online 15 April 2015.

- Colombani, J., Andersen, D. S. & Leopold, P. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* **336**, 582–585 (2012).
- Lu, H. & Bilder, D. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nature Cell Biol.* **7**, 1232–1239 (2005).
- Chakrabandhu, K. *et al.* The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell Death Differ.* **15**, 1824–1837 (2008).
- Ye, H. *et al.* Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**, 443–447 (2002).
- Vidal, M. The dark side of fly TNF: an ancient developmental proof reading mechanism turned into tumor promoter. *Cell Cycle* **9**, 3851–3856 (2010).
- Igaki, T. *et al.* Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* **21**, 3009–3018 (2002).

7. Moreno, E., Yan, M. & Basler, K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr. Biol.* **12**, 1263–1268 (2002).
8. Xue, L. *et al.* Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev. Cell* **13**, 446–454 (2007).
9. Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T. & Miura, M. Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 28372–28375 (2002).
10. Narasimamurthy, R. *et al.* Structure–function analysis of Eiger, the *Drosophila* TNF homolog. *Cell Res.* **19**, 392–394 (2009).
11. Brumby, A. M. & Richardson, H. E. *scribble* mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* **22**, 5769–5779 (2003).
12. Igaki, T., Pastor-Pareja, J. C., Aonuma, H., Miura, M. & Xu, T. Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* **16**, 458–465 (2009).
13. Cordero, J. B. *et al.* Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev. Cell* **18**, 999–1011 (2010).
14. Pagliarini, R. A. & Xu, T. A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* **302**, 1227–1231 (2003).
15. Uhlirova, M. & Bohmann, D. JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J.* **25**, 5294–5304 (2006).
16. Sun, G. & Irvine, K. D. Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev. Biol.* **350**, 139–151 (2011).
17. Ling, C. *et al.* The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 10532–10537 (2010).
18. Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y. & Moberg, K. H. Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Curr. Biol.* **20**, 582–590 (2010).
19. Bulgakova, N. A. & Knust, E. The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* **122**, 2587–2596 (2009).
20. Bachmann, A., Grawe, F., Johnson, K. & Knust, E. *Drosophila* Lin-7 is a component of the Crumbs complex in epithelia and photoreceptor cells and prevents light-induced retinal degeneration. *Eur. J. Cell Biol.* **87**, 123–136 (2008).
21. Bachmann, A. *et al.* Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J. Cell Sci.* **117**, 1899–1909 (2004).
22. Olsen, O. *et al.* Renal defects associated with improper polarization of the CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice. *J. Cell Biol.* **179**, 151–164 (2007).
23. Giot, L. *et al.* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727–1736 (2003).
24. Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. & Campuzano, S. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **166**, 549–557 (2004).
25. Karp, C. M. *et al.* Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res.* **68**, 4105–4115 (2008).
26. Betschinger, J., Mechtler, K. & Knoblich, J. A. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326–330 (2003).

Acknowledgements We thank G. Jarretou for technical assistance, the Vienna *Drosophila* RNAi Centers, the *Drosophila* Genetics Resource Center, the Bloomington Stock Center, N. Caridi and S. Pasqualato for technical assistance and P.L. laboratory members for comments on the manuscript. This work was supported by the CNRS, INSERM, Agence Nationale de la Recherche, Fondation pour la Recherche Médicale, Association pour la Recherche contre le Cancer (grant no. PJA20131200042 to J.C.), European Research Council (Advanced grant no. 268813 to P.L.), Marie Curie Life Long Training (grant no. 252373 to D.S.A.), the Labex Signallife program (grant ANR-11-LABX-0028-01 to P.L.), the Italian Association for Cancer Research (AIRC IG-12877) and the Italian Ministry of Health (GR-2008-1134103) to M.M.

Author Contributions D.S.A., J.C., K.C., A.-O.H., K.B., M.M. and P.L. designed the research; D.S.A., J.C., K.C., V.P., E.B., M.R. and J.T. performed experiments; D.S.A., J.C., K.C., E.B., A.-O.H., K.B., V.P., M.M. and P.L. analysed the data; D.S.A., J.C. and P.L. wrote the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C. (julien.colombani@unice.fr) or P.L. (leopold@unice.fr).

METHODS

Fly strains and food. Animals were reared at 25 °C on fly food containing, per litre: 17 g inactivated yeast powder, 83 g corn flour, 10 g agar, 60 g white sugar and 4.6 g Nipagin M (in ethanol). The *rn-Gal4*, *UAS-egr*, *tubGal80*¹⁸ animals were raised at 18 °C, shifted to 30 °C for 40 h during early third instar larval development (7 days AEL), and subjected to dissection immediately after (Extended Data Fig. 6).

Cell culture. *Drosophila* S2 and S2R⁺ cells were grown in complete Schneider's medium (CSM; Schneider's medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (BioWhittaker), 50 U ml⁻¹ penicillin and 50 µg ml⁻¹ streptomycin (Invitrogen)) at 25 °C. Transfections were done using Effectene reagent (Qiagen).

Plasmids. *grnd*, *grnd-extra* and *grnd-intra* coding sequences were PCR amplified from BDGP EST complementary DNA clones RE28509, and cloned into the pENTR/D-TOPO vector using the following gene-specific primers: sense primers CACCATGTCGGTCAGGAAGTTGAG (*grnd* and *grnd-extra*) and CACCA TGCTGATCCTCTGCTGCTGACTATCC (*grnd-intra*); and antisense primers GAAAGCGACGGGAATCGTCGC (*grnd* and *grnd-intra*) and CCATCGAAGG AACTGAAACGCG (*grnd-extra*). The mutations giving rise to the single E202A and double P200A/E202A amino acid changes in Grnd and Grnd^{125–241} were introduced using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), *grnd-pENTR* or *grnd*^{125–241}-pGEX-6PI templates, and the following primers: sense, CGGTGAGCACTCGCTATCCGGCGGCAACAGTACCACGCCAC; and antisense, GTGGGCGTGGTACTGTTTGGCGCGGATAGCGAGTGCTCAC CG for *grnd*^{E202A}; sense, CGGTGAGCACTCGCTATGCGGCGGCAACAGT ACCACGCCAC; and antisense, GTGGGCGTGGTACTGTTTGGCGCGGCA TAGCGAGTGCTCACCG for *grnd*^{P200A/E202A}. To generate *grnd-Flag*, *grnd*^{E202A}-*Flag*, *grnd-extra-Flag* and *grnd-intra-Flag*, *grnd*, *grnd*^{E202A}, *grnd-extra* and *grnd-intra* coding sequences were cloned into the Gateway Destination vector pActin-3×Flag (*Drosophila* Gateway Vector Collection) for expression in S2 and S2R⁺ cells. In addition, *grnd*, *grnd-intra* and *grnd-extra* coding sequences were cloned into pUASg.attB for generation of UAS-*grnd*, UAS-*grnd-intra* and UAS-*grnd-extra* transgenic lines. The *HA-traf2* plasmid was from K.B.²⁷. The *HA-egr* and *HA-egrΔTNF* plasmids were a gift from M. Miura. pActin-iHog-*HA* and pActin-iHog-*Flag* were gifts from L. Ruel.

Transgenic flies. To generate the UAS-*grnd* UAS-*grnd-intra* and UAS-*grnd-extra* lines, the pUASattB-*grnd*, pUASattB-*grnd-intra* and pUASattB-*grnd-extra* constructs were introduced into the germ line by injections in the presence of the PhiC31 integrase and inserted in the 86F8-landing site on the 3R chromosome (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BL24749, BestGene). The following RNAi lines were from the GD or KK collections of the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC): *grnd* RNAi (GD43454, sense primer CGCGAATTCCTCTTGCTG CTGATATCCTTCTCGT, and antisense primer GCGTCTAGAGTTGTGG GCGTGGTACTGTTTCC, and KK104538, sense primer TGGCGCCCTAG ATGAACGGTTATGACGGAGATCG, and antisense primer CGCATGTAGC CTGCCGTTTGTGGTGATTGCGAATG), *tak1* RNAi (KK101357, sense primer TGGCGCCCTAGATGGCTTGTCTTGAAGTCTGTC, and antisense primer CGACGCCCGCTGATAGCATGAGCAGGAGATTGTCA), *bendless* RNAi (KK109638, sense primer TGGCGCCCTAGATGCGCATCATCAAGGAGA CTCA, and antisense primer CGCATGTAGCCTGCCTTCTGAAAAACGCC GATAC), *tab2* RNAi (KK100326, sense primer TGGCGCCCTAGATGGCA CTTTCAGCGGAAGAAAC, and antisense primer TAGCCTCCCTAGCG CAGCTCTGCACTGGGATAGGA), *traf2* RNAi (GD16125, sense primer CGC GAATTCAGACCCACTCGCCCAAGA, and antisense primer GCGTCTAG AACCGAACAGCCAGCGAGGA), *hep* RNAi (KK109277, sense primer TGG CGCCCTAGATGGGCTTCTTGGACAGCTTGAG, and antisense primer CG CATGTAGCCTGCCAGGAAACAAACGCATCCTG), *bsk* RNAi (KK104569, sense primer TGGCGCCCTAGATGAGCATCCACTTCTCAGCAT, and antisense primer TAGGTCTAGCCCGCGGTACACCATCACCCTCGTT), *scrib* RNAi (GD 45556, sense primer CGCGAATTCGGAAGAGGACAACG CACAGCA, and antisense primer GCGTCTAGACTGGGAGCGGGCAAAGT GTAAG), *avl* (GD5413, sense primer CGCGAATTCGAACAGTAGCGCCAG CCAGCA, and antisense primer CGCTCTAGACCGTGCCTGCGAGACA AAG), *dilp8* (KK102604, sense primer TGGCGCCCTAGACTGATCGATG GACCTTCTGTGCG, and antisense primer CGCATGTAGCCTGCCGTATCG GAGTCTGTTGCCCT), and *rh3* RNAi (KK100853, sense primer TGGCGCCCC TAGATGATCTGGGATGACTTATGGCG, and antisense primer TAGCCTCC CTAGCGCTCGATCGCACTCTTGTG). The *veli*-RNAi lines were from U. Thomas. The *wengen*-RNAi line (*wengen-IR*) was provided by M. Miura. The *GMR-Gal4* (on chromosome II), *UAS-egr* (on chromosome III), *GMR-Gal4*, *UAS-ecto-egr60* (on chromosome II), *GMR-Gal4*, *UAS-egr* (on chromosome II), *UAS-CrbΔFBM-intra*, *DIAP-GFP*, *aPKCAN*, *FRT*, *Crb*^{11A22} (null) and *UAS-wgn* transgenic lines were previously published^{17,10,27–29}, the *UAS-puc*²⁴ line

was described previously³⁰, the *UAS-crb-intra* transgenic lines and *veli*⁶⁶ mutant flies were from E. Knust, the *egr*¹ and *egr*³ mutant lines and the *UAS-ras*^{V12}, *FRT82B*, *scrib*¹/TM6b and *UAS-ras*^{V12}, *egr*³; *FRT82B*, *scrib*¹/TM6b and *yw*, *eyFlp1*; *act>y>Gal4*, *UAS-GFP*; *FRT82B*, *tubGal80* and *yw*, *eyFlp1*; *act>y>Gal4*, *UAS-GFP*, *egr*¹; *FRT82B*, *tubGal80* lines were from M. Vidal, the *w*¹¹¹⁸; +; *rnGal4*, *UAS-eiger*, *tubGal80*⁸/TM6B line was provided by I. Hariharan, the *yw*, *hep75/FM7*, *GFP*; *Sal*^{PE}/cyo line was provided by F. Serras. The *rn-Gal4*, *nub-Gal4*, *puc-LacZ*, *grnd*^{Minos} (Mi{MIC}CG10176^{M105292}), and *grnd*^{Df(BSC149)} lines were provided by the Bloomington *Drosophila* Stock Center.

Flies' eye pictures are acquired on a Leica Fluorescence Stereomicroscope MZ16 FA with a Leica digital camera DFC 490.

Generation of *wgn*^{KO/KO} mutant flies. The *wgn* knockout allele was generated by ends-in gene targeting as described previously³¹. The pTV2 targeting construct carried frameshift mutations in exon 1 and 2, an I-SceI site between these two exons, a *white*⁺ marker gene, an I-CreI site, up- and downstream homology sequences and two flanking FRT sites. The frameshift mutations were introduced by cutting the unique intrinsic restriction sites AclI and NotI followed by T4 DNA polymerase-mediated fill-in. F3 Larvae carrying the targeting construct together with an *hsp70-flp* and a *hsp70-I-SceI* transgene were heat shocked (1 h at 38 °C on day 2 and 3 after egg laying) to generate a linearized targeting construct that aligns and recombines with the endogenous wild-type locus. After crossing the F3 flies to eye-FLP-expressing flies, the F4 was screened for non-mosaic *white*⁺ eyed flies carrying an insertion of a processed targeting construct. After processing with FLP and I-SceI, only one FRT site remained next to the *white*⁺ marker gene in these flies. Flies still carrying the original donor insertion lost the *white*⁺ marker gene, since it was still flanked by two FRT sites. Female F4 'w⁺ *wgn*^{KO}' flies, carrying two *wgn* copies on the X chromosome were crossed with males of the genotype 'v/Y; +/+; [v+, 70I-CreI] 1A/TM6'. The F5 offspring were heat shocked (1 h at 38 °C on day 2 after egg laying). F5 offspring males were selected against TM6 ('w+/–74/Y; +/+; [v+, 70I-CreI] 1A/+') and typically displayed *white*^{+/–} mosaics. When they were individually crossed to the X-chromosomal balancer stock 'bin/#852', more than 90% of the males were sterile. The F6 flies that hatched were either *white*⁺ or *white*[–]. The *white*[–] flies were tested for the presence of the mutations. The stocks 'y w (v); P[ry+, 70FLP]4 P[v+, 70I-SceI]2B Sco/S2 Cyo' and 'v; +/+; [v+, 70I-CreI] 1A/ TM6, Ubx, e' were provided by K. Golik and Y. Rong.

Genome-wide screen. As an unbiased approach to identify molecules that are required for neoplastic growth, we used the *elavGal80*; *rn>avl*-RNAi/ *TM6b*, *tub>Gal80* testerline, which is characterized by neoplastic growth in the discs and a delay of about 2 days in pupariation. We crossed this line to the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) collection of *phiC31* (KK) RNAi lines (10,100 lines) and screened for candidates that were able to rescue the delay at pupariation as described previously¹. One-hundred and twenty-one candidates significantly rescued the pupariation delay in *rn>avl*-RNAi larvae. Of these, only 8 lines rescued the neoplastic disc growth (Extended Data Fig. 1)

Immunostainings of larval tissues. Tissues dissected from larvae in 1× PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 8) at the indicated hour AED, were fixed in 4% formaldehyde (Sigma) in PBS for 20 min at room temperature washed in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBT), blocked for 2 h in PBT containing 10% FBS (PBS-TF), and incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The next day, cells and tissues were washed, blocked in PBS-TF, and incubated with secondary antibodies at 1/500 dilution (Rhodamine Red-X-conjugated donkey anti-rat, Cy3 conjugated donkey anti-rabbit, Cy3 conjugated donkey anti-chicken, Cy3 conjugated donkey anti-mouse and Cy3 conjugated mouse anti-guinea pig, Cy5 conjugated donkey anti-rat, and Cy5 conjugated donkey anti-guinea pig from Jackson ImmunoResearch, goat anti-mouse Alexa Fluor 488, donkey anti-rat Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 from Invitrogen) for 2 h at room temperature. After washing, tissues were mounted in Vectashield containing DAPI for staining of DNA (Vector Labs). Fluorescence images were acquired using a Leica SP5 DS (×20 and ×40 objectives) and processed using Adobe Photoshop CS5.

Lysis and immunoprecipitations. Cells were lysed in 100 µl buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP-50, 1 mM EGTA, 0.5 M NaF, phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma), complete protease inhibitor cocktail (Roche)). Immunoprecipitations were performed from about 1 × 10⁷ S2 cells. Cells were lysed in 200 µl buffer A, and cell extracts were cleared of membranous material by centrifugation at 10,000 r.p.m. for 15 min. The cleared extracts were incubated with protein G-Sepharose beads (Sigma) for 1 h to reduce unspecific binding of proteins to the beads in the subsequent purifications. Next, the precleared extracts were incubated with 80 µl of protein G-Sepharose beads and 1 µl of the relevant antibody for 3 h. Subsequently, beads were washed three times in buffer A, boiled in sample and reducing buffers (Invitrogen).

Protein preparation. *Drosophila* Veli full length (Veli¹⁻¹⁹⁵) and PDZ domain (Veli⁸⁵⁻¹⁹⁵) were expressed with an amino-terminal His₆-tag from pET43 (Novagen) in *Escherichia coli* strain BL21 Rosetta, and purified by affinity on Ni-NTA beads (Qiagen). The Veli L27 domain (Veli¹⁻⁸¹) was cloned in a modified pET43 plasmid as a His₆-MBP-tagged construct. The fusion protein was expressed in bacteria similarly to the other constructs. After a first step of affinity purification on amylose beads (NEB), the protein was incubated with TEV protease (Invitrogen Life Technologies) to cleave the MBP tag, and loaded on a Resource-Q anion-exchange column (GE-Healthcare). The TRAF domain of *Drosophila* Traf2 (Traf2³¹⁹⁻⁴⁷⁵) was expressed similarly, and purified by affinity followed by ion-exchange chromatography on a Resource-S column (GE-Healthcare). All Grnd constructs were expressed as GST-fusion proteins using a modified version of the pGEX-6PI vector (GE-Healthcare), and purified by affinity on glutathione sepharose (GSH) beads. The purifications were carried out at 4 °C. The PDZ domains of human Par3 (Par3-PDZ2 and Par3-PDZ3 encompassing residues 465–548 and 582–685, respectively) and *Drosophila* Bazooka (Baz-PDZ1 corresponding to residues 331–419) were expressed as GST-fusion proteins. After the first step of affinity purification on GSH-beads, the GST tag was removed from the constructs by cleavage with PreScission protease, and the PDZ domains were further purified by ion-exchange chromatography.

In vitro binding assay. To test the interaction properties of intracellular Grnd constructs, GST-Grnd fusion proteins (5 µM) adsorbed on GSH-beads were incubated for 40 min at 4 °C with 10 µM Veli^{FL}, Veli^{PDZ} or Veli^{PDZ} in a buffer containing 10 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (DTT). After two washing steps, the bound species were resolved on SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining. To test the specificity of binding, analogous pull-down assays were performed with the PDZ domains of Par3 and Bazooka under the same conditions. To monitor the ability of Traf2 to bind Grnd, 2 µM GST-Grnd¹²⁵⁻²⁴¹ wild type or mutated on P200 and/or E202 were absorbed on GSH beads and incubated with 10 µM Traf2³¹⁹⁻⁴⁷⁵ in a buffer consisting of 10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.05% Tween. After washing, complexes immobilized on beads were analysed by SDS-PAGE.

Subcellular fractionation. Subcellular fractionation of 300 wing imaginal discs dissected from wild-type animals was performed using the Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

Western blotting. Proteins were resolved by SDS-PAGE using 4–12% gradient gels (NuPAGE Novex gel, Invitrogen) and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride membranes (Milipore). The membranes were incubated for 1 h in blocking buffer (PBS, 5% milk) and incubated overnight at 4 °C in the same buffer containing primary antibodies at 1:1,000 dilutions: rabbit anti-Smoothed⁹², mouse anti-Lamin (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)), mouse anti-Dlg (4F3) from DSHB, mouse anti-Myc 9E10 (sc-40, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Myc A-14 (sc-789, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Flag F3165 (Sigma), rat anti-HA 3F10 (Roche)), guinea pig anti-Grnd at 1:1,000, anti-tubulin (Sigma) at 1:2,000. The anti-Wgn antibody was used as described previously²⁷. Membranes were washed three times in PBS-T, blocked for 1 h, and probed with secondary antibodies in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, chemiluminescence was observed using the ECL-Plus western blotting detection system (Amersham Biosciences). Images were generated using the Fujifilm Multi Gauge software.

Antibodies. To generate purified antisera specific for the Grnd protein, two peptides, CAYHPATANGKDLNA and NAINHPGSDLERAQSQ, corresponding to amino acids 140–154 and 161–176, respectively, were used as immunogens in guinea pigs (Eurogentec). The following primary antibodies were used for immunofluorescence in this study: mouse anti-Wg (4D4) from DSHB 1/50, mouse anti-Dlg (4F3) from DSHB 1/500, rat anti-E-Cad (DCAD2) from DSHB 1/500, mouse anti-MMP1 (3A6B4/5H7B11/3B8D12; the three different antibodies were mixed in amounts (1:1:1) from DSHB (1:25)), chicken anti-β-galactosidase from GeneTek 1/1,000, rabbit anti-cleaved caspase-3 (Asp 175) from Cell Signaling Technology 1/500, rabbit anti-aPKC from Santa Cruz Biotechnology 1/1,000, guinea pig anti-Grnd 1/100, rabbit anti-Veli 1/1,000 (gift from G. Pietrini), and rat anti-Crb 1/1,000 (gift from E. Knust).

Sequence alignment and homology modelling. Multiple sequence alignment, per cent identity matrix, and phylogenetic data were generated using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalo>). Data of five human death receptors of the TNFR superfamily with the highest identity with Grnd are shown. Slight manual adjustment of the alignments was performed. Amino acids are highlighted where Grnd shares identity or similarity with death receptor(s) (Fig. 1) or Grnd-like proteins from other insect species (Extended Data Fig. 2d), or where Fas shares identity or similarity with Grnd and/or Wgn (Extended Data Fig. 2b). Amino acid similarity is presented based on scores in

Gonnet PAM 250 matrix (>0.5, highly similar; ≤0.5, weakly similar). Amino acid positions are indicated in parentheses or at the end of the shown sequences. The phylogram was drawn using interactive Tree of Life³³ (<http://itol.embl.de/>). Number on each branch indicates branch length (Extended Data Fig. 2a). UniProt protein identifiers are: Fas (P25445), DR4 (O00220), DR5 (O14763), DcR1 (O14798), DcR2 (Q9UBN6), and Wengen (Q9VWS4). Information of protein domains in TNFR superfamily members used to construct protein domain diagram (Extended Data Fig. 2d) was obtained from UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Genotypes. Fig. 1a: w⁻; +; *rn-Gal4/puc-lacZ*. Fig. 1b: w⁻; *elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/ *puc-lacZ*. Fig. 1c: w⁻; *elav-Gal80/ UAS grnd* RNAi KK; *rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/ *puc-lacZ*. Fig. 1d: w⁻; *elav-Gal80/ UAS tak1* RNAi KK; *rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/ *puc-lacZ*. Fig. 1e: w⁻; *nub-Gal4/+; UAS grnd / puc-lacZ*. Fig. 1f: w⁻; *nub-Gal4/+; UAS grnd-intra / puc-lacZ*.

Fig. 2a: w⁻; *GMR-Gal4/+; +*. Fig. 2b: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/+; MKRS/+*. Fig. 2c: *wgn^{KO}; GMR-Gal4, UAS egr/+; MKRS/+*. Fig. 2d: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS grnd* RNAi KK; *MKRS/+*. Fig. 2e: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/+; MKRS/ UAS grnd-extra*. Fig. 2f: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/+; UAS egr/+*. Fig. 2g: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS tak1* RNAi KK; *UAS egr/+*. Fig. 2h–i: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS grnd* RNAi KK; *UAS egr/+*.

Fig. 3a: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/+; +*. Fig. 3b: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS rh3* RNAi KK; *+*. Fig. 3c: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS grnd* RNAi KK; *+*. Fig. 3d: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/+; UAS scrib* RNAi GD/+ . Fig. 3e: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS rh3* RNAi KK; *UAS scrib* RNAi GD/+ . Fig. 3f: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS grnd* RNAi KK; *UAS scrib* RNAi GD/+ . Fig. 3g: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}+/+; FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Fig. 3h: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}+/+; UAS grnd* RNAi KK; *+; FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Fig. 3i: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; egr¹ / UAS ras^{V12}, egr³; FRT82B, tubGal80/ FRT82B, scrib¹*.

Fig. 4a, b: w⁻. Fig. 4c: w⁻; *UAS crb-intra/+; rn-Gal4 /+*. Fig. 4d: w⁻; *UAS crb-intra/ UAS puc^{2A}; rn-Gal4 /+*. Fig. 4e: w⁻; *UAS crb-intra/ UAS grnd* RNAi KK; *rn-Gal4 /+*. Fig. 4f: w⁻; *grnd^{Minos}/ grnd^{Minos}; rn-Gal4 / UAS crb-intra*. Fig. 4g: w⁻; *UAS crb-intra/ UAS vli* RNAi; *rn-Gal4/ UAS vli* RNAi. Fig. 4h: w⁻; *UAS crb-intra/ nub-Gal4; vli⁶⁶/ vli⁶⁶*. Fig. 4i: w⁻; *+; UAS crbΔFBM-intra/ rn-Gal4*. Fig. 4j: w⁻; *UAS grnd* RNAi KK; *+; UAS crbΔFBM-intra/ rn-Gal4*. Fig. 4k: w⁻; *en-Gal4, UAS GFP/+; UAS aPKCΔN/ puc-lacZ*. Fig. 4l: w⁻; *UAS grnd* RNAi KK/ *en-Gal4, UAS GFP; UAS aPKCΔN/ puc-lacZ*.

Extended Data Fig. 1c: w⁻; *elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD /+. Extended Data Fig. 1d: w⁻; *elav-Gal80/ UAS grnd* RNAi GD; *rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD /+. Extended Data Fig. 1e: w⁻; *elav-Gal80/ Rh3* RNAi KK; *rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD /+. Extended Data Fig. 1f, g: w⁻; *ptc-Gal4, UAS-GFP/ UAS grnd* RNAi KK; *+.*

Extended Data Fig. 4a: w⁻; *+; rn-Gal4 /+*. Extended Data Fig. 4b: w⁻; *+; rn-Gal4 / UAS grnd*. Extended Data Fig. 4c, d: w⁻; *+; rn-Gal4 / UAS grnd-intra*. Extended Data Fig. 4e: *yw⁻; sal-Gal4 /+; UAS grnd-intra /+*. Extended Data Fig. 4f: *yw⁻; hep⁷⁵; sal-Gal4 /+; UAS grnd-intra /+*.

Extended Data Fig. 5a: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/+; MKRS/+*. Extended Data Fig. 5b: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS-traf2* RNAi GD; *MKRS/+*. Extended Data Fig. 5c: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS puc^{2A}; MKRS/+*. Extended Data Fig. 5d: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS tak1* RNAi KK; *MKRS/+*. Extended Data Fig. 5e: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS-wengen* RNAi IR; *MKRS/+*. Extended Data Fig. 5f: w⁻; *GMR-Gal4, UAS egr/ UAS-grnd* RNAi GD; *MKRS/+*. Extended Data Fig. 5g: *wgn^{KO}; GMR-Gal4, UAS egr/ UAS-grnd* RNAi GD; *MKRS/+*. Extended Data Fig. 5h: *wgn^{KO}; +; +*. Extended Data Fig. 5i: w⁻; *GMR-Gal4/ UAS-grnd* RNAi KK; *+.* Extended Data Fig. 5j: w⁻; *GMR-Gal4/+; UAS-grnd-extra/+*. Extended Data Fig. 5k: w⁻; *GMR-Gal4, UAS-ecto-egr60/+; MKRS/+*. Extended Data Fig. 5l: w⁻; *GMR-Gal4, UAS-ecto-egr60/ UAS puc^{2A}; MKRS/+*.

Extended Data Fig. 6c: w⁻. Extended Data Fig. 6d: w⁻; *grnd^{Minos}/ grnd^{Minos}; +*. Extended Data Fig. 6e: w⁻; *+; rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*. Extended Data Fig. 6f: w⁻; *UAS-grnd* RNAi KK/+; *rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*. Extended Data Fig. 6g: w⁻; *UAS-traf2* RNAi GD /+; *rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*. Extended Data Fig. 6h: w⁻; *UAS-tak1* RNAi KK/+; *rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*. Extended Data Fig. 6i: w⁻; *grnd^{Minos}/ grnd^{Minos}; rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*. Extended Data Fig. 6j: w⁻; *grnd^{Minos}/ grnd^{DF}; rn-Gal4, UAS egr, tubGal80^{ts} /+*.

Extended Data Fig. 7a: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; +; FRT82B/ FRT82B, tubGal80*. Extended Data Fig. 7b: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; +; FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Extended Data Fig. 7c: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS grnd* RNAi KK /+; *FRT82B, scrib¹/ FRT82B,*

tubGal80. Extended Data Fig. 7d: *ey-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS grnd* RNAi KK; +. Extended Data Fig. 7e–g: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}/+; FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*.

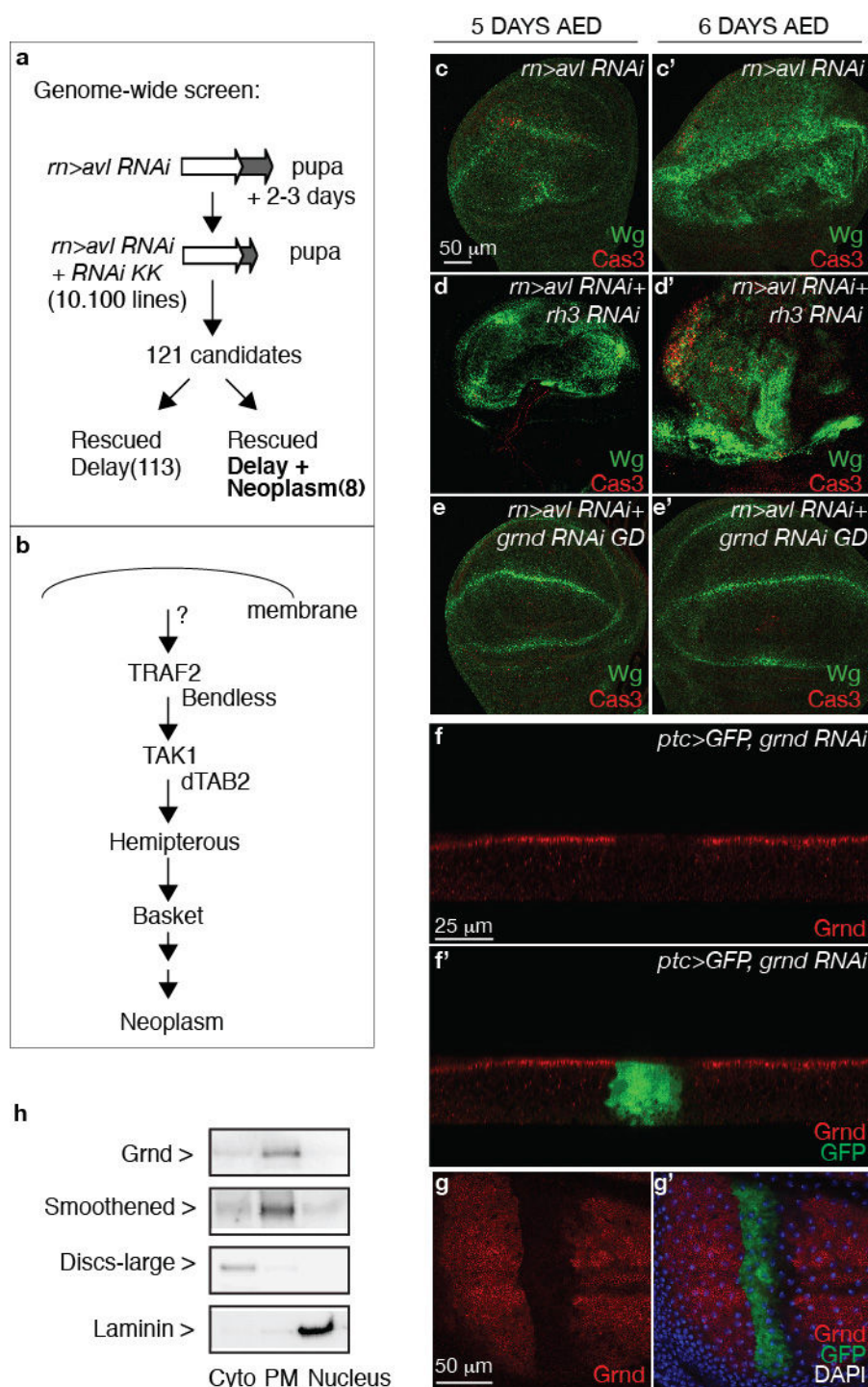
Extended Data Fig. 8a: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}/+; FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Extended Data Fig. 8b: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}, UAS grnd* RNAi KK /+; *FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Extended Data Fig. 8c: *yw, ey-FLP; Act>y⁺>Gal4, UAS GFP; UAS ras^{V12}, UAS dilp8* RNAi KK /+; *FRT82B, scrib¹/ FRT82B, tubGal80*. Extended Data Fig. 8d: *w; UAS ras^{V12}, UAS-dlg* RNAi GD /+; *ey-FLP; Act>>Gal4, UAS GFP* /+. Extended Data Fig. 8e: *w; UAS ras^{V12}, UAS-dlg* RNAi GD / *UAS-grnd* RNAi GD; *ey-FLP; Act>>Gal4, UAS GFP* /+. Extended Data Fig. 8f: *w; UAS ras^{V12}, UAS-dlg* RNAi GD / *UAS-grnd* RNAi KK; *ey-FLP; Act>>Gal4, UAS GFP* /+. Extended Data Fig. 8g: *wgn^{KO}; UAS ras^{V12}, UAS-dlg* RNAi GD /+; *ey-FLP; Act>>Gal4, UAS GFP* /+.

Extended Data Fig. 9a: *w⁻; +; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/+. Extended Data Fig. 9b: *w⁻; egr¹ / egr³; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/+. Extended Data Fig. 9c, d: *w⁻; +; +*. Extended Data Fig. 9e: *w⁻; elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/+. Extended Data Fig. 9f: *w⁻; UAS crb-intra/+; rn-Gal4* /+. Extended Data Fig. 9g: *w⁻; elav-Gal80/+; rn-Gal4, UAS avl* RNAi GD/+. Extended Data Fig. 9h: *w⁻; UAS crb-intra/+; rn-Gal4* /+. Extended Data Fig. 9i: *wgn^{KO}; UAS crb-intra/+; rn-Gal4* /+. Extended Data Fig. 9j: *w⁻; +; rn-Gal4/ diap-GFP*. Extended Data Fig. 9k:

w⁻; UAS crb-intra/+; rn-Gal4 / diap-GFP. Extended Data Fig. 9l: *w⁻; UAS crb-intra/ UAS-grnd* RNAi KK; *rn-Gal4 / diap-GFP*.

Extended Data Fig. 10f, g: *yw, hsFLP; +; FRT82B, Ubi-GFP/ FRT82B, crb^{1A22}*. Extended Data Fig. 10h: *yw, hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS GFP/ UAS veli* RNAi; *UAS veli* RNAi /+.

27. 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* **171**, 1683–1694 (2005).
28. Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. & Choi, K. W. *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178–183 (2002).
29. Zhang, L. et al. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* **14**, 377–387 (2008).
30. Martín-Blanco, E. et al. *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 557–570 (1998).
31. Rong, Y. S. et al. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **16**, 1568–1581 (2002).
32. Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L. & Therond, P. P. Stability and association of Smoothened, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nature Cell Biol.* **5**, 907–913 (2003).
33. Ciccarelli, F. D. et al. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**, 1283–1287 (2006).

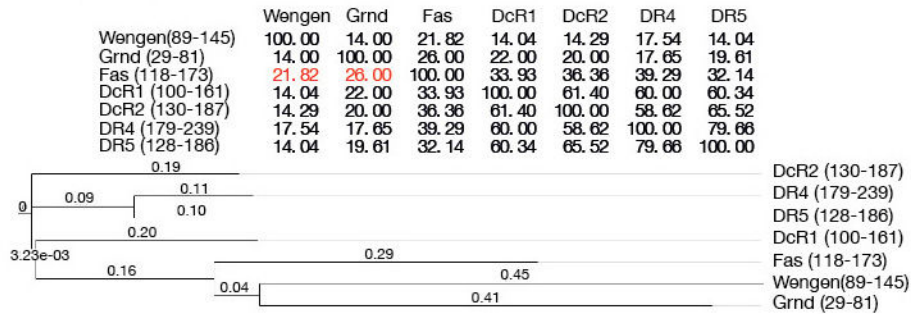
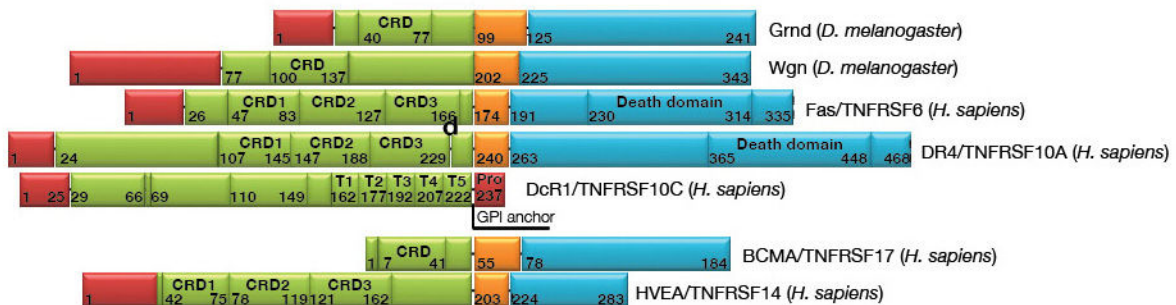


Extended Data Figure 1 | Identification of Grnd in a genetic screen for molecules implicated in neoplastic growth. **a**, Schematic of the genome-wide screen. Ten-thousand one-hundred RNAi lines were screened for their abilities to rescue the delay of the *rn>avl*-RNAi condition. Of the 121 candidates able to rescue the delay of the *rn>avl* condition, only 8 also rescued the neoplastic growth. **b**, Schematic of the five components of the JNK pathway shown to be required for the neoplastic overgrowth in the *avl* loss of function condition. Although no RNAi line targeting Traf2 was included in the original screen, Traf2 was subsequently shown to be required for neoplastic overgrowth in the

avl-RNAi condition using an alternative RNAi line. **c-e**, Wing discs of the indicated genotypes dissected 5 days (left) or 6 days (right) AED and stained for Wg (green) and Caspase3 (red). **f, g**, Transverse (**f**) or *xy* (**g**) sections of dissected wing discs expressing *grnd* RNAi in the patch domain (GFP, green) stained for Grnd (red) and DAPI (**g**, right, blue) to visualize the nuclei. **h**, Subcellular fractionation of cleared extract from dissected wing discs shows that Grnd, like the transmembrane receptor Smoothed, localizes to the membrane fraction (PM), whereas Disc-large remains in the cytoplasmic fraction (Cyto). Laminin serves as a control for nuclear fractions.

a

Percentage identity matrix

**b****c****d**

<i>Drosophila simulans</i>	-----NGE-----	-----T-YKT-----	FEPLKAEMLDIQNTQQ	51
<i>Drosophila sechellia</i>	-----NGESKDHGTT-----	-----S-YKT-----	FEPLKAEMLDIQNTQQ	96
<i>Drosophila melanogaster</i> (Grnd)	-----NGESRDHGTT-----	-----SAYKT-----	FEPLKAEMLDIQNTQQ	98
<i>Drosophila erecta</i>	-----NGESKDHGTT-----	-----SAYKT-----	FEPLKAEMLDIQNTQQ	98
<i>Drosophila yakuba</i>	-----NGESKDHGTT-----	-----S-YKT-----	FEPLKAEMLDIQNTQQ	96
<i>Drosophila ananassae</i>	-----NDGSQDHGKV-----	-----SAFNR-----	FEPLKAEIHNIQSNTQQ	97
<i>Drosophila persimilis</i>	-----SQDGILHKDHGKI-----	-----S-YNR-----	FEPLKAEIHNIQSNTQQ	97
<i>Drosophila willistoni</i>	-----TSDSNGATGKLNKGT-----	-----S-PATNK-----	YETLKEEIHDIHSNQ	102
<i>Drosophila virilis</i>	-----SNNGGDSGNSGRDYGKL-----	-----SAYNS-----	FEPLKAEIHNIQSNTQQ	105
<i>Drosophila mojavensis</i>	NGP-----AADSGQDHGKV-----	-----SAYKS-----	FDPLLDIQNRVVPK	102
<i>Drosophila grimshawi</i>	NPQSGANNA-GRDTHGKL-----	-----SAYNS-----	FEPLKAEIHDIQS-KQ	102
<i>Musca domestica</i>	ALAMTADSAATGTHGQV-----	-----LLPLQNEIHQIQ-TQQ		103
<i>Ceratitidis capitata</i>	S-SSKSALAATAKDFGKV-----	-----S-YETLKEEIHDIHSNQ		107
<i>Aedes aegypti</i>	-----VALEQCHDDKPP-----	-----L-QRIATLENNLY		82
<i>Anopheles gambiae</i>	-----ATLGT-----	-----TALESVVG		80
<i>Anopheles darlingi</i>	-----AAEGT-----	-----RSLRQQVVTMQSDLW		79
<i>Bombyx mori</i>	-----SAQITLDGIRL-----	-----LQYDGL		88
<i>Danaus plexippus</i>	-----SSQITLDGIRL-----	-----LQYDGL		71
<i>Tribolium castaneum</i>	-----QSEITLGETS-----	-----LNEYEEL		90
<i>Harpegnathos saltator</i>	-----ADDFLPPGAKT-----	-----AKQYDGL		91
<i>Dendroctonus ponderosae</i>	-----QGGITLALPKT-----	-----TGSTDDDL		92
<i>Solenopsis invicta</i>	-----LAELDFRGTKE-----	-----LQYDGL		101
<i>Apis florea</i>	-----TAALNHDGAKT-----	-----LNEYEEL		89
<i>Apis dorsata</i>	-----TAALNHDGAKT-----	-----LNEYEEL		89
<i>Apis mellifera</i>	-----TAALNHDGAKT-----	-----LNEYEEL		89
<i>Bombus terrestris</i>	-----IAGLNPGGAD-----	-----LQYDGL		88

Extended Data Figure 2 | Sequence homology of the extracellular domain of Grnd to CRDs of human TNFRs. **a**, Per cent identity matrix and phylogenetic data from multiple local sequence alignment of the entire extracellular domains of Grnd and Wgn with extracellular domains (corresponding to a part of CRD2 and all of CRD3) of various human TNFR superfamily members. The extracellular domain of Grnd shares the highest identity with the GBM-harboured CRD of Fas (26%). A similar result is observed for Wgn, although it exhibits lower identity (22%) and a higher degree of divergence to Fas. **b**, Sequence alignment of Fas, Grnd and Wgn demonstrates that Grnd shares a higher degree of similarity with the GBM-harboured CRD of Fas than Wgn. This is particularly apparent in the immediate region encompassing the functionally critical F134 (marked with an asterisk) of the GBM of Fas. Blue indicates residue identity, yellow strong similarity, and grey weak similarity of Fas with Grnd and/or Wgn. **c**, Schematic representation of Grnd, Wgn, and

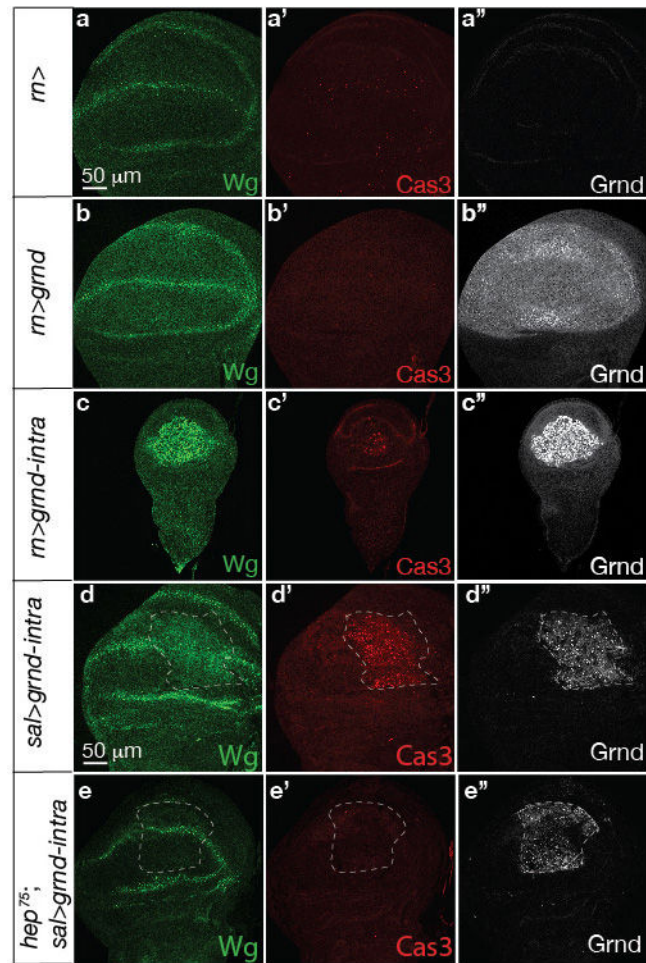
various members of the human TNFR superfamily showing a high level of diversity in the number and arrangement of CRDs. The colour codes used are: red for signal peptide, green for extracellular domains, orange for transmembrane domains, and blue for intracellular domain. Numbers in each box indicate corresponding amino acid positions. Pro, prodomain; T1–5, TAPE1–5 (threonine-, alanine-, proline- and glutamine-rich repeats). **d**, Multiple sequence alignment showing the conservation of the extracellular domain of Grnd in other insect species. Whereas global similarity of the extracellular domain of Grnd degenerates outside the melanogaster group, the cysteine residues of the CRD (highlighted in red) and the aromatic residue (F/Y, marked with an asterisk) corresponding to F134 of Fas CRD3 remain highly conserved throughout the Hymenoptera order. Blue indicates residue identity; yellow, strong similarity; and grey, weak similarity to Grnd.

<i>Drosophila simulans</i>	GNRCFQKL-LRRL	QSKAYPHPATANGKDLN-AT	TIQN	LNAINHPGSDLE	RAQSQIYSVA	130
<i>Drosophila sechellia</i>	GNRCFQKL-LRRL	QSKAYPHPATANGKDLN-AT	TIQN	LNAINHPGSDLE	RAQSQIYSVA	175
<i>Drosophila melanogaster</i> (Grnd)	GNRCFQKL-MRRL	QSKAYPHPATANGKDLN-AT	TIQN	LNAINHPGSDLE	RAQSQIYSVA	177
<i>Drosophila erecta</i>	SNRCFQKL-LRRL	QSKAYPHPATANGKDLN-AT	TIQN	LNAINHPGSDLE	RAQSQIYSVA	177
<i>Drosophila yakuba</i>	SNRCFQKL-LRRL	QSKAYPHPATANGKDLN-AT	TIQN	LNAINHPGSDLE	RAQSQIYSVA	175
<i>Drosophila ananassae</i>	HKRCIQRM-LQRM	QSKAYP-PGTANGKDLN-AT	TIQN	LNAINRHGSDLE	RAPSQIYSVA	174
<i>Drosophila persimilis</i>	RKRCVQQM-LQRY	QSKAYPHPGTANGKDLN-AT	TIQN	LSAI-RHGSDIE	RAPSQIYSVA	174
<i>Drosophila willistoni</i>	RKRCVQQM-LQKL	QSKSYPHQTNVNGKDLN-AT	TIQN	LNAINRHGSDIE	RAPSQIYSVA	182
<i>Drosophila virilis</i>	HSSCVQRL-KSRL	LPK-PQSNANGKDLN-AT	TMQN	PNAFYR-DIE	RAPSQINSVA	178
<i>Drosophila mojavensis</i>	VKRCIORC-MARL	QSKTOP-SNGRELN-GM	TIQN	PNAFNR-DIE	RAPSQIYSVA	178
<i>Drosophila grimshawi</i>	HKRCMRQL-LSRL	VSK-PHOSNANGKDLN-AT	TIQN	LNAINR-DIE	RAPSQIYSVA	163
<i>Musca domestica</i>	HKRYVQHA-LKKL	KLKDDLPPTAHNGGGGGT	TIQN	MCVIN-DIE	RSPSQIYSMT	158
<i>Ceratitis capitata</i>	RKRFTAM-LKKL	HKQ-HEAAGTGKDLVVGGA	TIPN	VMAING-SNSTALPPLPQVATTAPPSTYM		160
<i>Aedes aegypti</i>	KSNHFSWSFLKRL-LAREKSNPPT	MEYTHENPHT	KSPK	L-STRSGSNSTALPPLPQVATTAPPSTYM		145
<i>Anopheles gambiae</i>	AIREF-CRLPQL	NKKEQGP-VGYTHENPNT	KSPK	A-VPRKGANAAK	PPAS-TVSTIYP-E	128
<i>Anopheles darlingi</i>	SVDFE-SRCPQOGKPSSSAGAP	VGYTHENPHT	KSPK	L-AVKINGAAGIPKQQQVAPS-VALSIYP-E		134
<i>Bombyx mori</i>	LKOKFQPAKINVKQ-Y	PNDLTHHN		PHAEAPKPKPELKLE	IRNPDPRLRNQPLNVK	157
<i>Danaus plexippus</i>	IMKKLQPSKNRVKH-Y	PTDLTHHN		PHAEAPKPKPELKLE	IRNPDPRLRNQPLNVK	1346
<i>Tribolium castaneum</i>	KKNITLATIKNLFSSKADSA	QNKSTPVS		NOVKNEKPDRLLE	ISPES	163
<i>Harpegnathos saltator</i>	IQNTLRALFRKNWAKKAANKN		KVQDDVEANATKONGKLKLT	MPTISATVDNRS	STG	171
<i>Dendroctonus ponderosae</i>	KKNITLAVIKGMFGKNDSSA	TTNST		SNQDNKRDRLLE	IPSPT	151
<i>Solenopsis invicta</i>	IQKSLQSVFRNKKV-KANKN		KVQDDVEAAVNKONGKLKLT	IPNISATVEQESKIENNNS		174
<i>Apis florea</i>	MRAAVGRITFASKIKRMSNN	NDNNVGRIN				160
<i>Apis dorsata</i>	MRAAIRGSFASKIKRMSNN	NDNNVSKNNNNNDNRNATLQDAELGTSKONGKLKLT		MPTISASVAPSRYSENE		188
<i>Apis mellifera</i>	MRAAIRRSFASKIKRMSNN	SDNSVGNKNNNNNDNRNATLQDAELGTSKONGKLKLT		MPTISASVAPSRYSENE		186
<i>Bombus terrestris</i>	MQTTLRAIAGKRAKGTNGS	GGDNNNDNNDRGKSTLRDAESGTSRHNGKLKLT		MPTISASVAPSRILENE		184
<i>Drosophila simulans</i>		GAAEGSVVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVMTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATI	PVAF	194
<i>Drosophila sechellia</i>		GAAEGSVVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVMTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATI	PVAF	239
<i>Drosophila melanogaster</i> (Grnd)		GAAEGSVVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVMTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATI	PVAF	241
<i>Drosophila erecta</i>		GAAEGSVVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVMTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATV	AVAF	241
<i>Drosophila yakuba</i>		GAAEGSVVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVMTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATV	AVAF	239
<i>Drosophila ananassae</i>		GAAEGSVLIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVTEV		EYGYDNQAMVTPVSEKPT	SVA-AAAF	238
<i>Drosophila persimilis</i>		GAAEGSVLILITTPVSTRYPAENSTTPTTVTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAAT	IAAF	238
<i>Drosophila willistoni</i>		GPADGSMVIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSV-TATTGPAP		246
<i>Drosophila virilis</i>		GAGEGSLTATTPVSTRYPAENSTTPTTVTEI		GYVYDNQAMVTPVTEKPGP-TA-MAAF		242
<i>Drosophila mojavensis</i>		GAAEGSVLIMTTPVSTRYPAENSTTPTTVTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATV	IAAF	242
<i>Drosophila grimshawi</i>		GAAEGSVLILATTPVSTRYPAENSTTPTTVTEI		GYGYDNQAMVTPVSEKPSAATV	IAAF	240
<i>Musca domestica</i>		G-VEGSLTMITPISRRHAEQTPSPQAVT		NEYSYDNQALAVTPVSEKPGGG	SVVE	240
<i>Ceratitis capitata</i>		GSVDGVSQVITTPINGRYPAENSTTPTTV		SGEYSYDNQALAVTPVSEKNGS	VHGF	240
<i>Aedes aegypti</i>		GSVDGVSQVITTPINGRYPAEDWRE		NHAYDNGGLVVTPT	TENTYEVKARMMNR	227
<i>Anopheles gambiae</i>		TEADNSVQGTITTSIHRYPADSTE		SYSDNNAACNVIP	TSQNP	MPKY 209
<i>Anopheles darlingi</i>		TEAETSVOGTITTSIHRYPADSTE		SYSDNNAACNVIP	TSVAP	MPKY 216
<i>Bombyx mori</i>		DLETRTSQSDKSQGATTPKTIISTALSRRHAEADTTL		DFSYDNMGMNVTPPGQPAAS	HRF	239
<i>Danaus plexippus</i>		DLDART-QTDKSQGATTPKTIISTALSRRHAEADTTL		DFSYDNMGMNVTPPEQAT-S	HRF	1421
<i>Tribolium castaneum</i>		THSGHSPVTITTSISRRHAEADTTL		DYAYDNPMAMSSPNKNDPN	NSF	227
<i>Harpegnathos saltator</i>		NNNDTPETITTSLSRRHAEADTTL		DYAYDNPMAMTSPPEAQRLTKRE	SSF	234
<i>Dendroctonus ponderosae</i>		VNSDHSPTVITTSISDRR-PAEDSTL		DYAYDNPMAMSSNNISY		215
<i>Solenopsis invicta</i>		NSNSNSNGINTIPNITSTLSRRHAEADTTL		DYAYDNPMAMTSPDPA		244
<i>Apis florea</i>						160
<i>Apis dorsata</i>	TRHG-NGSSAGSGSGSGTAVSNVTPNTTSTLSRRHAEADTTL			DYAYDNPMAMTSPESVQLTKRE	SSF	272
<i>Apis mellifera</i>	TRHG-NGSSAGSGSGSGTAVSNVTPNTTSTLSRRHAEADTTL			DYAYDNPMAMTSPESVQLTKRE	SSF	270
<i>Bombus terrestris</i>	SGHGGNGTGSASGSGSANGSGTGNATPNTTSTLSRRHAEADTTL			DYAYDNPMAMTSPETVQRLTKRE	SSF	268

TRAF6-like binding motif

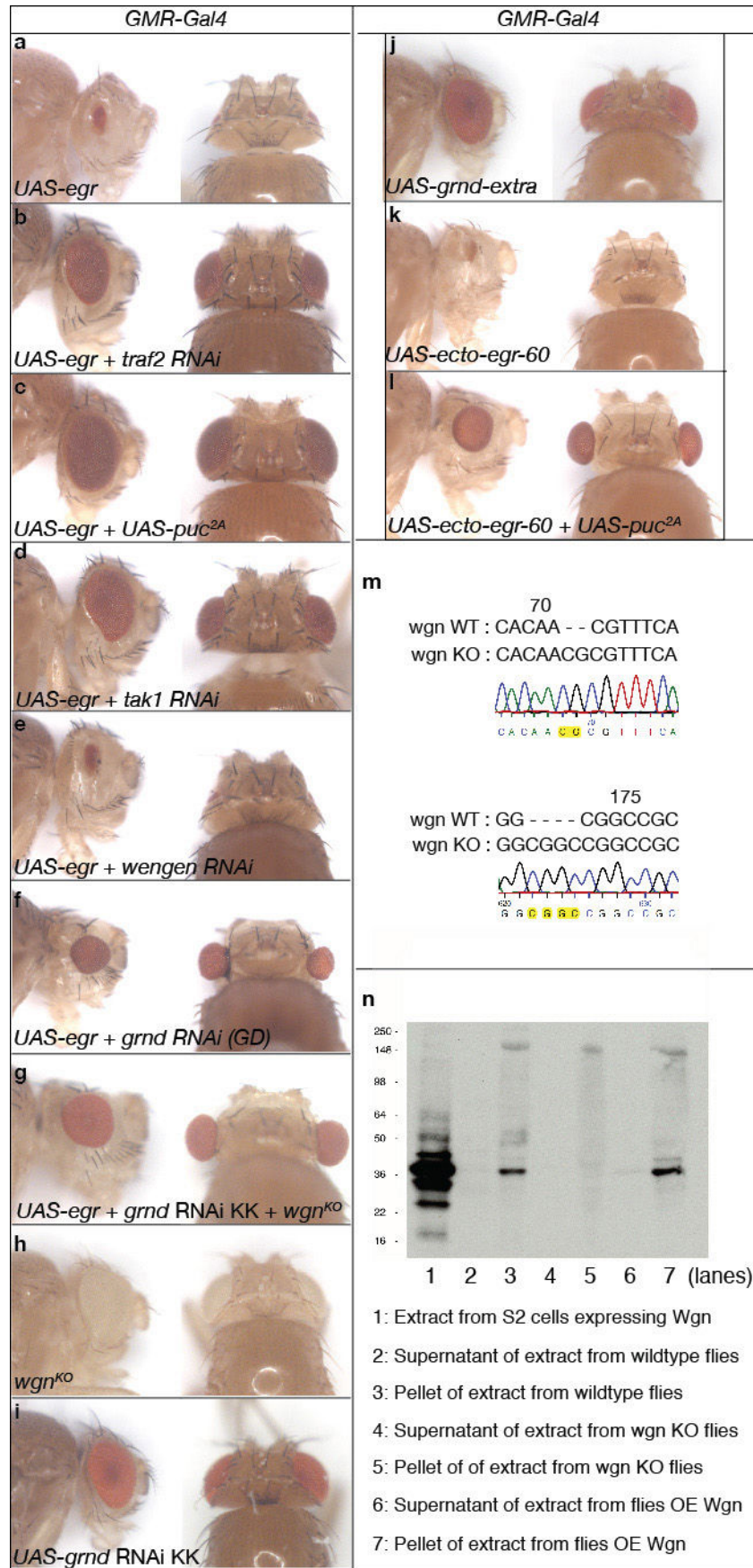
Extended Data Figure 3 | Identification of a conserved TRAF6-like binding motif in the intracellular domain of Grnd proteins. Multiple sequence alignment of the intracellular domain of Grnd and Grnd-like proteins in other species. A binding motif for TRAF6 (PxExx(aromatic/acidic residue)), the closest homologue of *Drosophila* Traf2, was previously identified in human TNFRs⁴. The position of a related putative Traf2-binding motif in the

intracellular domain of Grnd is indicated. Note that, although sequence similarity of the intracellular domain of Grnd degenerates outside the family *Drosophilidae*, the core residues of this motif (highlighted in red) remain highly conserved throughout the order Hymenoptera. Blue indicates residue identity; yellow, strong similarity to Grnd.



Extended Data Figure 4 | Grnd acts upstream of JNK signalling. **a–d**, Wild-type wing discs (**a**) or discs expressing *grnd* (**b**) or *grnd-intra* (**c**, **d**) in the *rn* domain were dissected 5 days AED and stained for Wg (left; green), Cas3 (middle; red), and Grnd (right; grey). **d**, **e**, Wing discs expressing *grnd-intra* in

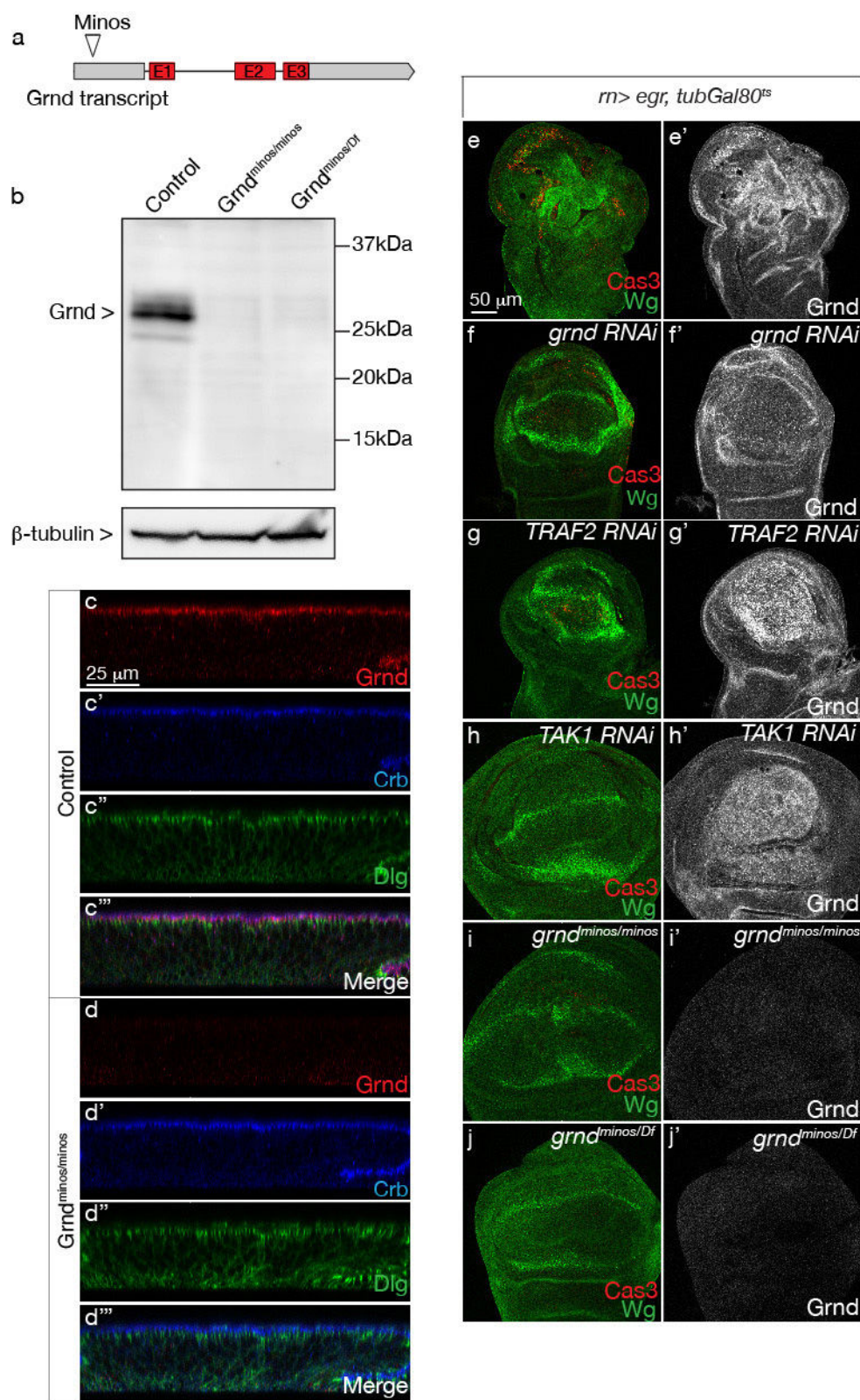
the *sal* domain (marked by a truncated line) in a wild-type (**d**) or *hep*⁷⁵ mutant (**e**) background were dissected 5 days AED and stained for Wg (left; green), Cas3 (middle; red), and Grnd (right; grey).



Extended Data Figure 5 | Characterization of the *wgn*^{KO} mutant allele.

a–e, Light micrographs of *Drosophila* adult eyes are shown. Original magnification, $\times 30$. The small-eye phenotype caused by *GMR*-driven expression of *egr* (**a**) is rescued by co-expressing *puc* (**c**) or reducing the activity of Traf2 (**b**), but not by reducing Wgn activity (**d**; also serves as a control to exclude a Gal4 titration effect). **f, g**, Reducing Grnd activity partially rescues the small-eye phenotype, giving rise to the hanging-eye phenotype (**f**) and is not further rescued in a *wgn*^{KO} mutant background (**g**). **h**, *wgn*^{KO} mutant flies do not display any eye phenotype. **i, j**, Reducing Grnd levels or expressing Grnd-extra in the *GMR* domain does not affect eye morphology. **k**, *GMR*-Gal4-

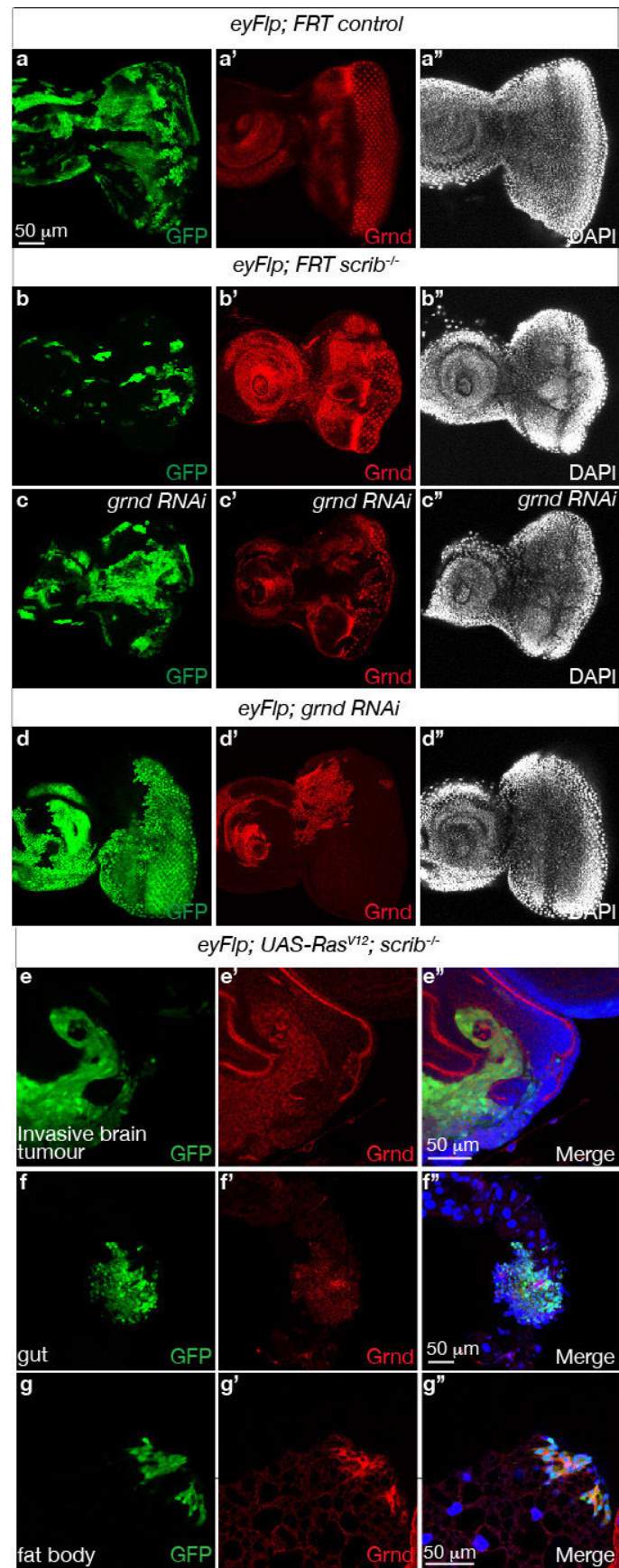
induced expression of a soluble form of Egr lacking the transmembrane and cytoplasmic domain (Ecto-Egr-60) gives rise to a small-eye phenotype¹⁰. **l**, Co-expression of *puc*^{2A} in a *GMR>ecto-egr-60* background partially rescues the small-eye phenotype, giving rise to a hanging-eye phenotype¹⁰. **m**, Sequence analysis of DNA extracted from flies homozygous for the *wgn*^{KO} mutation showing the two frameshift mutations introduced by cutting the unique intrinsic restriction sites AclI (exon 1) and NotI (exon 2) followed by T4 DNA polymerase-mediated fill-in. **n**, Western blot of fly extracts from the indicated genotypes probed with an anti-Wgn antibody²⁷. KO, knockout; OE, overexpressing; WT, wild type.



Extended Data Figure 6 | Characterization of the *grnd^{Minos}* mutant.

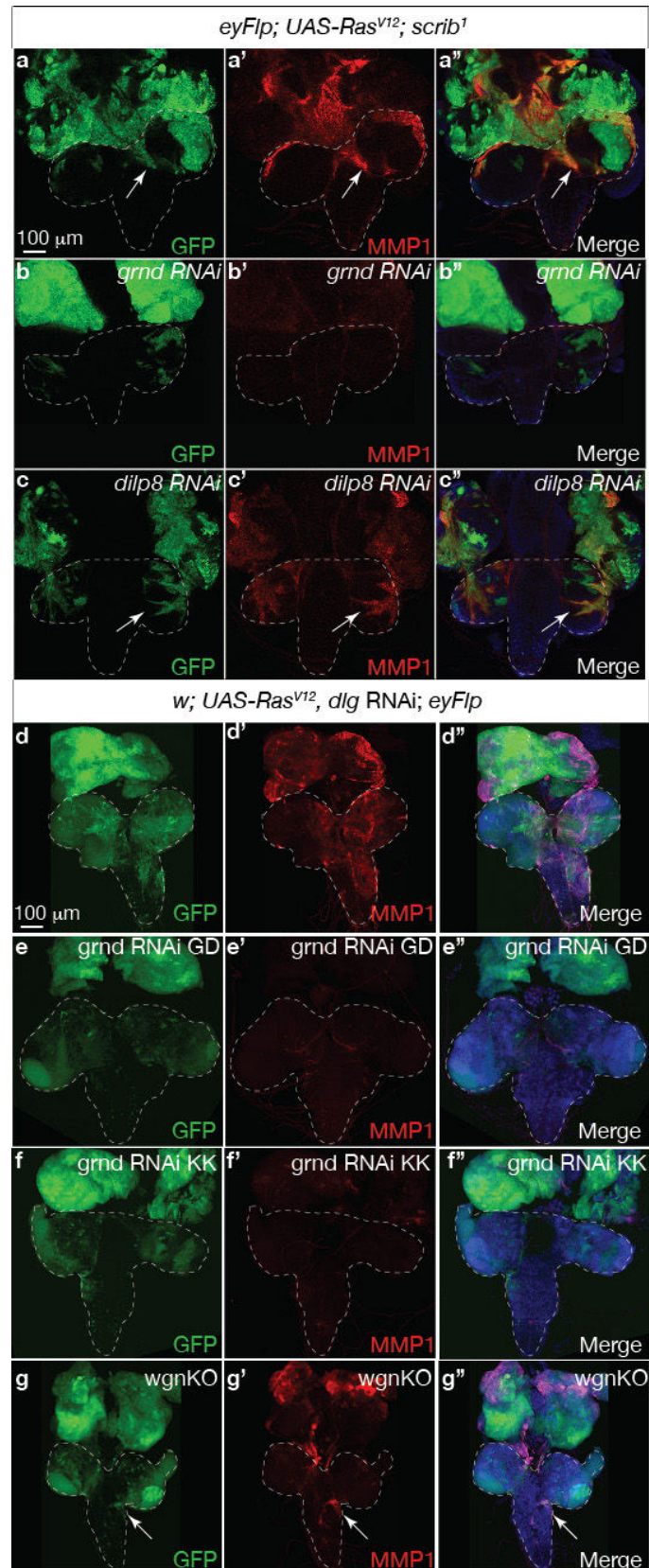
a, Schematic representation of the Minos transposon insertion in the *grnd* gene region corresponding to the 5' untranslated region of the transcript. **b**, Western blot of wing disc extracts from the indicated genotypes probed with anti-Grnd (top) and anti-β-tubulin (bottom) antibodies. Grnd protein migrates at the predicted size of 27 kDa (lane 1, control). Grnd protein levels are decreased below detection level in both *grnd^{Minos/Minos}* and *grnd^{Minos/Df}* mutant flies, indicating that *grnd^{Minos/Minos}* is indistinguishable from a null mutant. **c, d**, Polarity is not affected in *grnd^{Minos/Minos}* and *grnd^{Minos/Df}* wing discs.

Transverse sections of dissected control (c) or *grnd^{Minos/Minos}* (d) wing discs stained for Grnd (top; red), Crb (middle top; blue) and Dlg (middle bottom; green). **e–j**, Wing discs dissected from third instar larvae after 40 h of Egr expression in the *rn* domain. Pouch ablation, ubiquitous Wg expression and apoptosis observed in *rn>egr, Tub-Gal80^{ts}* discs (e) are suppressed to various extents upon co-expression of *grnd*-RNAi (f) or reduction of JNK activity (g, h) and fully suppressed in *grnd^{Minos/Minos}* (i) and *grnd^{Minos/Df}* (j) mutant backgrounds.



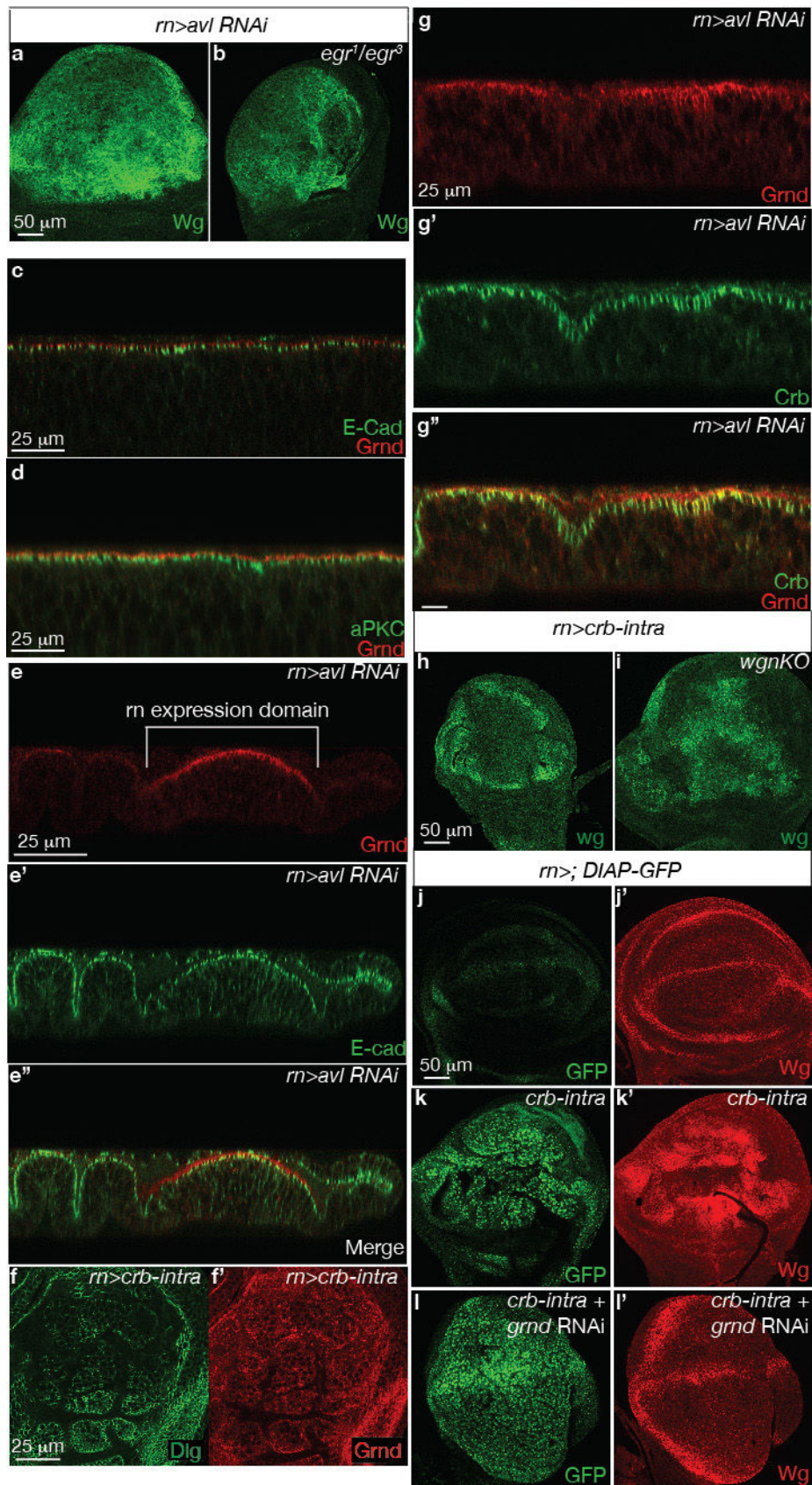
Extended Data Figure 7 | Grnd is highly expressed in $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ micro-metastases. **a–c**, Reducing *grnd* levels in *scrib*^{-/-} mutant clones prevent their elimination. Eye discs dissected 5 days AED carrying GFP-labelled MARCM clones of the indicated genotypes stained for Grnd (middle; red) and DAPI (right; grey). **d**, Reducing Grnd levels does not affect cell viability. Eye discs dissected 5 days AED carrying GFP-labelled *grnd* RNAi Flip-

out clones stained for Grnd (middle; red) and DAPI (right; grey). **e–g**, Invasive brain tumours and micro-metastases display high levels of Grnd protein. Dissected eye–brain complex (**e**), gut (**f**) and fat body (**g**) displaying GFP-labelled invasive $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ clones (**e**; green) or micro-metastases (**f**, **g**; green) stained for Grnd (red) and DAPI (blue).



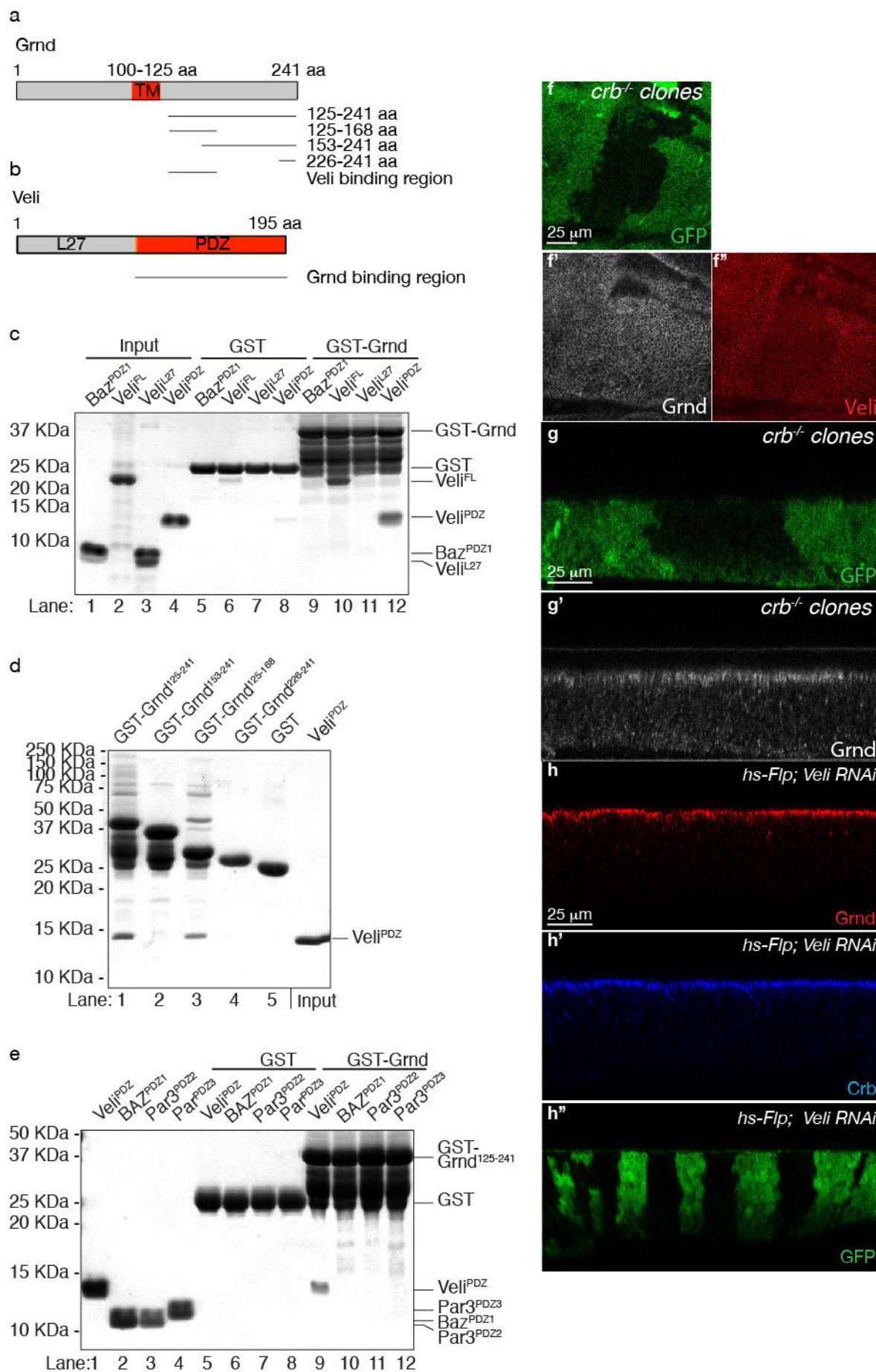
Extended Data Figure 8 | Grnd, but not Wgn, is required for Mmp1 expression both in *Ras*^{V12}/*scrib*¹ and *Ras*^{V12}/*Dlg* RNAi tumours. **a–c,** Eye-brain complexes dissected 7 days AED carrying *Ras*^{V12}/*scrib*¹ (a), *Ras*^{V12}/*scrib*¹ + *grnd*-RNAi (b), or *Ras*^{V12}/*scrib*¹ + *dilp8*-RNAi (c; control RNAi to exclude a Gal4 titration effect) clones labelled by GFP and stained for Mmp1 (middle; red). *Ras*^{V12}/*scrib*¹ and *Ras*^{V12}/*scrib*¹ + *dilp8*-RNAi clones

invade the ventral nerve cord (a, c; see white arrow). **d–g,** Eye-brain complexes dissected 7 days AED carrying *Ras*^{V12}/*Dlg*-RNAi (d) or *Ras*^{V12}/*Dlg*-RNAi + *grnd*-RNAi (e, f) clones (labelled by GFP), or *Ras*^{V12}/*Dlg*-RNAi GFP-labelled clones in a *wgn*-null mutant background (g) stained for Mmp1 (middle; red) and DAPI (right; blue). *Ras*^{V12}/*Dlg* RNAi clones invade the ventral nerve cord in *wgn*-null mutant animals (g; see white arrow).



Extended Data Figure 9 | Egr is not required for the *rn>avl* RNAi-induced neoplastic growth. **a, b**, Wing discs of the indicated genotypes dissected 6 days AED and stained for Wg (green). **c, d**, Transverse sections of dissected wild-type discs stained for Grnd (red) and either E-cad (**c**; in green), or aPKC (**d**; in green). **e, g**, Transverse sections of *rn>avl* RNAi wing discs dissected 5 days AED and stained for Grnd (top, bottom; red) and either E-cad (**e**, middle, bottom; green) or Crb (**g**, middle, bottom; green). The *rn* expression domain is indicated (**e**, top). **f**, Wing discs expressing *crb-intra* in the *rn* domain (*rn>crb-intra*) dissected 6 days AED and stained for Disc-large (Dlg, green) to visualize

neoplastic structures and Grnd (red). **h, i**, Wing discs expressing *crb-intra* in the *rn* domain of wild-type (**h**) or *wgn*-knockout mutant (**i**) animals dissected 6 days AED and stained for Wg (green). **j–l**, Reducing *grnd* levels does not affect *crb-intra*-mediated inhibition of Hippo signalling, which causes an upregulation of the Yki transcriptional target Diap1. Control discs (**j**) or wing discs expressing Crb-*intra* alone (**k**) or together with *grnd* RNAi (**l**) in the *rn* domain were dissected from animals carrying a reporter gene for Hippo pathway activity (*Diap-GFP*, green) and stained for Wg (red).



Extended Data Figure 10 | Grnd directly interacts with the PDZ domain of Veli and neither depends on Veli nor Crb for its proper localization. **a, b,** Schematic representation of Grnd and Veli (also known as Lin-7) domains and the various truncations used to map the interface of the Grnd–Veli interaction. L27, Lin-2/Lin-7 domain; PDZ, PSD-95/Dlg/ZO-1 domain; TM, transmembrane domain. **c,** GST–Grnd^{125–241} immobilized on GSH beads was incubated with full-length Veli (Veli^{FL}) or the complementary Veli fragments L27 (Veli^{L27}) and PDZ domain (Veli^{PDZ}). The PDZ1 domain of the polarity protein Bazooka was included in the pull-down as a specificity control (Baz^{PDZ1}). Coomassie-blue stained SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was used to visualize species retained on beads. Veli^{FL} and Veli^{PDZ} bind to Grnd (lanes 10 and 12), but not Veli^{L27} nor Baz^{PDZ1} (lanes 11 and 9), indicating that Grnd specifically recognizes the PDZ domain of Veli. **d,** To map the interface between Grnd and Veli^{PDZ}, the same binding assay was

performed using a battery of Grnd deletion mutants adsorbed on GSH beads. Veli^{PDZ} forms a complex with Grnd^{125–241} and Grnd^{125–168} (lanes 1 and 3), but not with the carboxy-terminal region of Grnd (lanes 2 and 4) or GST alone (lane 5, control). **e,** To address further the specificity of the binding of Grnd^{125–241} to the PDZ domain of Veli, we repeated the pull-down assay with the PDZ domains of Baz and its human orthologue PAR3. Veli^{PDZ} is retained on GST–Grnd^{125–241} beads (lane 9), while PAR3^{PDZ2}, PAR3^{PDZ3} and Baz^{PDZ1} are not (lanes 10, 11 and 12). **f–g,** Reducing Crb levels affects the localization of Veli, but not Grnd. **f–g, xy** (**f**) or transverse (**g**) sections of dissected wing discs bearing *crb*^{−/−} mutant clones (labelled by absence of GFP) stained for Grnd (**f**, bottom left; **g**, bottom; white) or Veli (**f**, bottom right; red). **h,** Reducing Veli levels does not affect Crb²⁰ or Grnd localization. Transverse sections of dissected wing discs bearing clones expressing *veli* RNAi (**h**, bottom; labelled by the presence of GFP) stained for Grnd (top; red) and Crb (middle; blue).

c. Conclusion

Une tumeur induite spécifiquement dans l'œil, entraîne une accumulation de MMP1 au niveau du SNC, caractéristique du caractère invasif de la tumeur. L'inhibition de *grnd* en contexte *Ras^{V12}/scrib* au sein de la tumeur supprime l'accumulation de MMP1. *Grnd* est requis pour l'expression de MMP1 dans les tumeurs *Ras^{V12}/scrib*.

La génération d'une lignée *UASRas^{V12};dilp8RNAi* m'a permis d'aider à la finalisation d'une figure supplémentaire de ce papier. En effet, l'inhibition de *dilp8* en contexte *Ras^{V12}/scrib* au sein de la tumeur n'a aucun effet sur l'accumulation de MMP1. Ce résultat confirme que seul *grnd* agit spécifiquement sur l'accumulation de MMP1.

VIII. Expériences complémentaires non publiées

1. La régulation de *dilp8* par *myc* de façon autonome cellulaire

Au cours de ma thèse, j'ai testé plusieurs régulateurs de la croissance et étudié leur effet sur l'expression de *dilp8*. La surexpression de l'InR ou de la PI3K n'a pas d'effet sur l'expression de *dilp8*. De façon surprenante, une surexpression de *myc* aboutit à une accumulation de Dilp8 dans la partie centrale du disque (Fig30). Cette régulation est assez singulière. En effet, lorsque je surexprime des activateurs de la voie JNK ou Yki, je constate une accumulation « autonome cellulaire » de Dilp8, ainsi qu'une accumulation dans les tissus adjacents, tels que le notum. Cette activation non autonome n'est pas présente dans le cas d'une surexpression de *myc*.

De façon surprenante, j'ai pu aussi montrer qu'inhiber Sd est suffisant pour empêcher l'accumulation de *Dilp8* dépendante de *myc*.

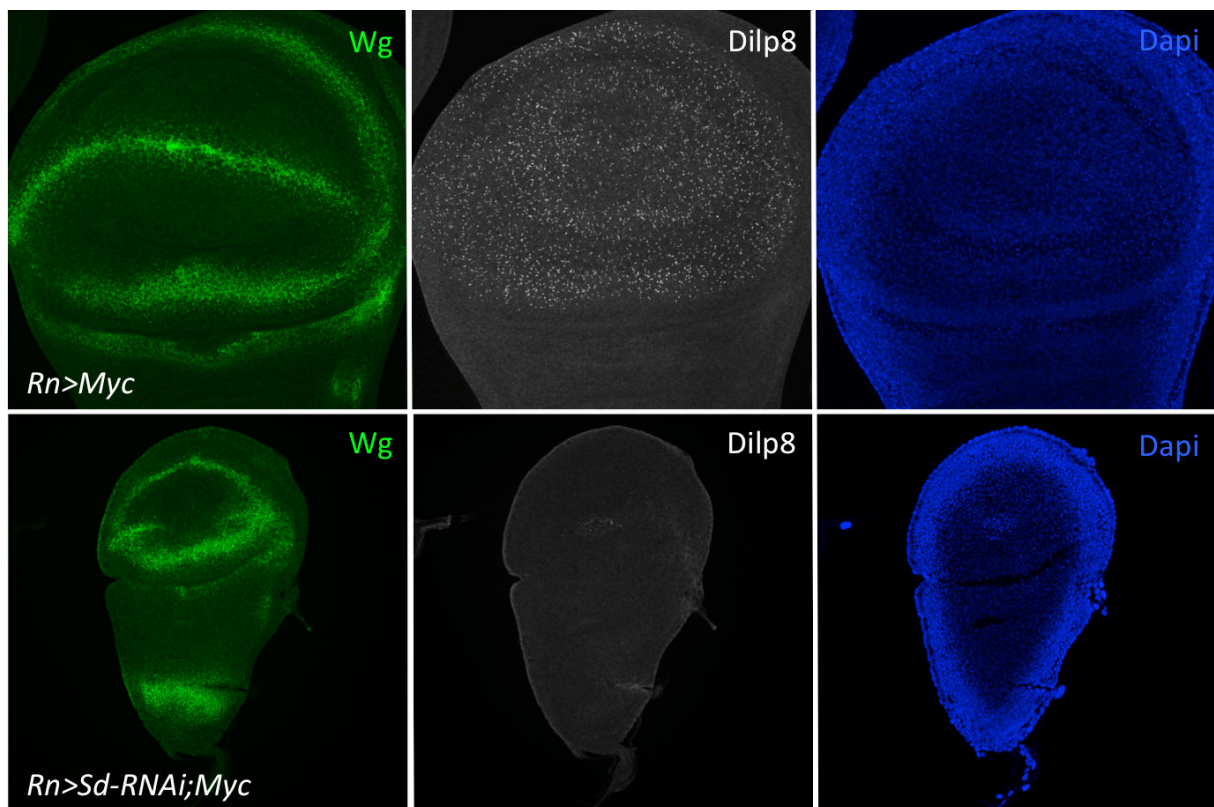


Figure 30 : La régulation de *dilp8* par *myc* est dépendante de *scalloped*.

En réalisant une expérience de surexpression de *myc* en contexte mutant pour Hep, j'ai pu montrer une accumulation de Dilp8 (Fig31). Cette expérience confirme que l'accumulation de Dilp8 en présence d'une surexpression de *myc* n'est pas dépendante de JNK.

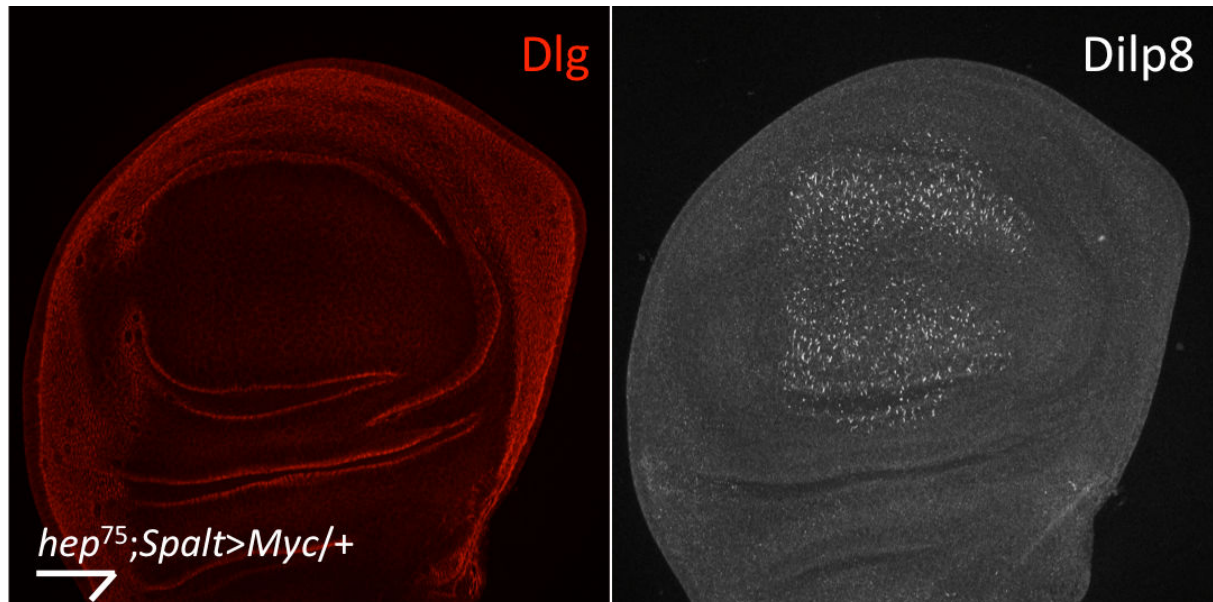


Figure 31 : Une surexpression de *myc* entraîne une accumulation de Dilp8 indépendante de la voie JNK.

2. Le rétrocontrôle autonome de *dilp8* sur la croissance du disque n'est pas dépendant de la voie Hippo

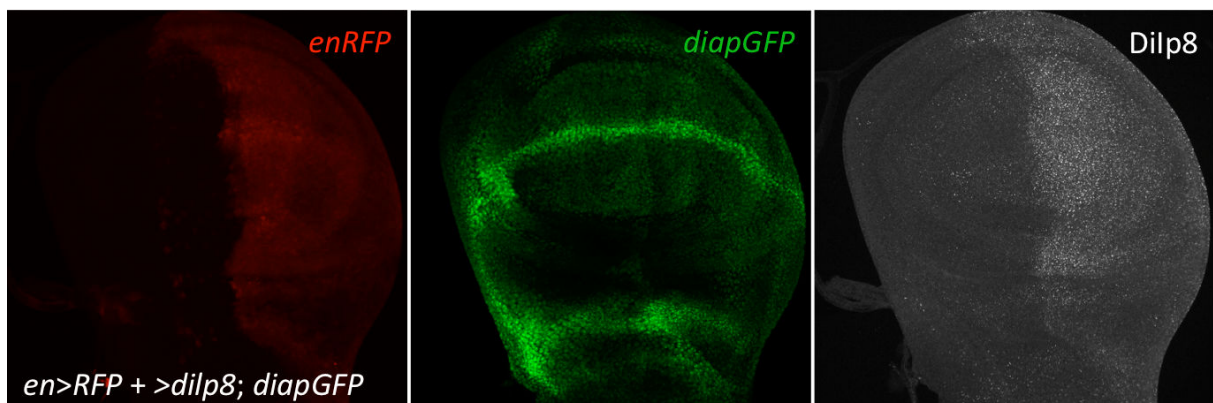


Figure 32 : Une surexpression de *dilp8* dans le compartiment postérieur n'affecte pas les niveaux d'expression du rapporteur transcriptionnel de la voie de signalisation Hippo, *diapGFP*.

En contexte de ralentissement de la croissance d'un des disques imaginaux, les autres disques arrêtent temporairement leur développement pour laisser le temps au disque endommagé de rattraper son retard de croissance. Le disque dont la croissance est ralentie est donc insensible au signal systémique, probablement l'ecdysone, entraînant un arrêt temporaire

de la croissance. Une des hypothèses est la présence d'un rétrocontrôle de Dilp8 sur le disque à la croissance ralentie via la voie de signalisation Hippo. Dilp8 en agissant de façon autonome sur le disque pourrait maintenir la croissance du disque en retard. Pour tester cette hypothèse, j'ai utilisé un rapporteur de la voie de signalisation Hippo, *diapGFP*. Une surexpression de *dilp8* dans le compartiment postérieur (Engrailed) devrait entraîner une surexpression de *diap*. Aucune modification des niveaux d'expression de *diapGFP* n'est visible (Fig32). Il semble que s'il existe un rétrocontrôle de *dilp8* sur le disque en retard, il ne passe pas par la voie de signalisation Hippo.

3. *Dilp8* n'est pas transcriptionnellement régulé par *stat* dans les clones surexprimant *Yki*

Au cours de mes expériences, j'ai pu constater de façon surprenante que les clones se situant à la périphérie du disque présentaient une plus forte accumulation de Dilp8 et une activation plus forte du rapporteur transcriptionnel *dilp8PF-LacZ*. De récentes publications ont montré que *dilp8* peut être régulée transcriptionnellement par la voie de signalisation JAK/STAT en aval de JNK.

Pour tester cette hypothèse, j'ai généré des clones surexprimant *Yki* et suivi un rapporteur de la voie de signalisation JAK/STAT, *statGFP*.

Les clones surexprimant *yki* contiennent bien une accumulation de Dilp8 plus importante en périphérie. Le rapporteur de la voie JAK/STAT montre une diminution de la GFP (Fig33). Dans les clones en périphérie des disques, *dilp8* n'est pas transcriptionnellement régulé par JAK/STAT.

La différence d'accumulation de Dilp8 au sein des clones périphériques pourrait provenir d'une différence des forces mécaniques. Les clones périphériques sont soumis à des forces d'extension alors que les clones au centre sont soumis à des forces de compression. Ces forces de compression sont propices à une localisation cytosolique de Yki ne favorisant pas l'accumulation de Dilp8 au centre du disque.

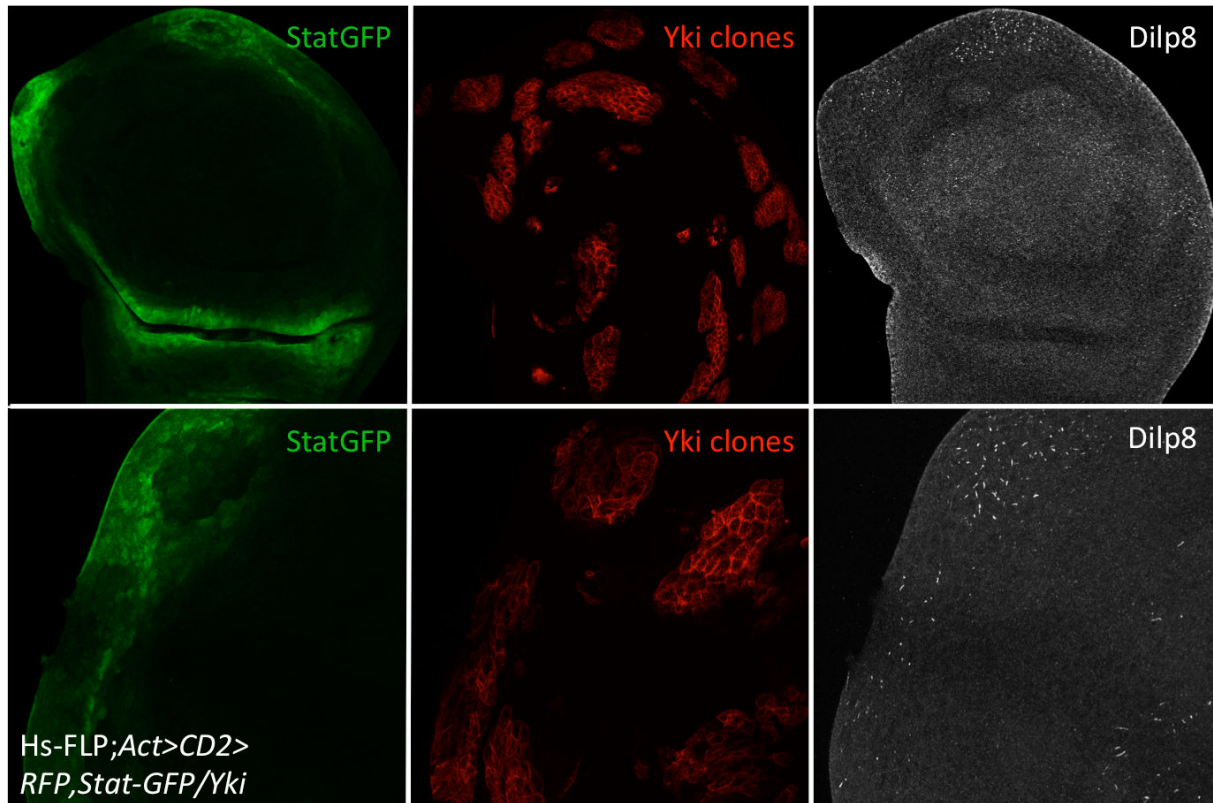


Figure 33 : La voie de signalisation JAK/STAT n'est pas activée dans les clones surexprimant *Yki*.

D'après During Drosophila disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay, Katsuyama, PNAS, 2015

Conclusion générale

Mon projet de thèse a permis une meilleure compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène *dilp8* assurant la coordination de la croissance entre tissus et le couplage de la croissance avec l'horloge développementale. Il est intéressant de noter que *dilp8* possède de fortes homologues de séquences avec la famille des insulines / IGF / relaxines. Ceci ouvre la possibilité qu'un mécanisme de synchronisation similaire existe chez les vertébrés dans les cas où la croissance est ralentie par une lésion tissulaire nécessitant une réparation ou en réponse à la croissance tumorale.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché principalement à caractériser les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *dilp8* au cours du développement normal et en condition de stress tissulaire.

Au cours du crible initial, 121 lignées ont sauvé le retard de développement induit par une croissance néoplasique. Ces sauvetages sont dus à une réduction des niveaux d'expression de *dilp8*. J'ai donc quantifié par qPCR l'expression de *dilp8* dans ces conditions de sauvetage. Cette approche m'a permis d'isoler les gènes *yki* et *sd*, deux co-régulateurs transcriptionnels de la voie de signalisation Hippo. La voie de signalisation Hpo est conservée au cours de l'évolution. Elle joue un rôle clé dans le contrôle de la taille des organes en couplant les paramètres biomécaniques des tissus (densité cellulaire, contraintes de tension et de pression induites par la croissance) avec l'activité de prolifération des cellules. Le dérèglement de la voie Hpo est impliqué dans de nombreux cancers humains. Sd est le co-facteur transcriptionnel de Yki, se liant à l'ADN. Yki est l'activateur transcriptionnel, dont la localisation nucléaire et l'activité, sont directement contrôlées par la voie de signalisation Hippo.

J'ai, dans un premier temps, montré qu'une surexpression de Yki capable d'induire une surcroissance tissulaire s'accompagne d'une forte augmentation des niveaux d'expression de *dilp8*. Grâce à une analyse *in silico*, j'ai identifié les sites de fixation de Sd sur le promoteur *dilp8*. La validation fonctionnelle de ces sites a été réalisée à l'aide d'expériences de fixation à l'ADN d'une forme étiquetée de Sd («DNA pull down»), démontrant une interaction physique directe entre le promoteur *dilp8* et le complexe Yki/Sd. Des tests d'expression ont confirmé une activation transcriptionnelle de *dilp8* par Yki/Sd *in vitro* (essai luciférase en cellules) et *in vivo* (rapporteur d'activité de type enhancer trap). Au cours de ces tests, j'ai montré que la mutation d'un seul site de fixation de Sd au sein du promoteur suffit à réduire l'activation du promoteur de *dilp8* de façon significative.

La régulation transcriptionnelle de *dilp8* par Yki/Sd représente donc le lien potentiel entre l'état de croissance des tissus et la production de Dilp8. *dilp8* joue un rôle clé dans le maintien de la stabilité développementale en participant à la synchronisation de la croissance. En effet, les animaux mutants pour *dilp8* présentent une forte augmentation de la variabilité intra et inter individuelle de la taille des organes. La stabilité développementale repose donc sur le lien entre Hpo/Yki et Dilp8. Afin de tester cela expérimentalement, j'ai généré un mutant *dilp8* par mutagenèse dirigée CRISPR/CAS9, dans lequel seuls les sites de fixation

Sd/Yki du promoteur endogène *dilp8* ont été mutés. Cette mutagenèse dirigée m'a permis d'obtenir une forme mutante du gène *dilp8* sans régulation transcriptionnelle par la voie Hpo/Yki. L'analyse du phénotype de cette mutation montre une forte asymétrie fluctuante entre les ailes droite et gauche (FA) confirmant l'implication de *dilp8* dans le contrôle du bruit développemental.

Cette augmentation de la FA est une démonstration de l'importance fonctionnelle de la régulation de *dilp8* par Yki/Sd pour la détermination de la taille finale et le maintien des proportions entre les organes (Fig34).

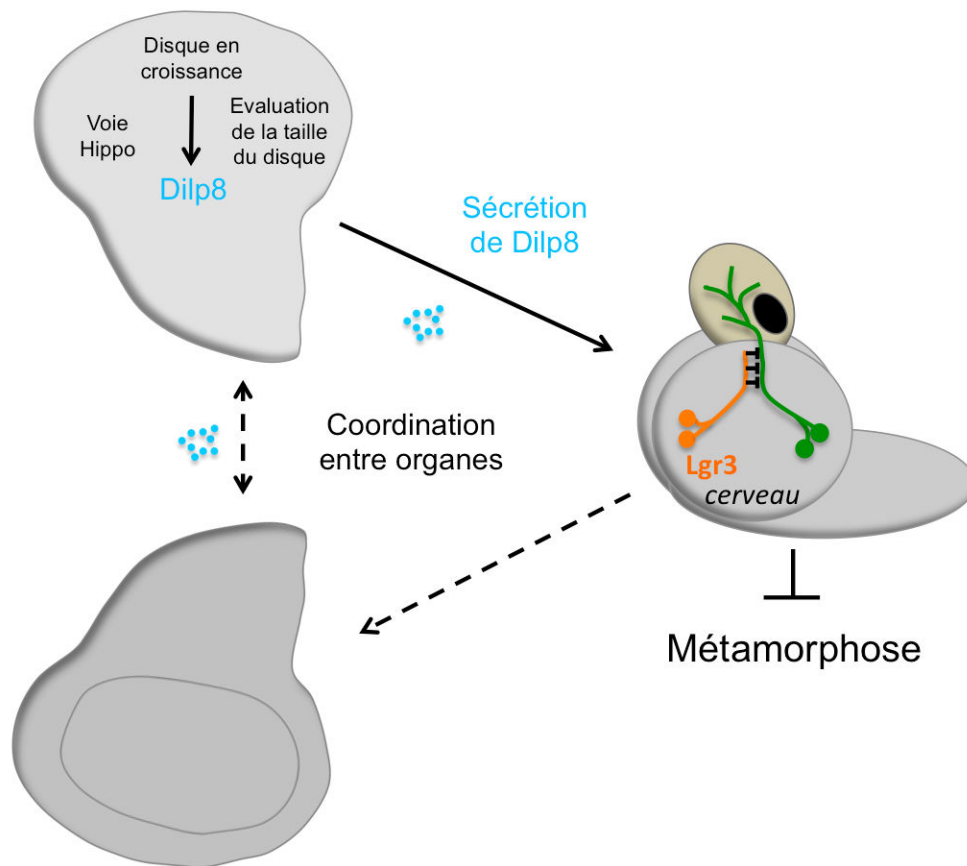


Figure 34: *dilp8* est impliqué dans la coordination inter-organes et l'horloge développementale.

Discussion

Au cours de ma thèse je me suis principalement intéressée aux relations de croissance entre des organes paires singuliers, les ailes de drosophile. Pour se faire, j'ai étudié le rôle de la protéine Dilp8 dans le contrôle de la robustesse développementale et son induction dans différentes conditions de perturbation de la croissance tissulaire.

Des résultats précédemment publiés par notre équipe et par l'équipe de M. Dominguez montrent que l'expression de *dilp8* est fortement induite en conditions de stress telles qu'une croissance fortement ralentie (silencing de Rpl-7), une croissance néoplasique ou durant la régénération tissulaire. Dans ces conditions, *dilp8* est contrôlé transcriptionnellement par la voie de signalisation JNK. Le promoteur de *dilp8* contient des sites AP1 (facteur de transcription de la voie JNK) qui pourrait participer à la régulation de l'expression de *dilp8* par la voie JNK. La voie JNK induit la transcription de *dilp8* en réponse à différentes conditions de stress tissulaire représentant un point de contrôle important et permettant la régénération de l'organisme avant son entrée en métamorphose. L'activation de cette voie n'est cependant pas détectable au cours du développement normal. De plus, j'ai pu montrer que les mutants viables pour la kinase de la voie JNK, Hep ne présentent pas d'asymétrie fluctuante. En conséquence, il semble que la voie JNK ne contrôle pas la coordination de la croissance des organes chez des animaux sains.

La régulation de l'expression de *dilp8* par la voie de signalisation Hippo coordonne la croissance des organes et contrôle la stabilité développementale.

Au cours du développement normal, l'équipe a montré que le gène *dilp8* montre un pic d'expression au milieu de la période de croissance larvaire, suivi d'une forte réduction au moment de l'arrêt de croissance. *dilp8* a une fonction physiologique propre au cours du développement puisqu'un mutant nul pour *dilp8* présente une augmentation de l'asymétrie fluctuante (FA). Ceci suggère donc que l'état de maturation/croissance des tissus influence directement sur les niveaux d'expression de *dilp8*. Il était donc important d'essayer d'identifier les différents acteurs participant à la régulation de l'activité de Dilp8 et contribuant au mécanisme de couplage de la croissance des organes. Au cours de ma thèse, j'ai identifié des éléments de réponse à Sd, un co-partenaire de Yorkie, sur le promoteur de *dilp8*. Yorkie est l'activateur transcriptionnel de la voie de signalisation Hippo. J'ai montré que Sd se lie au promoteur de *dilp8* *in vitro* et *in vivo*. J'ai confirmé que *dilp8* est régulé par la voie Hippo et plus spécifiquement par son activateur transcriptionnel Yorkie.

Compte tenu de ces résultats, il devenait possible que le contrôle de la stabilité développementale par *dilp8* repose sur le lien entre Hpo/Yki et *dilp8*. Afin de tester cette hypothèse, j'ai généré un mutant *dilp8* par mutagenèse dirigée CRISPR/CAS9, dans lequel seuls les sites de fixation pour Sd/Yki sur le promoteur endogène de *dilp8* sont modifiés. Il s'agit d'une forme mutante du gène *dilp8* incapable de répondre à la voie Hpo/Yki. L'analyse du phénotype de cette mutation montre une forte asymétrie fluctuante confirmant l'implication de *dilp8* dans le contrôle du bruit développemental. Cette augmentation de la FA

confirme l'importance fonctionnelle de la régulation de *dilp8* par Yki/Sd pour la détermination de la taille finale et le maintien des proportions entre les organes.

Le tissu imaginal subit des déformations et des contraintes physiques (contraction et étirement) qui peuvent être analysées en direct au cours du développement. De façon intéressante, la voie de signalisation Hippo reçoit de nombreuses informations qu'elle traduit sous forme de croissance, telles que la polarité cellulaire, l'adhésion cellulaire, les forces mécaniques, des facteurs solubles agissant sur des GPCRs, et le statut métabolique cellulaire (Yu et al., 2015). Le couplage entre *dilp8* et la voie de signalisation Hippo pourrait être impliqué dans le contrôle de la coordination de la croissance en réponse aux forces mécaniques, couplant ces forces mécaniques avec la croissance tissulaire.

Dilp8, rétrocontrôle continu ou point de contrôle ?

La coordination de la taille des organes au cours du développement peut être expliquée par deux modèles non exclusifs. Un premier modèle suggère que les disques pourraient être soumis à un point de contrôle au cours du développement. Ce point de contrôle serait primordial pour le développement des tissus imaginaux et consisterait en une évaluation de la taille des disques avant l'entrée en pupes. En l'absence d'une taille adéquate du ou des disques, un retard développemental se mettrait en place, modifiant la transition développementale larve-pupe (Edgar, 2006; Poodry & Woods, 1990). Un deuxième modèle propose qu'un rétrocontrôle continu évaluerait tout au long du développement la taille des disques et adapterait le taux de croissance des disques pour parvenir au moment de l'entrée en pupes à une taille cible. Les organes pourraient, de façon autonome, exercer un rétrocontrôle sur leurs propres croissances tout en communiquant leur état de croissance au reste de l'organisme. De nombreuses études suggèrent que ces 2 modèles coexistent. Cependant la plupart de ces études sont réalisées dans des conditions de fortes perturbations de croissance, il serait intéressant de comprendre le modèle prédominant au cours du développement normal.

L'équipe, en partenariat avec le Dr Lubensky, physicien théoricien à l'Université du Michigan, tente de modéliser grâce à des outils mathématiques le rôle de Dilp8 dans le contrôle de la croissance. Par cette approche, nous tentons de comprendre les rétrocontrôles qui s'opèrent entre les différentes voies lors de la coordination de la croissance des organes. Des résultats préliminaires du Dr Lubensky suggèrent que le seul modèle du point de contrôle ne suffit pas à expliquer les résultats expérimentaux observés. Les mutants pour *dilp8* s'empupent prématurément avec une avance d'environ 4 heures (Colombani et al., 2012). Cependant, la seule modélisation d'un mécanisme de point de contrôle prédit qu'une différence de 4h sur l'entrée en pupaison est insuffisante pour justifier l'augmentation de la FA observée dans les mutants nuls pour *dilp8*. Ces résultats préliminaires suggèrent que *dilp8* soit aussi impliqué dans un mécanisme de rétrocontrôle continu. Une approche permettant de confirmer un rôle de *dilp8* dans le contrôle de la stabilité développementale grâce à un mécanisme de rétrocontrôle continu serait d'induire prématurément une entrée en pupes, par exemple en surexprimant l'hormone PTTH, et d'analyser les effets sur la FA.

Approche génétique pour étudier le contrôle de la croissance de rattrapage par *dilp8*

Au cours du développement normal et en présence d'une légère asymétrie, le disque en retard pourrait accélérer temporairement son taux de croissance pour rattraper les autres disques, selon un mécanisme de croissance de rattrapage. Dans les conditions expérimentales telles qu'une croissance lente de type minute RNAi (inhibition de la synthèse des ribosomes, Rp-RNAi), une accélération temporaire de la croissance du disque est impossible puisqu'un ralentissement du taux de croissance est induit artificiellement tout au long de la croissance.

Afin de tester le rôle potentiel de *dilp8* dans la croissance de rattrapage, il faudrait induire temporairement une lésion d'un des disques imaginaux. Pour ce faire, nous pourrions tirer avantage d'un nouvel outil récemment découvert par l'équipe du Dr Hariharan (Smith-Bolton et al., 2009). Cet outil permet d'induire une apoptose régulée temporellement et spatialement au sein des larves de drosophile. Il serait ainsi possible d'induire une légère manipulation de la croissance au sein d'une population de disque (par exemple les disques d'ailes) et d'observer la croissance d'une autre population (par exemple les disques d'œil). De plus, une induction temporellement et spatialement réduite d'apoptose au sein d'une population de disques dans des larves sauvages ou mutantes pour *dilp8* pourrait mettre en évidence une croissance de rattrapage dépendante de *dilp8*.

Approche optogénétique pour étudier les mécanismes de couplage de la croissance des organes

L'étude des organes pairs est particulièrement pertinente pour élucider les mécanismes de coordination de la croissance. Les mutants nuls pour *dilp8* présentent une asymétrie bilatérale confirmant son rôle dans la coordination inter-organes. Cependant, le mécanisme de coordination est actuellement méconnu. Un des moyens de mieux comprendre ce mécanisme serait d'induire une perturbation de croissance de façon unilatérale et observer la compensation contralatérale.

Dans ce but, il pourrait être intéressant d'utiliser les récentes techniques d'optogénétique pour créer une perturbation unilatérale de la croissance des disques (Wang et al., 2012)(Chan et al., 2015). Le but est dans ce cas d'induire une inhibition par photoactivation des gènes impliqués dans la production de ribosome (Rp-RNAi), entraînant des défauts de croissance unilatéraux. Les disques contralatéraux pourraient être testés pour suivre leur capacité de coordination de la croissance au cours du temps. Le suivi de la croissance d'un disque au cours du développement a déjà été réalisé au sein de l'équipe du Dr Aegerter. Bien que complexe techniquement, ceci semble réalisable (Nienhaus et al., 2012). Cette expérience permettra de confirmer ou d'infirmer la présence d'un rétrocontrôle autonome continu sur la croissance du disque. La réalisation de la même expérience dans des animaux mutants pour *dilp8* permettra de confirmer l'absence de coordination entre les organes pairs chez ces animaux et la présence ou l'absence de rétrocontrôle continu.

Une autre approche est actuellement développée au sein du laboratoire, consistant à générer un mutant nul conditionnel pour *dilp8*. Deux FRT sont « flanqués » autour du locus du *dilp8* correspondant à la région située au début du premier exon et à la fin du second exon. Grâce à une flipase, les FRT peuvent être sollicités, mobilisant cette région endogène codante de *dilp8* et remplaçant cette région par une cassette. Grâce à ce mutant, il serait possible

d'inhiber temporellement l'expression de *dilp8*. Ce mutant permettrait de conclure sur la période au cours de laquelle *dilp8* est indispensable pour le maintien de la stabilité développementale. En effet, des mécanismes de compensation de la croissance opèrent durant la période pupale (Etournay et al., 2015). Il est donc nécessaire de savoir précisément quand s'opère la coordination des organes pour comprendre la participation des différents acteurs à ce processus développemental.

Dilp8 contrôle les niveaux de l'ecdysone, un signal systémique impliqué dans le contrôle des variations locales de croissance

Au cours de ma participation à la découverte du récepteur de Dilp8, Lgr3, j'ai pu montrer que la fonction de contrôle de l'asymétrie bilatérale de Dilp8 passe par son récepteur localisé dans les neurones GCL au sein du cerveau. La fonction de Dilp8 passe au moins partiellement par sa liaison avec le récepteur Lgr3, entraînant une modification des niveaux d'ecdysone. Dilp8 pourrait donc avoir un rôle de régulateur de la croissance indirectement en agissant sur les niveaux d'ecdysone circulant, sans effet autonome sur la croissance du disque qui le produit. Dans le cas d'une lésion du disque, celui-ci doit poursuivre sa croissance alors que les autres disques observent un ralentissement. Comment expliquer ce contrôle différentiel joué par une hormone circulante ? Une possibilité est que le disque affecté puisse adapter sa sensibilité à l'ecdysone en fonction de son degré de maturation et/ou croissance. Pour vérifier cette hypothèse, il pourrait être intéressant de jouer sur les niveaux basaux d'ecdysone. Ces variations pourraient perturber l'évaluation des niveaux d'ecdysone par le disque et entraîner une augmentation de la FA.

Pour identifier les molécules en aval de Lgr3 permettant la coordination de la croissance des tissus, un crible pourrait être réalisé en profitant de deux systèmes d'expression tissu-spécifique indépendant, UasGal4 et LexA-Lexop. Un premier système d'expression affecterait la croissance d'une population de disque, produisant une surexpression de *dilp8*. Un deuxième système d'expression inhiberait un à un les récepteurs exprimés au sein d'une deuxième population de disques. L'utilisation de ces deux systèmes d'expression en parallèle permettrait de tester la relation entre les deux tissus et d'élucider la présence ou non d'un récepteur à l'ecdysone contrôlant la réponse à Dilp8.

Dilp8 est-il impliqué dans un contrôle autonome de la croissance des disques imaginaux ?

La coordination de la croissance dépendante de *dilp8* semble être contrôlée par une réponse systémique, via l'ecdysone. Cependant, aucune expérience ne démontre actuellement que *dilp8* n'agit pas de façon autonome sur la croissance du disque.

Dilp8 pourrait agir localement sur le disque le produisant, en se liant aux récepteurs Lgr3 et Lgr4 (un récepteur orphelin présentant une forte similarité avec Lgr3). Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire, à l'aide d'une lignée Lgr3-GFP, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de Lgr3 au sein des disques imaginaux (Garelli et al., 2015). De plus, les données d'expression des gènes disponibles sur Flybase suggèrent que Lgr3 et son analogue Lgr4 ne sont pas exprimés au sein des disques imaginaux (Modencode Data Flybase). Afin de confirmer que la coordination inter-organes contrôlée par *dilp8* est

indépendante de Lgr3, il pourrait être intéressant d'inhiber Lgr3 dans les disques imaginaux d'ailes et de vérifier la présence ou non d'une augmentation de la FA.

Dilp8 pourrait agir de façon autonome sur la croissance du disque via la liaison à un autre récepteur d'affinité. Un des récepteurs candidats pourrait être l'InR puisque les autres membres de la famille des Dilps ont une forte affinité pour ce récepteur. Au sein du laboratoire, quelques expériences préliminaires n'ont pas permis de montrer de liaison de Dilp8 à l'InR (culture cellulaire-Western Blot). Cependant, une récente étude, publiée par l'équipe du Dr Gontijo a montré, en utilisant un « essai de capture ligand récepteur » suivi d'une analyse par spectrométrie de masse (LRC-Triceps), que Dilp8 est capable de se lier à l'InR, *in vitro* (Frei et al., 2012)(Garelli et al., 2015). De plus, des données d'expression (ModEncode Tissue expression Data) et de génétique confirment que le récepteur à l'insuline *inr* est exprimé et fonctionnel au sein des tissus imaginaux. L'ensemble de ces données suggère que Dilp8 pourrait se lier à l'Inr au sein des tissus imaginaux, activant un rétrocontrôle continu de la croissance via une voie de signalisation Inr-Dilp8.

Dilp8 est régulé transcriptionnellement par la voie de signalisation Hippo. Dilp8 pourrait être impliqué dans un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation Hippo. Pour tester cette hypothèse, j'ai tout d'abord réalisé une expérience de coculture de cellules de drosophile (S2R+) avec un peptide synthétique Dilp8. Pour mettre en évidence un effet autonome cellulaire de l'ajout de Dilp8 sur la voie de signalisation Hippo, j'ai suivi la phosphorylation de Yki. Après réalisation d'un Western Blot avec un anticorps anti phospho-Yki, je n'ai pas pu mettre en évidence de variations dans les niveaux de phosphorylation de Yki.

Dans le but de confirmer ce résultat, j'ai réalisé un immuno-marquage sur des disques surexprimant *dilp8* dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile, et suivi l'expression d'un rapporteur de la voie de signalisation Hippo, *diapGFP* (CF expériences complémentaires). J'ai pu montrer que l'expression du rapporteur *diapGFP* n'est pas modifiée par la surexpression de *dilp8*. Pour l'instant l'existence d'un rétrocontrôle autonome sur la croissance du disque est à l'état d'hypothèse, des expériences complémentaires devront être réalisées pour exclure ou non un rôle de *dilp8* dans un contrôle autonome de la croissance du disque.

J'ai réalisé une dernière expérience afin de comprendre si l'expression de *dilp8* induite par Yki pouvait agir via un rétrocontrôle négatif sur la croissance autonome du disque. Pour se faire, j'ai surexprimé *yki* dans le domaine central du disque (*rotund*) en présence et en l'absence de *dilp8* (*dilp8RNAi*). En l'absence de *dilp8*, les disques surexprimant *yki* présentent une surcroissance non contrôlée. Cette surcroissance semble être plus importante que dans les disques surexprimant seulement *yki*. Cependant, ces résultats sont à modérer. En effet, une forte variabilité de la taille des disques est visible. Il est donc difficile de tirer une conclusion définitive sur le rôle inhibiteur de *dilp8* sur la croissance autonome du disque via un rétrocontrôle négatif.

Récemment, il a été montré que le coactivateur du récepteur de l'ecdysone, Taiman se lie à Yorkie. De façon intéressante, Yki ne pourrait activer la transcription de *dilp8* qu'en présence de Taiman et de l'EcR. L'ecdysone opèrerait donc un rétrocontrôle sur *dilp8* par le biais du coactivateur du récepteur de l'ecdysone, Taiman. De nombreuses boucles de

rétrocontrôle existent donc pour permettre une canalisation du système de croissance des disques imaginaires

Rôle de Dilp8 dans le couplage entre les forces mécaniques et la croissance

La croissance d'un organe repose sur une prolifération cellulaire qui génère des contraintes physiques au sein du tissu. Plusieurs modèles proposent que l'augmentation progressive des forces mécaniques au coeur du champ tissulaire entraîne une compression qui conduit à l'arrêt de la croissance. Comprendre comment les signaux mécaniques participent à la détermination de la taille finale des organes est un objectif clé des recherches sur la croissance normale. Un projet de recherche auquel j'ai participé, actuellement mené en collaboration avec l'équipe de Y. Bellaïche (Institut Curie), aborde l'implication de Dilp8 dans le couplage de la croissance et des forces mécaniques. L'équipe de Y. Bellaïche a développé une technologie innovante permettant de visualiser en temps réel la morphogénèse d'un épithélium, appelé le notum. En utilisant une lignée rapportant l'expression de *dilp8*, il est prévu d'analyser la corrélation entre les zones d'expression de *dilp8* et les zones de stress mécanique au cours de la morphogénèse du notum. Une analyse en temps réel de la morphogénèse en contexte mutant pour *dilp8* permettrait également d'observer si l'absence de *dilp8* conduit à des défauts de morphogénèse semblables à ceux observés chez les adultes mutants pour *dilp8*. Les liens entre l'adhésion cellulaire, la voie Hpo/Yki et l'expression de *dilp8* seront également testés dans le contexte de la formation du notum.

Rôle de Dilp8 dans la croissance tumorale

Comprendre les mécanismes de régulation de la croissance s'avère être un enjeu particulièrement important pour la compréhension des mécanismes de cancérisation. J'ai montré que *dilp8* est contrôlé par Yki, facteur transcriptionnel de la voie Hippo, une voie fortement impliquée dans la prolifération et la survie des tissus tumoraux. Les travaux effectués sur *dilp8* montrent une forte surexpression du gène au sein des tissus tumoraux chez la drosophile. Nos études suggèrent que *dilp8* pourrait bloquer de manière systémique et/ou périphérique la croissance des tissus sains au profit de la croissance des tumeurs, un phénomène comparable à la cachexie observée chez les patients atteints de cancer. Dans le but de tester ces hypothèses, je souhaiterais utiliser la transplantation de tumeurs exprimant ou non *dilp8* dans l'abdomen d'adultes hôtes et tester l'effet de ces transplantations sur le métabolisme des tissus sains (Kwon et al., 2015; Figueroa-Clarevega and Bilder, 2015).

Références

- 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, Wortman, JR, Yandell, MD, Zhang, Q, Chen, LX, Brandon, RC, Rogers, Y-HC, Blazej, RG, Champe, M, Pfeiffer, BD, Wan, KH, Doyle, C, Baxter, EG, Helt, G, Nelson, CR, Gabor, GL, Miklos, Abril, JF, Agbayani, A, An, H-J, Andrews-Pfannkoch, C, Baldwin, D, Ballew, RM, Basu, A, Baxendale, J, Bayraktaroglu, L, Beasley, EM, Beeson, KY, Benos, P V, Berman, BP, Bhandari, D, Bolshakov, S, Borkova, D, Botchan, MR, Bouck, J, Brokstein, P, Brottier, P, Burtis, KC, Busam, DA, Butler, H, Cadieu, E, Center, A, Chandra, I, Cherry, JM, Cawley, S, Dahlke, C, Davenport, LB, Davies, P, Pablos, B de, Delcher, A, Deng, Z, Mays, AD, Dew, I, Dietz, SM, Dodson, K, Doup, LE, Downes, M, Dugan-Rocha, S, Dunkov, BC, Dunn, P, Durbin, KJ, Evangelista, CC, Ferraz, C, Ferriera, S, Fleischmann, W, Fosler, C, Gabrielian, AE, Garg, NS, Gelbart, WM, Glasser, K, Glodek, A, Gong, F, Gorrell, JH, Gu, Z, Guan, P, Harris, M, Harris, NL, Harvey, D, Heiman, TJ, Hernandez, JR, Houck, J, Hostin, D, Houston, KA, et al. 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* (80-.). 287: 2185–2195.
- Aigouy, B, Farhadifar, R, Staple, DB, Sagner, A, Roper, JC, Jülicher, F, Eaton, S. 2010. Cell Flow Reorients the Axis of Planar Polarity in the Wing Epithelium of *Drosophila*. *Cell* 142: 773–786.
- Akiyama, T, Gibson, MC. 2015. Decapentaplegic and growth control in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 3.
- Alexandre, C, Baena-Lopez, A, Vincent, J-P. 2014. Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature* 505: 180–5.
- Andersen, DS, Colombani, J, Léopold, P. 2013. Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends Cell Biol.* 23: 336–344.
- Aragona, M, Panciera, T, Manfrin, A, Giulitti, S, Michielin, F, Elvassore, N, Dupont, S, Piccolo, S. 2013. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 154: 1047–1059.
- Badouel, C, Gardano, L, Amin, N, Garg, A, Rosenfeld, R, Le Bihan, T, McNeill, H. 2009. The FERM-domain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Dev. Cell* 16: 411–20.
- Baena-Lopez, LA, Alexandre, C, Mitchell, A, Pasakarnis, L, Vincent, J-P. 2013. Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development* 140: 4818–25.
- Baena-Lopez, LA, Nojima, H, Vincent, J-P. 2012. Integration of morphogen signalling within the growth regulatory network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24: 166–72.
- Baker, NE. 2007. Patterning signals and proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 287–293.
- Banfi, S. 1996. Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching. *Nat. Genet.* 13: 167–174.
- Bate, M, Arias, AM. 1991. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* 112: 755–761.
- Bathgate, R a D, Halls, ML, van der Westhuizen, ET, Callander, GE, Kocan, M, Summers, RJ. 2013. Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol. Rev.* 93: 405–80.
- Bennett, FC, Harvey, KF. 2006. Fat Cadherin Modulates Organ Size in *Drosophila* via the

- Salvador/Warts/Hippo Signaling Pathway. *Curr. Biol.* 16: 2101–2110.
- Bier, E. 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6: 9–23.
- Böhni, R, Riesgo-Escovar, J, Oldham, S, Brogiolo, W, Stocker, H, Andruss, BF, Beckingham, K, Hafen, E. 1999. Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a *Drosophila* Homolog of Vertebrate IRS1--4. *Cell* 97: 865–875.
- Bosveld, F, Bonnet, I, Guirao, B, Tlili, S, Wang, Z, Petitalot, A, Marchand, R, Bardet, P-L, Marcq, P, Graner, F, Bellaiche, Y. 2012. Mechanical Control of Morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-Jointed Planar Cell Polarity Pathway. *Science* (80-.). 336: 724–727.
- Brand, a H, Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401–15.
- Brogiolo, W, Stocker, H, Ikeya, T, Rintelen, F, Fernandez, R, Hafen, E. 2001. An evolutionarily conserved function of the *drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213–221.
- Broughton, S, Partridge, L. 2009. Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem. J.* 418: 1–12.
- Brunet, a, Bonni, a, Zigmond, MJ, Lin, MZ, Juo, P, Hu, LS, Anderson, MJ, Arden, KC, Blenis, J, Greenberg, ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868.
- Bryant, PJ, Levinson, P. 1985. Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev. Biol.* 107: 355–363.
- Bryant, PJ, Simpson, P. 1984. Intrinsic and Extrinsic Control of Growth in Developing Organs. *Q. Rev. Biol.* 59: 387–415.
- Bullough, WS. 1971. The actions of the chalcones. *Agents Actions* 2: 1–7.
- Campbell, S, Inamdar, M, Rodrigues, V, Raghavan, V, Palazzolo, M, Chovnick, a. 1992. The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 6: 367–379.
- Capdevila, J, Guerrero, I. 1994. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* 13: 4459–68.
- Chan, Y-B, Alekseyenko, O V, Kravitz, EA. 2015. Optogenetic Control of Gene Expression in *Drosophila*. *PLoS One* 10: e0138181.
- Cho, E, Feng, Y, Rauskolb, C, Maitra, S, Fehon, R, Irvine, KD. 2006. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat. Genet.* 38: 1142–50.
- Cho, E, Irvine, KD. 2004. Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development* 131: 4489–4500.
- Church, RB, Robertson, FW. 1966. Biochemical analysis of genetic differences in the growth of *Drosophila*. *Genet. Res. (Camb).* 7: 383.
- Colombani, J, Andersen, DS, Boulan, L, Boone, E, Romero, N, Virolle, V, Texada, M, Leopold, P. 2015. *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Curr. Biol.* 25: 2723–2729.
- Colombani, J, Andersen, DS, Léopold, P. 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336: 582–5.
- Colombani, J, Bianchini, L, Layalle, S, Pondeville, E, Dauphin-Villemant, C, Antoniewski, C, Carré, C, Noselli, S, Léopold, P. 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310: 667–70.
- Colombani, J, Raisin, S, Pantalacci, S, Radimerski, T, Montagne, J, Le, P, Valrose, UMRC. 2003. Controls *Drosophila* Growth. 114: 739–749.
- Columbano, a, Shinozuka, H. 1996. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J.*

- 10: 1118–1128.
- Cordenonsi, M, Zanconato, F, Azzolin, L, Forcato, M, Rosato, A, Frasson, C, Inui, M, Montagner, M, Parenti, AR, Poletti, A, Daidone, MG, Dupont, S, Basso, G, Bicciato, S, Piccolo, S. 2011. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147: 759–72.
- Di Cristofano, A, Pandolfi, PP. 2000. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387–390.
- Debat, V, Bloyer, S, Faradji, F, Gidaszewski, N, Navarro, N, Orozco-terWengel, P, Ribeiro, V, Schlötterer, C, Deutsch, JS, Peronnet, F. 2011. Developmental stability: A major role for Cyclin G in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 7.
- Debat, V, Peronnet, F. 2013. Asymmetric flies: the control of developmental noise in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 7: 70–77.
- Demay, Y, Perochon, J, Szuplewski, S, Mignotte, B, Gaumer, S. 2014. The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model. *Cell Death Dis.* 5: e1452.
- Dong, J, Feldmann, G, Huang, J, Wu, S, Zhang, N, Comerford, S a, Gayyed, MF, Anders, R a, Maitra, A, Pan, D. 2007. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130: 1120–33.
- Duan, C. 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: Roles of IGF-binding proteins. *J. Endocrinol.* 175: 41–54.
- Dupont, S, Morsut, L, Aragona, M, Enzo, E, Giulitti, S, Cordenonsi, M, Zanconato, F, Le Digabel, J, Forcato, M, Bicciato, S, Elvassore, N, Piccolo, S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179–83.
- Edgar, BA. 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7: 907–916.
- Eijkelenboom, A, Burgering, BMT. 2013. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 83–97.
- Etournay, R, Popović, M, Merkel, M, Nandi, A, Blasse, C, Aigouy, B, Brandl, H, Myers, G, Salbreux, G, Jülicher, F, Eaton, S. 2015. Interplay of cell dynamics and epithelial tension during morphogenesis of the *Drosophila* pupal wing. *Elife* 4: 1–51.
- Figuroa-Clarevega, A, Bilder, D. 2015. Malignant *Drosophila* Tumors Interrupt Insulin Signaling to Induce Cachexia-like Wasting. *Dev. Cell* 33: 47–55.
- Finkelstein, GP, Lui, JC, Baron, J. 2013. Catch-up growth: Cellular and molecular mechanisms. *World Rev. Nutr. Diet.* 106: 100–104.
- Frei, AP, Jeon, O-Y, Kilcher, S, Moest, H, Henning, LM, Jost, C, Plückthun, A, Mercer, J, Aebersold, R, Carreira, EM, Wollscheid, B. 2012. Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nat. Biotechnol.* 30: 997–1001.
- Garelli, A, Gontijo, AM, Miguela, V, Caparros, E, Dominguez, M. 2012. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336: 579–82.
- Garelli, A, Heredia, F, Casimiro, AP, Macedo, A, Nunes, C, Koyama, T, Gontijo, AM. 2015. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat. Commun.* 6: 1–14.
- Garen, a, Kauvar, L, Lepesant, J a. 1977. Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5099–5103.
- Garofalo, RS. 2002. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 156–162.
- Géminard, C, Rulifson, EJ, Léopold, P. 2009. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metab.* 10: 199–207.
- Genevet, A, Tapon, N. 2011. The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *Biochem. J.*

436: 213–24.

- Genevet, A, Wehr, MC, Brain, R, Thompson, BJ, Tapon, N. 2010. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev. Cell* 18: 300–8.
- Gibbens, YY, Warren, JT, Gilbert, LI, O'Connor, MB. 2011. Neuroendocrine regulation of *Drosophila* metamorphosis requires TGF /Activin signaling. *Development* 138: 2693–2703.
- Giot, L, Bader, JS, Brouwer, C, Chaudhuri, A, Kuang, B, Li, Y, Hao, YL, Ooi, CE, Godwin, B, Vitols, E, Vijayadamodar, G, Pochart, P, Machineni, H, Welsh, M, Kong, Y, Zerhusen, B, Malcolm, R, Varrone, Z, Collis, A, Minto, M, Burgess, S, McDaniel, L, Stimpson, E, Spriggs, F, Williams, J, Neurath, K, Ioime, N, Agee, M, Voss, E, Furtak, K, Renzulli, R, Aanensen, N, Carrola, S, Bickelhaupt, E, Lazovatsky, Y, DaSilva, A, Zhong, J, Stanyon, CA, Finley, RL, White, KP, Braverman, M, Jarvie, T, Gold, S, Leach, M, Knight, J, Shimkets, RA, McKenna, MP, Chant, J, Rothberg, JM. 2003. A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science* (80-.). 302: 1727–1736.
- Gokhale, RH, Shingleton, AW. 2015. Size control: the developmental physiology of body and organ size regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*
- Goulev, Y, Fauny, JD, Gonzalez-Marti, B, Flagiello, D, Silber, J, Zider, A. 2008. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18: 435–41.
- Grönke, S, Clarke, D-F, Broughton, S, Andrews, TD, Partridge, L. 2010. Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genet.* 6: e1000857.
- Hafezi, Y, Bosch, J a, Hariharan, IK. 2012. Differences in levels of the transmembrane protein Crumbs can influence cell survival at clonal boundaries. *Dev. Biol.* 368: 358–69.
- Halder, G, Dupont, S, Piccolo, S. 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 591–600.
- Halme, A, Cheng, M, Hariharan, IK. 2010. Retinoids Regulate a Developmental Checkpoint for Tissue Regeneration in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20: 458–463.
- Hamaratoglu, F, Willecke, M, Kango-Singh, M, Nolo, R, Hyun, E, Tao, C, Jafar-Nejad, H, Halder, G. 2006. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 8: 27–36.
- Harmansa, S, Hamaratoglu, F, Affolter, M, Caussinus, E. 2015. Dpp spreading is required for medial but not for lateral wing disc growth. *Nature* 527: 317–322.
- Harrison, RG. 1924. Some Unexpected Results of the Heteroplastic Transplantation of Limbs. 10: 69–74.
- Harvey, KF, Pflieger, CM, Hariharan, IK. 2003. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114: 457–67.
- Herboso, L, Oliveira, MM, Talamillo, A, Pérez, C, González, M, Martín, D, Sutherland, JD, Shingleton, AW, Mirth, CK, Barrio, R. 2015. Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of Thor in *D. melanogaster*. *Sci. Rep.* 5: 12383.
- Hers, I, Vincent, EE, Tavar??, JM. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 23: 1515–1527.
- Huang, J, Wu, S, Barrera, J, Matthews, K, Pan, D. 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122: 421–34.
- Huang, W, Ma, K, Zhang, J, Qatanani, M, Cuvillier, J, Liu, J, Dong, B, Huang, X, Moore, DD. 2006. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* (80-.). 312: 233–236.
- Ikeya, T, Galic, M, Belawat, P, Nairz, K, Hafen, E. 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth

- regulation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 12: 1293–1300.
- Jaszczak, JS, Wolpe, JB, Dao, AQ, Halme, A. 2015. Nitric Oxide Synthase Regulates Growth Coordination During *Drosophila melanogaster* Imaginal Disc Regeneration. *Genetics* 200: 1219–1228.
- Jia, J, Zhang, W, Wang, B, Trinko, R, Jiang, J. 2003. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev.* 17: 2514–2519.
- Johnston, L a, Sanders, AL. 2003. Wingless promotes cell survival but constrains growth during *Drosophila* wing development. *Nat. Cell Biol.* 5: 827–833.
- Jones, CI, Pashler, AL, Towler, BP, Robinson, SR, Newbury, SF. 2016. RNA-seq reveals post-transcriptional regulation of *Drosophila* insulin-like peptide *dilp8* and the neuropeptide-like precursor *Nplp2* by the exoribonuclease Pacman/XRN1. *Nucleic Acids Res.* 44: 267–280.
- Justice, RW, Zilian, O, Woods, DF, Noll, M, Bryant, PJ. 1995. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* 9: 534–546.
- Kam, I, Lynch, S, Svanas, G, Todo, S, Polimeno, L, Francavilla, A, Penkrot, RJ, Takaya, S, Ericzon, BG, Starzl, TE. 1987. Evidence that host size determines liver size: Studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* 7: 362–366.
- Kango-Singh, M. 2002. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* 129: 5719–5730.
- Katsuyama, T, Comoglio, F, Seimiya, M, Cabuy, E, Paro, R. 2015. During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 201423074.
- Külshammer, E, Mundorf, J, Kilinc, M, Frommolt, P, Wagle, P, Uhlirova, M. 2015. Interplay among *Drosophila* transcription factors Ets21c, Fos and Ftz-F1 drives JNK-mediated tumor malignancy. *Dis. Model. Mech.* 8: 1279–1293.
- Kwon, Y, Song, W, Droujinine, IA, Hu, Y, Asara, JM, Perrimon, N. 2015. Systemic Organ Wasting Induced by Localized Expression of the Secreted Insulin/IGF Antagonist ImpL2. *Dev. Cell* 33: 36–46.
- Lai, Z-C, Wei, X, Shimizu, T, Ramos, E, Rohrbaugh, M, Nikolaidis, N, Ho, L-L, Li, Y. 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120: 675–685.
- Lawrence, P a, Morata, G. 1976. Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev. Biol.* 50: 321–337.
- Lecuit, T, Brook, WJ, Ng, M, Calleja, M, Sun, H, Cohen, SM. 1996. Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* 381: 387–393.
- Lee, C-Y, Cooksey, B a K, Baehrecke, EH. 2002. Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 250: 101–111.
- LeGoff, L, Rouault, H, Lecuit, T. 2013. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development* 140: 4051–4059.
- Liu, JP, Baker, J, Perkins, JA, Robertson, EJ, Efstratiadis, A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59–72.
- Lui, JC, Baron, J. 2011. Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr. Rev.* 32: 422–440.
- Lui, JC, Forcinito, P, Chang, M, Chen, W, Barnes, KM, Baron, J. 2010. Coordinated postnatal down-regulation of multiple growth-promoting genes: evidence for a genetic program

- limiting organ growth. *FASEB J.* 24: 3083–92.
- Maki, RG. 2010. Small is beautiful: Insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J. Clin. Oncol.* 28: 4985–4995.
- Mandaravally Madhavan, M, Schneiderman, HA. 1977. Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 183: 269–305.
- Martin, F a, Morata, G. 2006. Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 133: 4421–4426.
- Martin, PF. 1982. Direct determination of the growth rate of *Drosophila* imaginal discs. *J. Exp. Zool.* 222: 97–102.
- Matakatsu, H, Blair, SS. 2004. Interactions between Fat and Dachshaus and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development* 131: 3785–3794.
- Mateus, R, Lourenco, R, Fang, Y, Brito, G, Farinho, A, Valerio, F, Jacinto, A. 2015. Control of tissue growth by Yap relies on cell density and F-actin in zebrafish fin regeneration. *Development* 142: 2752–2763.
- Maugh, TH. 1972. Chalmers: Chemical Regulation of Cell Division. *Science* (80-). 176: 1407–1408.
- McBrayer, Z, Ono, H, Shimell, M, Parvy, JP, Beckstead, RB, Warren, JT, Thummel, CS, Dauphin-Villemant, C, Gilbert, LI, O'Connor, MB. 2007. Prothoracicotropic Hormone Regulates Developmental Timing and Body Size in *Drosophila*. *Dev. Cell* 13: 857–871.
- McPherron, AC, Lawler, AM, Lee, S-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387: 83–90.
- Meissner, GW, Luo, SD, Dias, BG, Texada, MJ, Baker, BS. 2016. Sex-specific regulation of *Lgr3* in *Drosophila* neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016: 201600241.
- Meng, Z, Moroishi, T, Mottier-Pavie, V, Plouffe, SW, Hansen, CG, Hong, AW, Park, HW, Mo, J-S, Lu, W, Lu, S, Flores, F, Yu, F-X, Halder, G, Guan, K-L. 2015. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat. Commun.* 6: 8357.
- Meserve, JH, Duronio, RJ. 2015. Scalloped and Yorkie are required for cell cycle re-entry of quiescent cells after tissue damage. *Development*: 2740–2751.
- Michalopoulos, GK. 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J* 4: 176–187.
- Mihaylova, MM, Vasquez, DS, Ravnskjaer, K, Denechaud, PD, Yu, RT, Alvarez, JG, Downes, M, Evans, RM, Montminy, M, Shaw, RJ. 2011. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145: 607–621.
- Mo, J-S, Park, HW, Guan, K-L. 2014. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.*: 1–15.
- Morata, G, Ripoll, P. 1975. Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* 42: 211–221.
- Nakae, Kido, Accili, Physicians, C, Columbia, S. 2001. Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. 22: 818–835.
- Nässel, DR, Broeck, J Vanden. 2015. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Nellen, D, Burke, R, Struhl, G, Basler, K. 1996. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *TL - 85. Cell* 85 VN - r: 357–368.
- Nelliot, A, Bond, N, Hoshizaki, DK. 2006. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *genesis* 44: 396–400.
- Neto-Silva, RM, de Beco, S, Johnston, L a. 2010. Evidence for a growth-stabilizing

- regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the *Drosophila* homolog of Yap. *Dev. Cell* 19: 507–20.
- Neto-Silva, RM, Wells, BS, Johnston, LA. 2009. Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 197–220.
- Neufeld, TP, de la Cruz, a F, Johnston, L a, Edgar, B a. 1998. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93: 1183–1193.
- Nienhaus, U, Aegerter-Wilmsen, T, Aegerter, CM. 2012. In-vivo imaging of the *Drosophila* wing imaginal disc over time: novel insights on growth and boundary formation. *PLoS One* 7: e47594.
- Nijhout, HF. 2003. The control of growth. *Development* 130: 5863–7.
- Nodder, S, Martin, P. 1996. Wound healing in embryos: a review. *Anat. Embryol. (Berl)*. 195: 215–228.
- Oldham, S, Hafen, E. 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: A TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13: 79–85.
- Pan, D. 2007. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.* 21: 886–897.
- Parker, NF, Shingleton, AW. 2011. The coordination of growth among *Drosophila* organs in response to localized growth-perturbation. *Dev. Biol.* 357: 318–25.
- Partridge, L, Alic, N, Bjedov, I, Piper, MDW. 2011. Ageing in *Drosophila*: The role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp. Gerontol.* 46: 376–381.
- Partridge, L, Gems, D. 2002. The evolution of longevity. *Curr. Biol.* 12: 544–546.
- Pickeral, OK, Li, JZ, Barrow, I, Boguski, MS, Makalowski, W, Zhang, J. 2000. Classical Oncogenes and Tumor Suppressor Genes: A Comparative Genomics Perspective. *Neoplasia* 2: 280–286.
- St. Pierre, SE, Ponting, L, Stefancsik, R, McQuilton, P. 2014. FlyBase 102 - Advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* 42: 780–788.
- Polesello, C, Huelsmann, S, Brown, N, Tapon, N. 2006. The *Drosophila* RASSF Homolog Antagonizes the Hippo Pathway. *Curr. Biol.* 16: 2459–2465.
- Poltilove, RM, Jacobs, a R, Haft, CR, Xu, P, Taylor, SI. 2000. Characterization of *Drosophila* insulin receptor substrate. *J. Biol. Chem.* 275: 23346–54.
- Poss, KD, Shen, J, Keating, MT. 2000. Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev. Dyn.* 219: 282–286.
- Puig, O, Marr, MTM, Ruhf, ML, Tjian, R. 2003. Control of cell number by *Drosophila* FOXO : downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev.* 17: 2006–2020.
- Puig, O, Tjian, R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO / FOXO1. *Genes Dev.*: 2435–2446.
- Reginensi, A, Scott, RP, Gregorieff, A, Bagherie-Lachidan, M, Chung, C, Lim, DS, Pawson, T, Wrana, J, McNeill, H. 2013. Yap- and Cdc42-Dependent Nephrogenesis and Morphogenesis during Mouse Kidney Development. *PLoS Genet.* 9.
- Reiter, LT, Potocki, L, Chien, S, Gribskov, M, Bier, E. 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In. *Genome Res.*: 1114–1125.
- Ren, F, Zhang, L, Jiang, J. 2010. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* 337: 303–312.
- Restrepo, S, Zartman, JJ, Basler, K. 2014. Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol.* 24: R245–R255.
- Rewitz, KF, Yamanaka, N, Gilbert, LI, O'Connor, MB. 2009. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science* 326: 1403–1405.
- Rewitz, KF, Yamanaka, N, O'Connor, MB. 2013. Developmental checkpoints and feedback

- circuits time insect maturation. 1-33 p.
- Riddiford, LM, Truman, JW, Mirth, CK, Shen, Y -c. 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development* 137: 1117–1126.
- Rivera-Pomar, R, Jacki, H. 1996. From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet.* 12: 478–483.
- Rogulja, D, Rauskolb, C, Irvine, KD. 2008. Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev. Cell* 15: 309–21.
- Roselló-Díez, A, Joyner, AL. 2015. Regulation of long bone growth in vertebrates; it is time to catch-up. *Endocr. Rev.* 36: er.2015–1048.
- Rulifson, EJ, Kim, SK, Nusse, R. 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296: 1118–1120.
- Rusten, TE, Lindmo, K, Juhász, G, Sass, M, Seglen, PO, Brech, A, Stenmark, H. 2004. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K Pathway. *Dev. Cell* 7: 179–192.
- Schmelzle, T, Hall, MN. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253–262.
- Schubiger, M, Palka, J. 1987. Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 123: 145–153.
- Schwank, G, Restrepo, S, Basler, K. 2008. Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development* 135: 4003–4013.
- Schwank, G, Tauriello, G, Yagi, R, Kranz, E, Koumoutsakos, P, Basler, K. 2011. Antagonistic Growth Regulation by Dpp and Fat Drives Uniform Cell Proliferation. *Dev. Cell* 20: 123–130.
- Scott, RC, Schuldiner, O, Neufeld, TP. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* 7: 167–178.
- Sharpey-Schäfer, EA. 1916. The endocrine organs; an introduction to the study of internal secretion, by Sir Edward A. Schäfer. London, Longmans, Green, and co., 178 p.
- Simpson, P, Berreur, P, Berreur-Bonnenfant, J. 1980. The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57: 155–165.
- Simpson, P, Morata, G. 1980. The control of growth in the imaginal discs of *Drosophila*. *Basic Life Sci.* 16: 129–139.
- Sing, A, Tsatskis, Y, Fabian, L, Hester, I, Rosenfeld, R, Serricchio, M, Yau, N, Bietenhader, M, Shanbhag, R, Jurisicova, A, Brill, J a, McQuibban, GA, McNeill, H. 2014. The atypical cadherin fat directly regulates mitochondrial function and metabolic state. *Cell* 158: 1293–308.
- Smith-Bolton, RK, Worley, MI, Kanda, H, Hariharan, IK. 2009. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev. Cell* 16: 797–809.
- Steinhardt, AA, Gayyed, MF, Klein, AP, Dong, J, Maitra, A, Pan, D, Montgomery, EA, Anders, RA. 2008. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum. Pathol.* 39: 1582–1589.
- Stieper, BC, Kupershtok, M, Driscoll, M V., Shingleton, AW. 2008. Imaginal discs regulate developmental timing in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 321: 18–26.
- Stocker, H, Andjelkovic, M, Oldham, S, Laffargue, M, Wymann, MP, Hemmings, B a, Hafen, E. 2002. Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science* 295: 2088–2091.
- Stocker, H, Hafen, E. 2000. Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 529–535.
- Tamemoto, H, Kadowaki, T, Tobe, K, Yagi, T, Sakura, H, Hayakawa, T, Terauchi, Y, Ueki, K, Kaburagi, Y, Satoh, S, Sekihara, H, Yoshioka, S, Horikoshi, H, Furuta, Y, Ikawa, Y, Kasuga, M, Yazaki, Y, Aizawa, S. 1994. Insulin resistance and growth retardation in

- mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182–186.
- Tapon, N, Harvey, KF, Bell, DW, Wahrer, DCR, Schiripo, T a., Haber, D a., Hariharan, IK. 2002. salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110: 467–478.
- Taylor, SI, Arioglu, E. 1999. Genetically defined forms of diabetes in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 4390–4396.
- Teleman, AA. 2010. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem. J.* 425: 13–26.
- Teleman, AA, Chen, YW, Cohen, SM. 2005. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev.* 19: 1844–1848.
- Teleman, AA, Cohen, SM. 2000. Dpp Gradient Formation in the *Drosophila* Wing Imaginal Disc. *Cell* 103: 971–980.
- Thomas, C, Strutt, D. 2012. The roles of the cadherins Fat and Dachshous in planar polarity specification in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 241: 27–39.
- Thomas, M, Langley, B, Berry, C, Sharma, M, Kirk, S, Bass, J, Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275: 40235–40243.
- Twitty, VC, Schwind, JL. 1931. The growth of eyes and limbs transplanted heteroplastically between two species of *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.* 59: 61–86.
- Uygur, A, Lee, RT. 2016. Mechanisms of Cardiac Regeneration. *Dev. Cell* 36: 362–374.
- del Valle Rodríguez, A, Didiano, D, Desplan, C. 2012. Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* 9: 47–55.
- Vallejo, DM, Juarez-Carreño, S, Bolivar, J, Morante, J, Dominguez, M. 2015. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science*: 1–16.
- Wang, X, Chen, X, Yang, Y. 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat. Methods* 9: 266–269.
- Warren, JT, Yerushalmi, Y, Shimell, MJ, O'Connor, MB, Restifo, LL, Gilbert, LI. 2006. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: Correlations with changes in gene activity. *Dev. Dyn.* 235: 315–326.
- Wehr, MC, Holder, M V, Gailite, I, Saunders, RE, Maile, TM, Ciirdaeva, E, Instrell, R, Jiang, M, Howell, M, Rossner, MJ, Tapon, N. 2013. Salt-inducible kinases regulate growth through the Hippo signalling pathway in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 15: 61–71.
- Weinkove, D, Leever, SJ. 2000. The genetic control of organ growth: Insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 75–80.
- White, MF. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40: 2–17.
- Willecke, M, Hamaratoglu, F, Sansores-Garcia, L, Tao, C, Halder, G. 2008. Boundaries of Dachshous Cadherin activity modulate the Hippo signaling pathway to induce cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 14897–14902.
- Withers, DJ, Gutierrez, JS, Towery, H, Burks, DJ, Ren, J, Previs, S, Zhang, Y, Bernal, D, Pons, S, Shulman, GI, Bonner-weir, S, White, MF, Hughes, H. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. 391.
- Wu, S, Huang, J, Dong, J, Pan, D. 2003. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114: 445–56.
- Xu, T, Rubin, GM. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223–1237.
- Yimlamai, D, Christodoulou, C, Galli, GG, Yanger, K, Pepe-Mooney, B, Gurung, B, Shrestha, K, Cahan, P, Stanger, BZ, Camargo, FD. 2014. Hippo Pathway Activity

- Influences Liver Cell Fate. *Cell* 157: 1324–1338.
- Yin, F, Yu, J, Zheng, Y, Chen, Q, Zhang, N, Pan, D. 2013. Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2. *Cell*: 1–14.
- Yu, F-X, Zhao, B, Guan, K-L. 2015. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163: 811–828.
- Yu, F-X, Zhao, B, Panupinthu, N, Jewell, JL, Lian, I, Wang, LH, Zhao, J, Yuan, H, Tumaneng, K, Li, H, Fu, X-D, Mills, GB, Guan, K-L. 2012. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 150: 780–91.
- Yu, FX, Guan, KL. 2013. The Hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes Dev.* 27: 355–371.
- Zhao, B, Li, L, Lu, Q, Wang, LH, Liu, CY, Lei, Q, Guan, KL. 2011a. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 25: 51–63.
- Zhao, B, Tumaneng, K, Guan, K-L. 2011b. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 13: 877–83.
- Zhao, B, Wei, X, Li, W, Udan, RS, Yang, Q, Kim, J, Xie, J, Ikenoue, T, Yu, J, Li, L, Zheng, P, Ye, K, Chinnaiyan, A. 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. 2747–2761.
- Zhao, B, Ye, X, Yu, J, Li, L, Li, W, Li, S, Yu, J, Lin, JD. 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.*: 1962–1971.
- Ziosi, M, Baena-López, LA, Grifoni, D, Frolidi, F, Pession, A, Garoia, F, Trotta, V, Bellosta, P, Cavicchi, S, Pession, A. 2010. dMyc functions downstream of Yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant cells. *PLoS Genet.* 6: e1001140.