



**HAL**  
open science

# Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la *Drosophile*

Rihab Loudhaief

► **To cite this version:**

Rihab Loudhaief. Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la *Drosophile*. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. ⟨NNT : 2016AZUR4054⟩. ⟨tel-01674214⟩

**HAL Id: tel-01674214**

**<https://theses.hal.science/tel-01674214v1>**

Submitted on 2 Jan 2018

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.



HAL Authorization

**Université Nice Sophia Antipolis UFR Sciences**  
**Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé**

**THESE**

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de l'Université Nice Sophia Antipolis

**Discipline : Sciences de la vie (aspects moléculaires et cellulaires de la biologie)**

Présentée et soutenue par

**Rihab LOUDHAIEF**

Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile

Thèse dirigée par Dr Armel GALLET

**Soutenue publiquement le 07 septembre 2016 devant un jury composé de :**

<b>POIRIE Marylène</b>	Professeur Uni. Nice Sophia Antipolis	Présidente
<b>CHARROUX Bernard</b>	Directeur de recherche CNRS	Rapporteur
<b>GERARD Philippe</b>	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
<b>LERECLUS Didier</b>	Directeur de recherche INRA	Examineur
<b>DELANOUE Rénaud</b>	Chargé de recherche INSERM	Examineur
<b>PERRIN Laurent</b>	Directeur de recherche CNRS	Examineur
<b>GALLET Armel</b>	Directeur de recherche CNRS	Directeur de thèse







## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres de jury Marylène Poirié, Philippe Gérard, Bernard Charroux, Didier Lereclus, Rénald Delanoue, Laurent Perrin et mon directeur Arnel Gallet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci de m'avoir fait l'honneur de lire et évaluer mon manuscrit. Un grand merci à mes deux rapporteurs Bernard Charroux et Philippe Gérard d'avoir accepté d'évaluer ma thèse surtout dans cette période de vacances.

Un grand merci à mon directeur de thèse Arnel Gallet pour m'avoir cadrée et formée durant ces 4 ans de thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris scientifiquement et humainement. T'es l'exemple du « chercheur » pour moi et tu le resteras toujours... Merci pour ta grande disponibilité, ta gentillesse, ton exigence qui me fait râler... et ta bonne humeur qui rend le travail avec toi de plus en plus agréable. Merci d'avoir supporté mes questions brutales que je pose sans réfléchir que t'es entrain de bosser et que ça peut te gêner...

J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres de l'équipe. Marcel, je ne peux pas oublier que mon expérience dans l'équipe a débuté avec toi. Merci d'avoir accepté de m'accueillir dans l'équipe et de m'encadrer pour mon stage de master. Merci pour toutes les discussions scientifiques et philosophiques que t'as partagé avec moi... Merci pour tes blagues que je ne les ai jamais comprises... Marcel et Arnel, c'était juste agréable et très enrichissant de partager le bureau avec vous ! Vous allez me manquer... Olivia, Marie Paule et Alexandra, je voulais dire que c'était très agréable de travailler avec vous ! Merci pour votre participation à mes travaux de thèse, pour votre soutien moral continu et votre gentillesse ! Merci pour tout le temps que vous m'avez accordé, qui parfois, retarde vos expérimentations... J'étais bien chouchoutée et je suis très reconnaissante. Je vous aime beaucoup les filles ! David, c'était vraiment très enrichissant de travailler et discuter avec toi. J'ai beaucoup appris de toi... Généralement on n'aime pas les critiques, mais tu m'as appris que le chercheur doit accepter les critiques pour qu'il puisse avancer et tu m'as appris comment défendre mon travail ! Merci ! Isabelle, je voulais te dire que t'es quelqu'un d'agréable et j'espère de tout mon cœur que tu retrouves ta forme pour revenir faire ce que tu aimes faire. Ton poussin rose que tu m'as offert me fait penser à toi tous les jours. Saches que je pense à toi et que je prie tous les jours pour que tu retrouves ta forme.

Aux filles les plus sympathiques de l'étage, Marion, Nathalie et Pascaline, merci pour tous les beaux moments qu'on a pu partager. Merci pour vos encouragements et pour le soutien moral que vous m'avez apporté. Pascaline, je garderai en mémoire nos rigolades et nos discussions surtout dans la pièce droso. Merci Droso, c'est grâce à elle qu'on a sympathisé... Marion, si seulement je t'ai

connu avant... En tout cas, quelques mois étaient suffisants pour que je m'attache beaucoup à toi...ça sera dur le départ !

Elodie et Marie, merci pour vos encouragements surtout durant ces derniers mois. Félicitations Marie et tiens bon Elodie c'est bientôt la fin !

A mes chères copines Julie, Carolina, Isabelle, Abbla et Cristina, j'ai vraiment de la chance de rencontrer des personnes agréables comme vous pendant ces quatre ans et demi dans l'institut. Merci pour toutes les aventures qu'on a pu vivre ensemble, pour toutes les discussions de filles qui épissaient nos rencontres et pour votre soutien continu.

A mon jumeau d'âme Wiem, 24 ans d'amitié et t'es toujours avec moi dans les beaux moments et les plus difficiles, même à distance ! Un énorme merci et tiens bon c'est bientôt la fin pour toi aussi ! Je t'aime beaucoup ma chère.

Sabrin, Rihab, Giji et Anissa, mes chères copines, merci pour vos encouragements continus et votre pression pour que je finisse aussi...

A ma famille,

Ma grand-mère, mes tantes et mes oncles, mes cousines et cousins, ma belle-famille, merci pour votre soutien continu et vos encouragements.

Mes chères sœurs et mes chers frères, sans vous je n'aurais pas pu supporter la pression et le stress... Merci pour tout !

Mon papa, merci pour tout ce que t'as fait pour moi et merci d'avoir supporté mon stress et mon caractère un peu pénible cette dernière période.

A la maman la plus chère du monde, Kabiba, si je suis arrivée à réaliser mon rêve, saches que c'est grâce à toi... T'es la meilleure maman qui peut exister sur terre, merci pour tous les sacrifices et les prières... Je t'aime maman...

A mon cher mari, l'homme de ma vie, c'est parmi les plus belles preuves d'amour, c'est de supporter toutes ces années de distance pour que je puisse réaliser mon rêve... Ta présence dans ma vie m'a donné beaucoup de courage et de joie pour que je vive ma thèse comme un plaisir et pas comme une contrainte ! Merci mon homme je t'aime beaucoup !



Cette thèse a été effectuée au sein de l'institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRA, Université de Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 1355-7254. Les travaux de recherche ont été faits dans l'équipe Bioinsecticides, Environnement et Santé (BES) sous la direction de Dr. GALLET Armel.

La thèse a été financée par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (pour trois ans) et par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) pour la quatrième année.



# Résumé

Les biopesticides sont appelés à supplanter les pesticides chimiques et sont de fait de plus en plus utilisés. Parmi ces biopesticides, la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) représente 70% du total des ventes. *Bt* est une bactérie Gram<sup>+</sup> sporulante qui produit, pendant la sporulation, des toxines nommées Cry. Parmi les différentes souches de *Bt*, certaines ont été sélectionnées pour leur spécificité d'action contre des nuisibles et sont commercialisées sous forme de sporanges. La souche *Bt kurstaki* (*Btk*) est le biopesticide le plus utilisé en agriculture biologique en France et l'accroissement de son utilisation fait qu'elle est de plus en plus présente dans la nourriture, source de contamination potentielle pour l'homme et l'environnement. Chez les mammifères, il est reconnu que la présence de bactéries opportunistes dans l'intestin peut être à l'origine d'un état inflammatoire pouvant aboutir au développement de cancers chez des individus génétiquement prédisposés. *Bt* est aussi connu comme bactérie opportuniste humaine, responsable, entre autres, de maladies nosocomiales avec complications respiratoires ou de diarrhées suite à une intoxication alimentaire. Ces données suggèrent qu'une utilisation intensive des biopesticides *Btk* pourrait avoir une incidence sur la santé publique et l'environnement.

Mon projet de thèse a consisté en l'étude des conséquences de l'ingestion de *Btk* (sous forme végétative ou de sporanges) aux doses d'épandage sur la physiologie intestinale en utilisant la drosophile comme système modèle. La drosophile n'est pas sensible à *Btk* en termes de toxicité aigüe ce qui nous permet d'étudier les effets non intentionnels de ce biopesticide. La conservation entre la drosophile et les vertébrés des mécanismes régissant les grandes fonctions intestinales permettra ensuite de rapidement aborder les mêmes questions chez les mammifères. Ainsi, chez la drosophile comme chez les mammifères, il y a quatre types de cellules dans l'intestin : cellules souches, cellules progénitrices, cellules absorbantes (entérocytes) et cellules sécrétrices (dont les cellules entéro-endocrines) et leur homéostasie est similaire chez tous ces organismes. Chez la drosophile, l'ingestion de fortes doses de bactéries opportunistes ou de pathogènes induit l'apoptose des entérocytes. Cette apoptose stimule la prolifération des cellules souches intestinales pour remplacer les entérocytes mourants. Ce modèle est appelé «mort cellulaire régénératrice». Dans le cadre de ma thèse, j'ai montré que l'ingestion de la bactérie *Btk* végétative à des doses d'épandage (doses faibles comparées à celles utilisées dans les études décrivant le modèle de mort cellulaire

régénératrice) n'induit pas de mort cellulaire dans l'épithélium intestinal bien qu'induisant modérément la prolifération des cellules souches intestinales. Les cellules progénitrices issues de la division asymétrique des cellules souches intestinales se différencient en entérocytes. Ces derniers s'accumulent dans l'intestin ce qui conduit à une perturbation de l'homéostasie intestinale. Cette perturbation reste transitoire car l'intestin rétablit la densité cellulaire normale suite à l'activation de la voie de signalisation Hippo qui induit l'apoptose des entérocytes surnuméraires. Ces résultats m'ont permis d'établir un modèle de réponse physiologique à un stress modéré différent du modèle de mort cellulaire régénératrice. Ce nouveau mécanisme que j'ai identifié se produit sans doute bien plus fréquemment au cours de la vie de l'individu car il est plus probable d'ingérer de faibles doses de bactéries que de fortes doses.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai montré que l'ingestion des sporanges de *Btk* active la prolifération des cellules souches intestinales mais aussi une forte apoptose des entérocytes. L'apoptose semble être liée aux toxines Cry présentes dans les sporanges de *Btk*. En effet l'ingestion de toxines purifiées est suffisante pour induire cette apoptose. De plus, à la différence de la forme végétative qui induit une accumulation transitoire des entérocytes, les sporanges de *Btk* induisent plutôt une augmentation du nombre de cellules entéro-endocrines.

Mes travaux de thèse montrent que l'ingestion de *Btk* aux doses utilisées en agriculture perturbe l'équilibre physiologique de l'intestin et qu'une ingestion chronique de ce biopesticide peut affecter la longévité des drosophiles. La poursuite de ces travaux devrait permettre une évaluation des risques consécutifs à une exposition aux biopesticides *Btk*, et pourrait découler sur des mesures préventives et curatives tant pour les utilisateurs que pour les consommateurs. De plus mes travaux de thèses vont enrichir nos connaissances fondamentales sur les mécanismes physiologiques du maintien de l'homéostasie intestinale.

# Table des matières

Résumé.....	9
Table des matières.....	11
Liste des figures.....	13
Liste des publications.....	15
Liste des abréviations.....	16
Partie I: Introduction.....	20
Chapitre I.....	21
Les bioinsecticides à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	21
I-1 Définition et utilisation.....	22
I-2 Mode d'action sur les cibles.....	28
I-3 Persistance de <i>Bt</i> dans l'environnement.....	30
I-4 Effets non intentionnels.....	31
Chapitre II.....	35
Risques d'intoxications alimentaires.....	35
par <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	35
II-1 <i>Bacillus thuringiensis</i> : un membre du groupe de <i>Bacillus cereus</i> .....	36
II-2 Détection de <i>Bacillus thuringiensis</i> dans des cas d'intoxications alimentaires.....	36
II-3 Exemple du bioinsecticide <i>Btk</i> et risques d'intoxication.....	37
II-4 L'intestin: un milieu propice pour <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	38
Chapitre III.....	41
<i>Drosophila melanogaster</i> comme modèle pour étudier les effets de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur l'intestin.....	41
III-1 Choix du modèle.....	42
III-2 L'intestin de la drosophile.....	46
III-3 Homéostasie cellulaire intestinale.....	51
III-4 Réponses intestinales aux intoxications bactériennes.....	69
III-4-1 Réponse immunitaire locale.....	69
III-4-2 Accélération de la régénération intestinale.....	72
III-4-3 Impact des bactéries non pathogènes sur l'intestin.....	75
III-4-4 Impact des bactéries pathogènes sur l'intestin.....	75
III-5 JNK et Hippo: deux voies de signalisation clés pour le maintien de l'homéostasie....	79
III-5-1 La voie de signalisation JNK.....	79
III-5-2 La voie de signalisation Hippo.....	82

III-6 Conséquences physiologiques de la perturbation de l'homéostasie intestinale.....	85
Chapitre IV .....	88
Objectifs de la thèse : Etude des effets de <i>Btk</i> sur la physiologie intestinale.....	88
Partie II: Résultats et discussion.....	91
Chapitre I.....	92
Effets de <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> ( <i>Btk</i> ) sur la physiologie intestinale.....	92
I-1 Méthode standardisée d'intoxication des drosophiles.....	93
I-2 Effets de la bactérie <i>Btk</i> sur la physiologie intestinale .....	94
I-2-1 Résumé .....	94
I-2-2 Article Loudhaief et al., 2016.....	96
I-3 Effets des sporanges <i>Btk</i> et leurs toxines sur la physiologie intestinale.....	145
I-3-1 Effets des sporanges <i>Btk</i> sur l'homéostasie cellulaire intestinale .....	146
I-3-2 Effets d'une intoxication chronique par les sporanges de <i>Btk</i> sur la longévité.....	152
I-4 Discussion.....	155
Chapitre II .....	158
Rôles de la voie de signalisation JNK dans les entérocytes .....	158
II-1 JNK : apoptose versus cytoprotection.....	159
II-2 Discussion .....	165
Chapitre III .....	169
Une nouvelle population de cellules intestinales chez la drosophile ? .....	169
III-1 Des ISC, des EB, des ECs, des ee, mais pas que .....	170
III-2 Nouvelle population de cellules souches intestinales? .....	177
III-3 Discussion .....	182
Partie III: Conclusions et perspectives .....	186
Annexe .....	190
I- Protocole de culture bactérienne.....	191
II- Protocole de production de sporanges de <i>Btk</i> .....	192
III- Site de fixation de Cry1Ab : analyse de l'homologie de séquence.....	193
IV- Revue 2: Loudhaief and Gallet .....	195
Références bibliographiques .....	197

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : <i>Bacillus thuringiensis</i> : Aspect et cycle de vie .....	22
<b>Figure 2</b> : Schéma illustrant les cibles des $\delta$ -endotoxines produites par <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	24
<b>Figure 3</b> : Schéma décrivant le devenir des sporanges de <i>Bt</i> et des toxines Cry dans l'intestin des cibles.....	28
<b>Figure 4</b> : Schémas du cycle de vie de la drosophile et des outils génétiques utilisés.....	42
<b>Figure 5</b> : Schémas illustrant le tractus digestif de la drosophile et comparaison avec celui des mammifères.....	46
<b>Figure 6</b> : Schémas décrivant l'épithélium intestinal et les jonctions épithéliales intestinales chez la drosophile et chez les mammifères.....	48
<b>Figure 7</b> : Schéma décrivant les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire locale de la drosophile.....	70
<b>Figure 8</b> : Schéma illustrant les voies de signalisation contrôlant le renouvellement intestinal de la drosophile suite à une agression intestinale par des bactéries allochtones.....	73
<b>Figure 9</b> : Schéma résumant les conséquences d'une intoxication soit par des bactéries pathogènes soit par de fortes doses de bactéries non pathogènes sur l'homéostasie intestinale.....	76
<b>Figure 10</b> : Schéma de la voie de signalisation JNK au niveau des entérocytes chez la drosophile.....	80
<b>Figure 11</b> : Schéma décrivant le rôle de la voie de signalisation Hippo dans les différentes cellules intestinales.....	83
<b>Figure 12</b> : Schéma décrivant les conséquences de la dysbiose chez l'être humain.....	87
<b>Figure 13</b> : Effets des sporanges de <i>Btk</i> sur l'homéostasie cellulaire intestinale-1.....	147
<b>Figure 14</b> : Effets des sporanges de <i>Btk</i> sur l'homéostasie cellulaire intestinale-2.....	149
<b>Figure 15</b> : Effets des sporanges de <i>Btk</i> sur la différenciation des cellules intestinales.....	151
<b>Figure 16</b> : Effets des sporanges de <i>Btk</i> et des toxines Cry sur la longévité des Drosophiles.....	154
<b>Figure 17</b> : Conséquences de l'activation de la voie de signalisation JNK dans l'intestin.....	160

<b>Figure 18</b> : Conséquences de l'inhibition de la voie de signalisation JNK en utilisant les drosophiles <i>myoIA<sup>ts</sup>GFP&gt;puc</i> .....	162
<b>Figure 19</b> : Conséquences de l'inhibition de la voie de signalisation JNK en utilisant les drosophiles <i>myoIA<sup>ts</sup>GFP&gt;bsk<sup>DN</sup></i> .....	164
<b>Figure 20</b> : Modèle proposé décrivant les différents rôles pouvant être assurés par la voie de signalisation JNK dans les entérocytes.....	168
<b>Figure 21</b> : Identification de petites cellules intestinales <i>esg<sup>-</sup> pros</i> .....	172
<b>Figure 22</b> : Schéma décrivant les différents types cellulaires de la crypte intestinale chez les mammifères, leurs positions, leurs fonctions et leurs propriétés.....	173
<b>Figure 23</b> : <i>psc</i> : un marqueur pour de petites cellules intestinales.....	175
<b>Figure 24</b> : <i>psc</i> : un marqueur pour de petites cellules <i>esg<sup>-</sup> pros<sup>-</sup></i> .....	177
<b>Figure 25</b> : Division cellulaire à 3h post-ingestion des bactéries.....	179
<b>Figure 26</b> : Cellules intestinales <i>psc+</i> et division cellulaire.....	181

# Liste des publications

**Revue 1:** *"The cellular homeostasis of the gut: what the Drosophila model points out"*. Histol. Histopathol. 2015. Matthieu Y. Pasco, Rihab Loudhaief. and Armel Gallet.....51

**Article:** *"Apoptosis restores cellular density in the Drosophila midgut by eliminating the excess of enterocytes physiologically or genetically induced"*. (Soumis à Development)

Rihab Loudhaief, Alexandra Brun-Barale, Olivia Benguettat, Marie-Paule Nawrot-Esposito, David Pauron, Marcel Amichot, and Armel Gallet.....98

**Revue 2:** *"Enteroendocrine cells, a potential therapeutic way to control intestinal stem cell proliferation"*. (Sous presse à International Journal of Stem Cell Research & Therapy)

Rihab Loudhaief and Armel Gallet.....195

# Liste des abréviations

**Arm:** Armadillo

**β-Gal:** β-Galactosidase

**Bsk:** Basket

**Bsk<sup>DN</sup>:** Basket dominat négatif

**Bt:** *Bacillus thuringiensis*

**Bta:** *Bacillus thuringiensis aizawai*

**Bti:** *Bacillus thuringiensis israelensis*

**Btk:** *Bacillus thuringiensis kurstaki*

**CFU:** Clony forming unit

**Cry:** Crystal (Crystal toxins)

**Cyt K:** Cytokine K

**DDT:** Insecticide dichloro-diphényl-trichloroéthane

**DI:** Delta

**Diap:** Death-associated inhibitor of apoptosis

**Dpp:** Decapentaplegic

**Duox:** Dual oxydase

**EB:** entéroblaste

**EC:** enterocyte

**E-cad:** cadhérine épithéliale

**Ecc:** *Erwinia carotovora crotovora*

**ee:** cellule entéro-endocrine

**Esg:** Escargot (marqueur des cellules souches intestinales)

**Ex:** expanded

**FRT:** Flipase recognition target

**FLP:** Flipase (recombinase)

**Gbb:** glass bottom boat

**GFP:** Green fluorescent protein

**HBL:** Hémolysine BL

**Hep:** Hemipterous

**Hpo:** Hippo

**ISC:** cellule souche intestinale

**IMD:** Immune deficiency

**JNK:** Jun N-terminal Kinase

**JA:** Jonctions adhérentes

**Krn:** keren

**Lgr5:** Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor-5

**Myo1A:** Myosine 1A

**MV:** muscle viscéral

**N:** Notch

**NHE:** Entérotoxine non hémolytique

**OGM:** Organisme génétiquement modifié

**PAM:** Peptide anti-microbien

**PGRP:** Peptidoglycan recognition protein

**Pe:** *Pseudomonas entomophila*

**Pros:** Prospero

**PSC:** Posterior sex combs

**Puc:** Puckered

**RNAi:** ARN interference

**ROS:** Espèces réactives d'oxygène

**RT-qPCR:** Reverse transcription Real-time polymerase chain reaction

**Sip:** Secreted insecticidal proteins

**Sptz:** Spitz

**Su(H):** Suppressor of hairless

**Tub:** Tubiline

**UAS:** Upstream activating sequence

**Upd:** Unpaired

**UV:** Ultra-violet

**Vip:** Vegetative insecticidal protein

**Vn:** Vein

**Wg:** Wingless

**Yki:** Yorkie





# Partie I: Introduction

Le contrôle des insectes ravageurs de plantes et des insectes vecteurs de certaines maladies humaines est basé principalement sur l'utilisation d'insecticides chimiques. Néanmoins, de très nombreuses études ont montré des effets néfastes de certains de ces insecticides sur la santé humaine et sur les écosystèmes, en plus du développement de cas de résistance de certains nuisibles à certains de ces produits (Jeschke, 2016; Stark and Banks, 2003). Des impacts létaux ou sublétaux sur des organismes non cibles ont été trouvés. Les effets non intentionnels sont souvent des perturbations du système endocrinien ou immunitaire, des altérations du comportement, du développement embryonnaire, voire de cancers (Clark et al., 1998; Devine and Furlong, 2007). Pour ces raisons, une tendance à réduire l'utilisation des insecticides chimiques est observée depuis plusieurs années et a été officialisée en France en 2007 par le Grenelle de l'environnement. Le plan ECOPHYTO a été élaboré avec pour objectif de réduire de 50% le recours aux produits phytopharmaceutiques en France en dix ans (<http://agriculture.gouv.fr/plan-ecophyto-2015>). Plusieurs solutions alternatives ont été cherchées et développées dont l'utilisation des bioinsecticides.

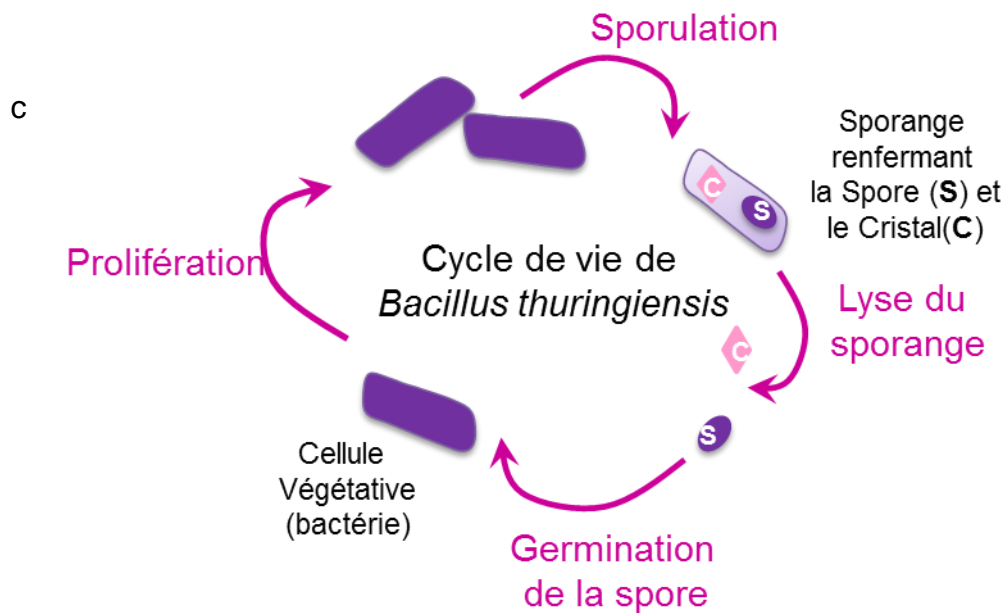
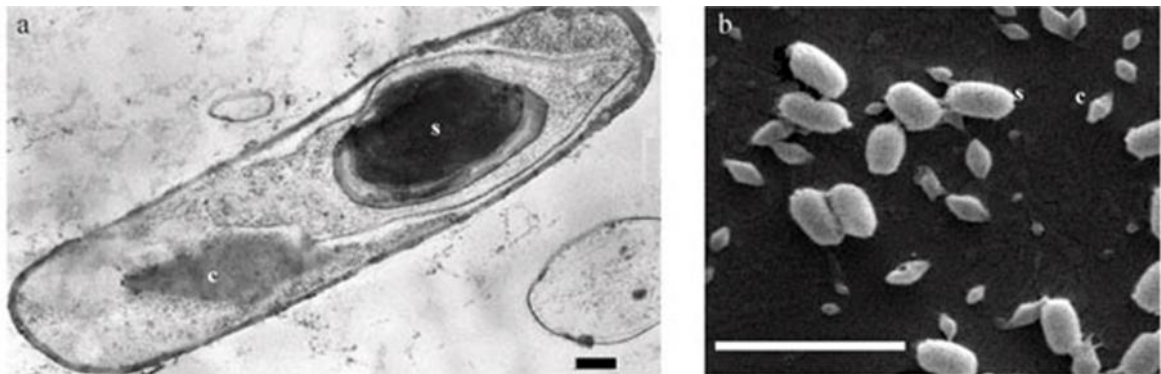
Les bioinsecticides sont dérivés d'organismes vivants (bactéries, virus, plantes, etc...) ou de substances qu'ils produisent. Leur spécificité d'action est souvent limitée à un nombre restreint d'espèces. Ils sont généralement inoffensifs en termes de toxicité aiguë sur les autres espèces de l'écosystème, y compris les humains. Les bioinsecticides sont appelés à réduire le recours aux insecticides chimiques et seront donc de plus en plus utilisés pour lutter contre les ravageurs. Il existe plus de 250 bioinsecticides dans le monde. Parmi eux, les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) voient leur utilisation augmenter depuis plusieurs années. 70% des produits biologiques phytosanitaires utilisés dans le monde proviennent de *Bt*. La question de savoir s'ils peuvent avoir des effets secondaires, à l'image de ce que l'on a pu connaître avec les insecticides chimiques, est donc pertinente.

## **Chapitre I**

### **Les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis***

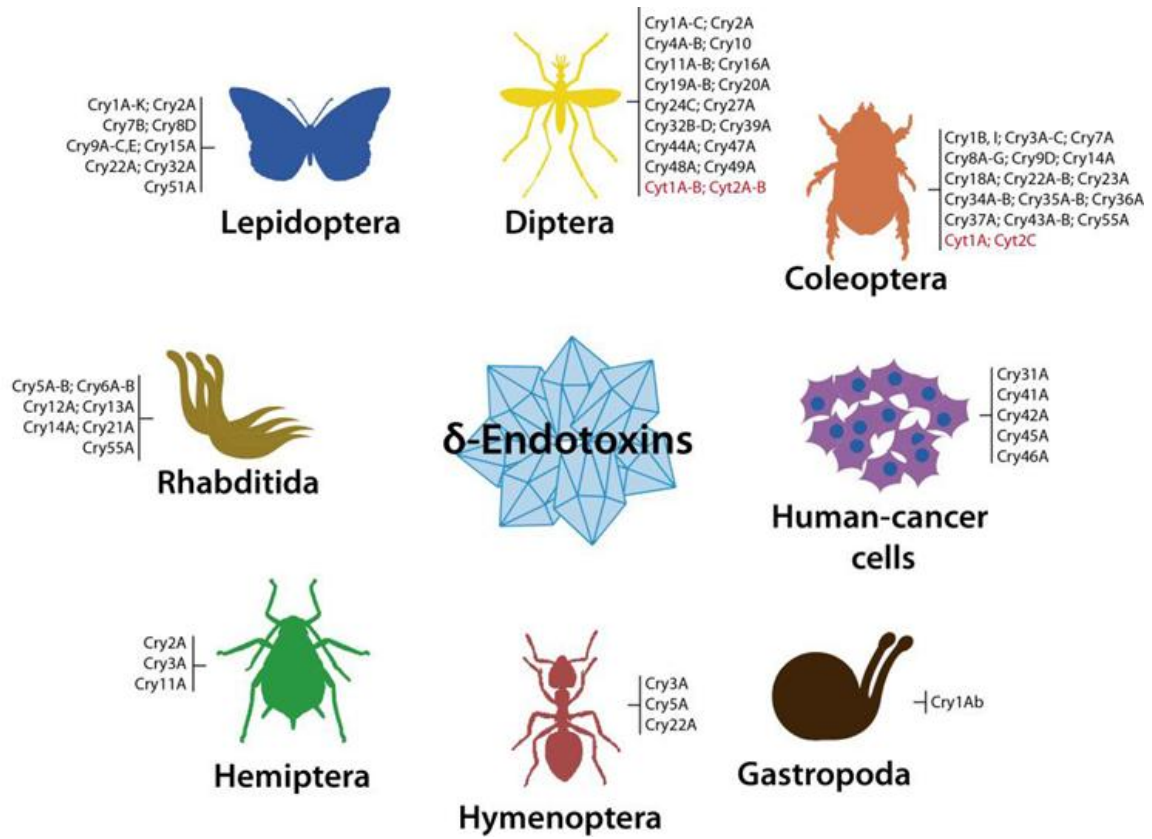
## I-1 Définition et utilisation

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une bactérie Gram-positif appartenant au groupe de *B. cereus* qui comprend plusieurs espèces dont *B. cereus sensu stricto*, une bactérie responsable de toxi-infections alimentaires et *B. anthracis* qui est responsable de la maladie du charbon. Certains auteurs considèrent que ces différentes espèces ne constituent qu'une seule espèce au vu des difficultés pour les distinguer par les méthodes couramment utilisées (Helgason et al., 2000; Okinaka and Keim, 2016). Classiquement, à partir de cultures, c'est l'observation microscopique de la présence d'un cristal protéique qui permet de différencier *B. thuringiensis* de *B. cereus* (Ankolekar and Labbé, 2010). *Bt* se trouve dans le sol, sur le feuillage des plantes et dans les cadavres de certains insectes. Elle a été isolée pour la première fois en 1901 par le japonais Shigetane Ishiwata à partir de chenilles du ver à soie. En 1911 en Thuringe (Allemagne), le biologiste Ernst Berliner redécouvre la bactérie et en donne sa première description scientifique et son nom scientifique *Bacillus thuringiensis* qui signifie « bacille de Thuringe ». Berliner découvre la bactérie en infestant des teignes de la farine, révélant ainsi son pouvoir entomopathogène ([http://www.bt.ucsd.edu/bt\\_history.html](http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html)). L'espèce *thuringiensis* se distingue par la production d'une ou plusieurs inclusions cristallines parasporales en phase de sporulation dont certaines ont une activité entomopathogène. En effet, lors d'un stress nutritionnel, *Bt* sporule et se transforme en un sporange renfermant la spore *Bt* (bactérie en état de dormance) et un cristal formé par une ou plusieurs toxines. Quand il se trouve dans un milieu propice, le sporange s'autolyse et libère la spore et le cristal. La spore peut germer pour redonner la cellule végétative (bactérie *Bt*) qui prolifère si elle trouve les bonnes conditions (**Figure 1**).



**Figure 1:** *Bacillus thuringiensis*: aspect et cycle de vie. **a-** photo d'un sporange de *Bt* renfermant la spore (S) et le cristal (C), barre d'échelle 0,2  $\mu\text{m}$  ; **b-** photo de spores de *Bt* (S) et de cristaux (C), barre d'échelle 5  $\mu\text{m}$  (Sauka et al., 2010). **b** et **c**: Photos prises en microscopie électronique. **c-** Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*: En cas de stress, la bactérie *Bt* sporule. Pendant la phase de sporulation, les toxines Cry sont produites et sont agglomérées sous forme d'un cristal et la bactérie se transforme en une spore. La spore et le cristal seront enveloppés par une membrane protéique formant ainsi un sporange.

Les inclusions cristallines produites par *Bt* sont appelées  $\delta$ -endotoxines ou toxines Cry (pour Crystal). La nomenclature des toxines Cry est basée sur l'ordre de découverte des toxines Cry et sur l'identité de séquence des acides aminés. En effet, les premières toxines Cry découvertes sont appelées Cry1, les suivantes Cry 2 et ainsi de suite. De plus, les toxines qui présentent plus de 95% d'homologie de séquence sont classées dans la même famille en ajoutant des lettres en majuscule puis en minuscule suivant l'ordre de la découverte (exemples: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba...). Parmi les 335 toxines Cry connues et produites par les différentes souches de *Bt*, au moins 125 ont une activité insecticide. Une vingtaine seulement ont été sélectionnées pour leurs spécificités d'action contre certains nuisibles et sont utilisées commercialement soit sous formes de bioinsecticides (sporangies contenant des combinaisons de toxines Cry) soit dans des OGM (Organismes Génétiquement Modifiés: plantes dans lesquelles sont insérés un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry insecticides), ([www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt)), (Frankenhuyzen, 2011). Grace à ses propriétés entomopathogènes, *Bt* est utilisé à hauteur de 90% du total des ventes des bioinsecticides dans le monde. L'activité insecticide de ces toxines est spécifique d'un ordre d'insectes: par exemple, les protéines Cry1 et Cry2 sont actives sur certains Lépidoptères, alors que les toxines Cry3 sont actives sur certains Coléoptères et les toxines Cry4 sur des espèces de Diptères (**Figure 2**), (Bravo et al., 2011; Palma et al., 2014). Certaines toxines Cry sont actives sur d'autres invertébrés comme les nématodes (Cry 5 et Cry 6) et les Gastéropodes (Cry1Ab), alors que d'autres Cry n'ont pas d'effets sur les invertébrés (comme Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A et Cry64A) mais ont une activité spécifique contre différentes cellules cancéreuses humaines, (**Figure 2**) (Palma et al., 2014). En plus des toxines Cry, les différentes souches de *Bt* sont capables de produire d'autres  $\delta$ -endotoxines en phase de sporulation, ce sont les toxines Cyt aux propriétés cytolytiques. Les toxines Cyt ont une activité insecticide spécifique contre certains diptères. En effet, elles sont capables de former des pores non spécifiques dans les membranes des cellules épithéliales intestinales en agissant sur les phospholipides insaturés membranaires (Thomas and Ellar, 1983). De plus, la présence des toxines Cyt semble être importante pour renforcer l'action de certaines toxines Cry (Wirth et al., 2005). D'autres toxines sont produites pendant la phase végétative de *Bt*: les Vip (pour vegetative insecticidal proteins) et les Sip (pour secreted insecticidal proteins), les  $\beta$ -exotoxines et certaines entérotoxines diarrhéiques (hémolysine BL, l'entérotoxine non hémolytique et la Cytotoxine K). Les Vip et les Sip ont aussi une activité insecticide et ont pour cible aussi le tube digestif (formation de pores dans les membranes des cellules intestinales). Les  $\beta$ -exotoxines sont de petits oligosaccharides actifs



**Figure 2:** Schéma illustrant les cibles des  $\delta$ -endotoxines produites par *Bacillus thuringiensis* (principalement les toxines Cry), (Palma et al., 2014).

sur différents ordres d'insectes. Elles peuvent aussi avoir une activité même sur des organismes non cibles comme les nématodes et les mammifères (leur mode d'action n'est pas encore bien caractérisé mais elles sont capables d'affecter la mue et la pupaison de certains insectes par l'inhibition de l'ARN polymérase), (Palma et al., 2014). Les entérotoxines diarrhéiques (connues pour être produites par *Bacillus cereus*) ont été trouvées dans la plupart des souches de *Bt* utilisées comme bioinsecticides (Ginsburg, 2006).

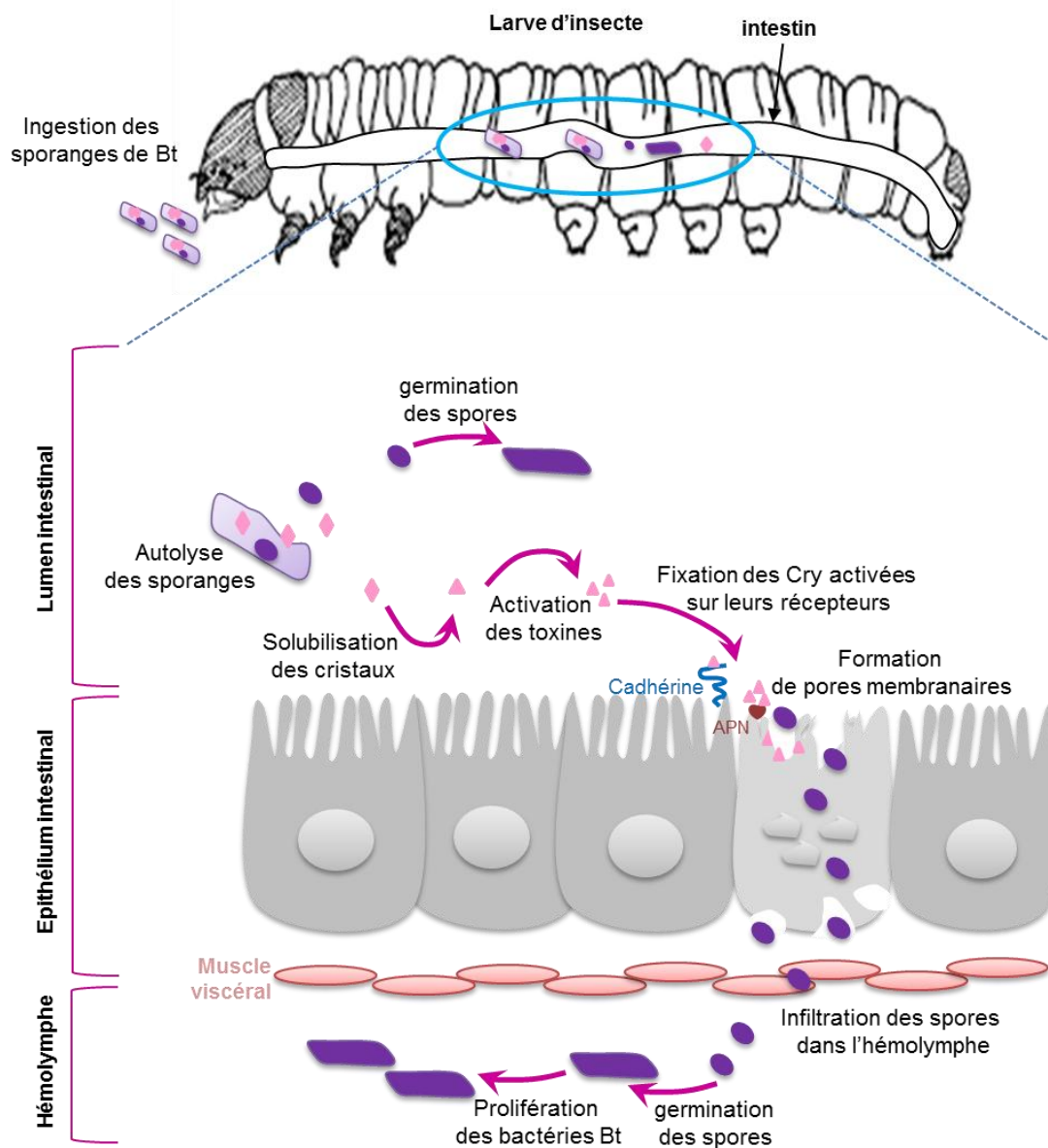
Le premier produit commercial contenant du *Bt* a été lancé en France dès 1938 sous le nom de sporéine, et depuis, le développement de produits à base de sporanges de *Bt* est en hausse dans le monde (Nester EUGENE et al., 2002). Parmi les bioinsecticides *Bt* les plus utilisés en France, on trouve la souche *Bt var. kurstaki* (*Btk*). *Btk* produit six toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac) et il est utilisé principalement pour lutter contre certains lépidoptères ravageurs (chenille processionnaire du pin, piéride du chou, sphinx de la tomate...). *Btk* est commercialisé sous plusieurs noms (Dipel®, Bacivers, Bactura, Biobit ...), (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr>). Il a une multiplicité d'usages: viticulture, sylviculture, maraîchage, forêt, horticulture, riz, maïs... Tous les ans, *Btk* est utilisé en France pour traiter 30 à 40 000 ha de forêts, 40 000 ha de vergers, 30 000 ha de légumes et 20 000 ha de vigne. Une autre souche de *Bt* très utilisée contre les moustiques; est *Bt var. israelensis* (*Bti*) commercialisé sous plusieurs noms (Vectobac, Teknar, Aquabac...). *Bti* produit de toxines Cry différentes de celles de *Btk* (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa et Cry11Aa). Il est utilisé en lutte anti-vectorielle dans le midi de la France, la Guyane, les Antilles et la Réunion pour lutter contre le moustique tigre *Aedes albopictus* vecteur de la dengue et du chikungunya, et contre les moustiques du genre *Culex* pour le bien-être de la population (plus de 3 tonnes/an de *Bti* sont épanchées en Camargue et en Languedoc-Roussillon, [www.eid-med.org](http://www.eid-med.org)). Les deux bioinsecticides *Btk* et *Bti* sont dispersés par épandages terrestres et aériens. En milieu urbain, *Bti* est aussi utilisé sous formes de granulés déposés dans les points d'eau. Il existe d'autres souches de *Bt* commercialisées pour lutter contre certains ravageurs, mais elles sont moins utilisées que celles décrites précédemment, comme par exemple *Bt var aizawai* (*Bta*) produisant neuf toxines Cry (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1Da, Cry1I, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9B et 9E). Le nom commercial du produit à base de *Bta* est Xentari. Il est utilisé pour lutter contre certains lépidoptères mais il semble être moins efficace que *Btk*. *Bt morrisoni* (*tenebrionis*) est une autre souche de *Bt* utilisée pour lutter contre certains coléoptères ravageurs de légumes. Cette souche produit une seule toxine Cry (Cry3A) et elle est commercialisée sous le nom de Novodor®.

En plus de ces formulations commerciales de *Bt*, l'insertion des gènes de toxines Cry dans les plantes d'intérêt agronomique a permis de développer des plantes dont l'activité insecticide est supposée être ciblée en raison de la spécificité d'action des toxines Cry. Plusieurs plantes OGM *Bt* (maïs, coton, pomme de terre, colza...) sont cultivées dans le monde (les Etats-Unis, le Canada, l'Argentine, le Brésil, l'Inde et la Chine possèdent l'essentiel des surfaces d'OGM *Bt* cultivées). En 2013, plus de 175 millions d'hectares ont été plantés par des OGM *Bt* ce qui reflète l'importance des toxines Cry pour l'élimination des ravageurs cibles (James, 2013). Les toxines Cry produites par les OGM *Bt* présentent l'avantage d'être produites constitutivement par les plantes et en quantités élevées (le maïs *Bt* MON 810 résistant à la pyrale de maïs (lépidoptère ravageur) produit 1500-3000 fois plus de toxine Cry1Ab que la dose de toxine Cry1Ab correspondant à un traitement unique avec Dipel® (Ginsburg, 2006). De plus, les OGM *Bt* produisent directement les toxines Cry activées, à la différence des sporanges *Bt* qui les produisent sous forme de protoxines. Les denrées alimentaires OGM passent par une évaluation rigoureuse de leur sécurité avant qu'elles ne soient autorisées dans l'Union européenne. Les procédures d'évaluation et d'autorisation des denrées alimentaires génétiquement modifiées sont définies dans le [règlement \(CE\) n° 1829/2003](#) (relatif aux denrées alimentaires génétiquement modifiées, en vigueur depuis avril 2004) et dans la [directive 2001/18/CE](#) (relative à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement, en vigueur depuis mars 2001). En Europe, le principal OGM destiné à l'alimentation humaine et animale dont la culture est autorisée est le maïs *Bt* MON 810. Il est cultivé dans cinq pays membres de l'UE sur une surface qui ne dépasse pas 1,5% de la surface totale des cultures de maïs (148660 ha en 2013, principalement en Espagne avec 136962 ha, et en surfaces moins importantes au Portugal, en république tchèque, en Roumanie et en Slovaquie), ([http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/authorisation/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/authorisation/index_en.htm)). Malgré les avantages qu'elles apportent (production de fortes doses de toxines Cry, grande efficacité contre les cibles...), la culture des plantes transgéniques *Bt* a été et reste encore un sujet de débat à cause des effets qu'elles peuvent avoir (effets non intentionnels, développement de cas de résistance...). En France, la réglementation de la culture des OGM et la mise sur le marché des produits à base de plantes OGM a connu plusieurs scénarios entre l'autorisation et l'interdiction. Depuis 2008, la culture des plantes OGM est interdite en France.

## I-2 Mode d'action sur les cibles

Les bioinsecticides *Bt* sont utilisés principalement pour tuer les larves des insectes cibles. Les sporanges de *Bt* une fois ingérés par l'insecte vont s'autolyser dans l'intestin et libérer les cristaux et les spores de *Bt* (**Figure 3**). Les spores vont germer et les cristaux vont être solubilisés sous l'action du pH intestinal alcalin. Les protoxines (avec une taille de 70 à 130 kDa selon la famille) sont ainsi libérées. Ces protoxines sont par la suite clivées par les protéases intestinales pour libérer le domaine N-terminal (c'est la toxine à proprement parler, de 60–65 kDa). La spécificité d'action des Cry en termes de toxicité aiguë semble à la fois être liée au pH et à la présence de protéases et de récepteurs spécifiques à la surface de l'épithélium intestinal. Il existe trois modèles différents et non exclusifs expliquant le mode d'action des toxines Cry sur les cellules intestinales. Le premier modèle suggère que les toxines Cry activées se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques et forment des pores non sélectifs permettant la fuite des ions, des acides aminés et des sucres. Ces pores provoquent la lyse des cellules épithéliales et la destruction de l'intestin et par conséquent la mort de l'insecte (Kirouac et al., 2002; Vachon et al., 2012). Le deuxième modèle suggère que les toxines Cry actives se fixent sur des cadhérines épithéliales. Cela induit un changement de conformation favorisant l'oligomérisation des Cry. La fixation de l'oligomère à un récepteur secondaire (plusieurs récepteurs semblent être impliqués comme l'aminopeptidase-N, des alpha amylases, et des alkaline phosphatases) permet la formation d'un pore dans la membrane induisant ainsi une lyse osmotique des cellules épithéliales et par la suite la mort de l'insecte (Bravo et al., 2011; Pardo-López et al., 2013). Le troisième modèle suggère que la fixation des toxines à leur récepteur (les cadhérines épithéliales) affecteraient des voies de signalisation cellulaire cadhérine-dépendantes induisant l'apoptose des cellules (Vachon et al., 2012).

Dans tous ces cas, les altérations cellulaires se produisent rapidement après l'ingestion des sporanges de *Bt* et l'épithélium intestinal est détruit en quelques heures (**Figure 3**), provoquant ainsi un arrêt de la prise alimentaire. De plus, les spores sont capables de coloniser l'hémolymphe et germer induisant ainsi une septicémie pouvant être responsable de la mort de l'insecte dans les 24-72 heures qui suivent l'intoxication (Raymond et al., 2010; Soberón et al., 2009).



**Figure 3:** Schéma décrivant le devenir des sporanges de *Bt* et des toxines Cry dans l'intestin après leur ingestion par les larves d'insectes cibles.

### **I-3 Persistance de *Bt* dans l'environnement**

*Bacillus thuringiensis* est naturellement présente dans le sol et sur le feuillage des plantes sous forme de sporanges. Cependant, le passage à la forme végétative et la multiplication se font dans l'intestin des espèces cibles. La persistance des sporanges de *Bt* et des toxines Cry utilisées comme bioinsecticides dans l'environnement dépend de plusieurs facteurs environnementaux. Sur le feuillage, *Bt* et ses toxines semblent être plus sensibles à l'exposition aux UV, aux rayons solaires, à la température et à l'humidité. Dans le sol, la persistance de *Bt* dépend du pH et de la compétition microbienne. Cependant, des études mesurant la quantité de *Bt var kurstaki* (*Btk*) dans le sol après son application montrent une augmentation considérable du nombre de sporanges de *Btk* dans le sol durant les semaines qui suivent son application et reste même constante dans les semaines qui suivent (Van Cuyk et al., 2011). La réduction commence à être notable six mois après l'application avec disparition totale dans un délai d'un an (Konecka et al., 2014). Une de ces études a montré que *Btk* peut même persister dans le sol quatre ans après l'application (Van Cuyk et al., 2011) alors que sur le feuillage des plantes ce même bioinsecticide persiste moins longtemps (28 jours seulement à la surface des feuilles de blettes), (Raymond et al., 2010). En résumé, la persistance de *Btk* dépend des conditions environnementales et peut être très variable. Les toxines Cry produites par les sporanges de *Bt* sont rapidement dégradées quand elles arrivent dans le sol et semblent être très sensibles aux radiations UV aussi (Konecka et al., 2014). Pour ces raisons, des efforts ont été faits pour améliorer et optimiser les formulations commerciales vendues pour augmenter la persistance et la stabilité des toxines dans l'environnement (ajout d'adjuvants permettant la stabilisation des sporanges, photoprotection des sporanges par l'ajout de molécules chromophores, génération de souches *Bt* insecticides génétiquement photorésistantes, encapsulation des toxines Cry dans des coques chimiques ou production par d'autres bactéries du genre *Pseudomonas* par exemple (en les rendant non viables par la suite) ce qui augmente leur résistance aux facteurs environnementaux (Crickmore, 2006; Konecka et al., 2014; Sansinenea and Ortiz, 2015). De ce fait, *Bt* et ses toxines risquent d'être plus persistants et plus répandus dans l'environnement.

## I-4 Effets non intentionnels

La mise sur le marché des formulations commerciales de *Bt* nécessite une évaluation préalable des risques potentiels de ces produits sur la santé humaine et sur l'environnement. Des tests toxicologiques sont demandés aux sociétés commercialisant ces bioinsecticides avant leur commercialisation. Les tests demandés sont le plus souvent des tests de toxicité aiguë et sont effectués avec un nombre limité d'espèces dont la daphnie et l'abeille. Les effets d'une exposition longue et répétée à ces produits (toxicité chronique) sont rarement évalués. Les problèmes de toxicité chronique sont difficiles à appréhender dans leur totalité au cours du processus d'homologation car les interactions entre ces produits avec les milieux dans lesquels ils sont appliqués sont complexes et peuvent prendre beaucoup de temps pour commencer à se manifester ou être révélées. L'exemple qui illustre le mieux cette problématique est le cas de certains insecticides chimiques comme le DDT qui est maintenant interdit dans de nombreux pays dont la France. En effet, les effets néfastes sur les écosystèmes et sur l'homme du DDT n'ont commencé à se manifester et à être révélés que 20 ans après sa commercialisation.

Par ailleurs, de nombreuses études toxicologiques et écotoxicologiques effectuées pour évaluer les effets non intentionnels des bioinsecticides *Bt* (soit en utilisant des sporanges de *Bt* contenant les toxines ou les toxines toutes seules ou en mélange) montrent que ces produits peuvent avoir des effets néfastes sur des organismes non cibles. Chez l'abeille par exemple, une étude a montré qu'il n'y a pas d'effet toxique apparent après un traitement avec le bioinsecticide *Btk* à des doses faibles (deux doses utilisées:  $1,4 \cdot 10^3$  et  $1,4 \cdot 10^4$  CFU/ml de sirop de sucrose) ; ces doses sont beaucoup plus faibles que les doses d'usage préconisées pour les produits commerciaux à base de *Btk* ( $5 \cdot 10^5$  à  $2,5 \cdot 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>). Néanmoins, des modifications de certaines activités enzymatiques impliquées dans la détoxification des xénobiotiques ou le métabolisme énergétique ont été observées (réduction de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et augmentation de l'activité de l'alkaline phosphatase (ALP) et de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPD)), (Renzi et al., 2016). Par ailleurs, la dose environnementale de *Btk* ( $2,5 \cdot 10^6$  CFU/μl de miel) est suffisante pour tuer l'hyménoptère trichogramme *Trichogramma chilonis*. Une dose plus faible ( $1 \cdot 10^5$  CFU /μl de miel) induit une augmentation de la longévité et une modification du comportement de cet insecte (Amichot and Wajnberg, 2016). De plus, des traitements des daphnies par une concentration de 4,5 mg/L des toxines Cry1Ab et Cry2Aa (deux toxines utilisées en OGM et actives contre

les lépidoptères) ont montré une mortalité élevée, une réduction de la taille du corps et une diminution de la fécondité (Bøhn et al., 2016). Des rats nourris avec du maïs transgénique *Bt* ont montré des niveaux de créatinine et de globulines modifiés par rapport aux contrôles (Kiliç and Akay, 2008). De même, les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2A (provenant de la souche bioinsecticide *Btk*) provoquent une génotoxicité embryonnaire et larvaire et un retard de développement du poisson zèbre *Danio rerio* quand elles sont ajoutées à l'eau d'élevage à des doses situées entre 25 et 150 mg/L durant 96 heures (Grisolia et al., 2009).

En plus de ces études toxicologiques, quelques études épidémiologiques ont été faites pour évaluer les risques d'une exposition à *Bt* et ses toxines sur la santé humaine. En Nouvelle Zélande, une étude épidémiologique sur près de 300 individus habitant dans une zone de traitement aériens par *Btk*, a montré que 61% des personnes se plaignaient de diarrhées et de maux d'estomac (Ginsburg, 2006). Par ailleurs, *Bt* a aussi été détectée dans des échantillons fécaux d'agriculteurs manipulant des bioinsecticides à base de Bti à des doses allant de  $10^2$  à  $10^3$  CFU/g d'échantillon (Carstens et al., 2012). La même étude montre que *Bt* est capable de germer dans l'intestin de ces agriculteurs et persiste jusqu'à six jours. *Bt* a été aussi isolé dans certains cas de gastro-entérites (Jackson et al., 1995). Une autre étude épidémiologique a montré que des agriculteurs manipulant *Bt* présentaient des immunoglobulines sériques E dirigées contre ce bioinsecticide, indiquant non seulement un contact évident avec *Bt* mais aussi une sensibilisation allergique vis-à-vis de *Bt* (Bernstein et al., 1999; Doekes, 2004). Une étude remarquable chez l'homme a mis en évidence la présence d'une toxine Cry produite par des OGM *Bt* (Cry 1Ab) dans le sang de femmes enceintes après une exposition à ces OGM et cette toxine peut même traverser le placenta pour se trouver dans le fœtus (Aris and Leblanc, 2011). *Bt* a été aussi identifié dans des infections nosocomiales chez l'homme (Barfod et al., 2010; Ghelardi et al., 2007). De plus, *Bt* présente la particularité de résister naturellement à bon nombre d'antibiotiques dont ceux de la famille des pénicillines compliquant le traitement des malades.

Toutes ces études montrent de potentiels effets néfastes sur plusieurs espèces non cibles dont l'homme. Ces études sont basées en majorité sur des tests de toxicité aiguë et d'évaluations épidémiologiques. De plus, si elles démontrent bien des effets indésirables de *Bt* il manque encore des études systématiques faites avec un ou des modèles de laboratoire avérés. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent qu'une exposition chronique à des bioinsecticides *Bt* pourrait avoir une incidence sur la santé publique et sur l'environnement. Sachant que l'accroissement de l'utilisation des bioinsecticides *Bt* et de leur dispersion environnementale fait qu'ils sont de plus en plus présents dans l'air, dans l'eau et dans la

nourriture, trois sources de contamination potentielles pour la faune et l'homme, il est nécessaire d'anticiper les risques d'une exposition chronique aux bioinsecticides *Bt* par des études mécanistiques approfondies. De plus, le sporange de *Bt* est un système complexe formé par différentes toxines (dont les toxines Cry) et par la composante bactérie. Par conséquent, il est difficile de savoir si les effets observés dans les études utilisant les sporanges *Bt* sont dus aux toxines ou la bactérie *Bt* ou aux deux composantes du sporange. Dans le cadre de ma thèse, j'ai essayé de résoudre cette problématique en étudiant séparément les effets des différentes composantes des sporanges de *Bt* utilisés comme bioinsecticides. De plus, aucune des études étudiant les effets non intentionnels des sporanges *Bt* ne s'est intéressée à la composante bactérie de *Bt* alors que *Bt* appartient au même groupe que *Bacillus cereus*, une bactérie très répandue dans les cas d'intoxications alimentaires.



## **Chapitre II**

**Risques d'intoxications alimentaires**

**par *Bacillus thuringiensis***

## **II-1 *Bacillus thuringiensis* : un membre du groupe de *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* représente entre 2% et 5% des incidents d'intoxications alimentaires en Europe et aux Etats-Unis. La dose infectieuse pour cette bactérie est estimée à  $10^5$  CFU/g de nourriture. *Bacillus cereus* provoque deux types d'intoxications alimentaires, l'une caractérisée par des douleurs et une diarrhée, l'autre par des nausées et des vomissements. Les souches responsables des diarrhées sont capables de produire trois entérotoxines différentes: l'entérotoxine HBL (hémolysine BL), l'entérotoxine NHE (entérotoxine non hémolytique) et l'entérotoxine CytK (cytotoxine K). Le niveau de production de NHE semble être responsable de la toxicité de *B. cereus* et il est donc un indicateur de son potentiel diarrhéique (Moravek et al., 2006). Les entérotoxines diarrhéiques semblent être produites par toutes les souches de *Bt* utilisées comme bioinsecticides (Frederiksen et al., 2006), mais étonnamment les tests effectués avant la mise sur le marché de ces bioinsecticides ne tiennent pas compte de la présence et du niveau d'expression de ces entérotoxines. L'EFSA (European Food Safety Authority) souligne dans ses rapports ce manque de données.

## **II-2 Détection de *Bacillus thuringiensis* dans des cas d'intoxications alimentaires**

Lors de l'analyse des aliments, les tests complémentaires permettant de distinguer *B. thuringiensis* de *B. cereus sensu stricto* ne sont généralement pas effectués. En 2008, une étude canadienne a montré que dans les 39 cas de toxi-infections associées à *B. cereus*, il n'y avait que 23 cas qui impliquaient *B. cereus sensu stricto*, les autres cas sont dûs à des contaminations par *B. thuringiensis* (4 cas) ou de mélanges de bactéries de ce groupe (<https://www.anses.fr/fr/system/files/DPR2013sa0039.pdf>). Une autre étude danoise a montré que parmi les 40 souches de *Bacillus* trouvés sur des aliments prêts pour la consommation, 31 d'entre elles étaient *B. thuringiensis* (Rosenquist et al., 2005). De ce fait, les données d'incidence de *B. cereus* dans les aliments, ainsi que les rapports d'intoxication alimentaire mettant en cause *B. cereus*, peuvent concerner les autres espèces du groupe entre autre *B. thuringiensis*. Néanmoins, ces observations ne permettent pas de savoir si les souches de *Bt* identifiées viennent des bioinsecticides *Bt* commercialisés. Par ailleurs, quelques études

épidémiologiques ont examiné la possibilité d'avoir une corrélation entre l'épandage de bioinsecticides à base de *Bt* et l'incidence de diarrhées. En Nouvelle Zélande, une étude épidémiologique sur près de 300 individus habitant dans une zone de traitement aérien par *Btk*, a montré que 61% des personnes se plaignaient de diarrhées et de maux d'estomac. Une autre étude danoise a examiné l'incidence de diarrhées chez les travailleurs après le traitement de serres par *Bti* (Jensen et al., 2002). Cette étude montre l'absence de cas de diarrhées durant la période de test malgré la détection de *Bt* dans les échantillons fécaux à des doses de  $10^3$  CFU/g d'échantillon. Sachant que la dose infectieuse de *Bacillus cereus* est de  $10^5$  CFU/g et que cette souche de *Bt* est capable de sécréter les entérotoxines diarrhéiques, il est possible donc que l'absence de symptômes diarrhéiques soit due au non dépassement du seuil infectieux. Compte tenu de ces observations, il n'est pas possible d'exclure totalement le risque de toxi-infections alimentaires impliquant les bioinsecticides *B. thuringiensis*. Un projet récent développé par l'institut technique de l'agriculture biologique (<http://qfq.itab.asso.fr/action.php?id=2209>) vise à: « 1- proposer des recommandations sur l'utilisation de ces biopesticides (choix, temps d'action, délai avant récolte à respecter etc...), 2- caractériser la diversité de *B. thuringiensis* pour situer les souches commerciales au sein du groupe *B. cereus* et tracer les contaminations par *B. thuringiensis* des végétaux aux produits finis par l'utilisation de méthodes analytiques robustes, répétables et reproductibles, 3- développer un portail internet donnant accès aux livrables, recommandations et outils d'aide à la décision (OAD) pour qualifier les risques sanitaires et d'altération associés aux contaminations du groupe *B. cereus* ».

## II-3 Exemple du bioinsecticide *Btk* et risques d'intoxication

*Bacillus thuringiensis var kurstaki* (*Btk*) est l'un des bioinsecticides les plus utilisés dans le monde en agriculture biologique et dans le secteur forestier pour lutter contre certains lépidoptères ravageurs (voir page 23). Grâce à son efficacité contre les espèces cibles, *Btk* va être de plus en plus utilisé en France pour diminuer au maximum l'utilisation des insecticides chimiques (le plan Ecophyto qui vise à réduire de 50% l'utilisation des insecticides chimiques et les remplacer par des "bio-insecticides"). De ce fait, *Btk* risque d'être de plus en plus présent sur nos fruits, nos légumes et dans notre environnement. La dose moyenne de *Btk* trouvée dans un produit commercial au moment de la récolte est estimée de  $2.10^6$  CFU/g sur

les choux traités plusieurs fois et de  $2.10^4$  CFU/g sur des tomates cultivées sous serre (<https://www.anses.fr/fr/system/files/DPR2013sa0039.pdf>). Ces doses sont proches des doses effectives sur les espèces cibles et semblent avoir des effets néfastes sur des organismes non cibles (voir pages 14 et 15). En effet, le bioinsecticide *Btk* a montré des effets non intentionnels sur des espèces non cibles dont l'homme (tests de toxicité aiguë et études épidémiologiques). De plus, le fait que *Btk* est capable de sécréter les entérotoxines diarrhéiques et le fait que des cas des diarrhées et de maux d'estomac sont détectés suite à son épandage, nous estimons que l'évaluation des effets de la bactérie *Btk* et ses toxines sur l'intestin est d'une importance majeure.

## **II-4 L'intestin: un milieu propice pour *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* se développe dans l'intestin des insectes cibles et il est généralement trouvé en fortes quantités dans les cadavres des insectes. Dans l'intestin, les sporanges de *Bt* trouvent les conditions propices pour germer puis proliférer. Quelques études ont montré que *Bt* peut proliférer et persister, non seulement dans l'intestin des insectes cibles, mais aussi dans l'intestin d'autres espèces, entre autres l'homme, où il persiste jusqu'à six jours (Jensen et al., 2002), le rat où il persiste jusqu'à deux semaines (Wilcks et al., 2006) et la drosophile où il persiste plus de 24 jours (résultats obtenus au laboratoire).

Le tube digestif est la première barrière contre les agresseurs ingérés avec la nourriture (bactéries, produits chimiques, pesticides etc...). Il doit donc maintenir au mieux son intégrité structurale et fonctionnelle tout au long de la vie de l'individu. Pour les insectes cibles, cette intégrité est affectée par *Bt* et ses toxines qui détruisent l'intestin ce qui facilite l'infiltration des bactéries *Bt* dans l'hémolymphe provoquant ainsi une septicémie. La mort de ces insectes intervient ainsi dans les 2-3 jours qui suivent l'intoxication. Bien que l'impact d'une intoxication aiguë par *Bt* semble être surmonté chez les espèces non cibles, une agression prolongée ou répétée peut compromettre l'équilibre physiologique du tube digestif. Ceci peut mettre en péril la santé de l'organisme exposé surtout quand l'organisme est déjà prédisposé à développer des maladies.

Chez l'homme, l'épithélium intestinal a de grandes capacités de défense et de régénération pour maintenir son homéostasie et son intégrité, et pourtant, c'est un organe fortement exposé aux risques de développer des pathologies quand l'exposition au danger

dépasse ses capacités de défense et de régénération. Les conséquences néfastes peuvent être l'apparition de désordres fonctionnels de l'organe lui-même (comme l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, de polypes et dans le pire des cas de cancers), mais également de problèmes physiologiques de l'individu mettant en péril sa croissance, sa santé voire sa survie (Radtke, 2005).

Dans le but d'anticiper de potentiels effets des bioinsecticides *Bt* sur l'homéostasie intestinale, des études approfondies écotoxicologiques et fonctionnelles sont menées dans le laboratoire. Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié les effets d'une exposition à la souche *Btk* sur l'homéostasie intestinale et j'ai utilisé comme modèle *Drosophila melanogaster*.



## **Chapitre III**

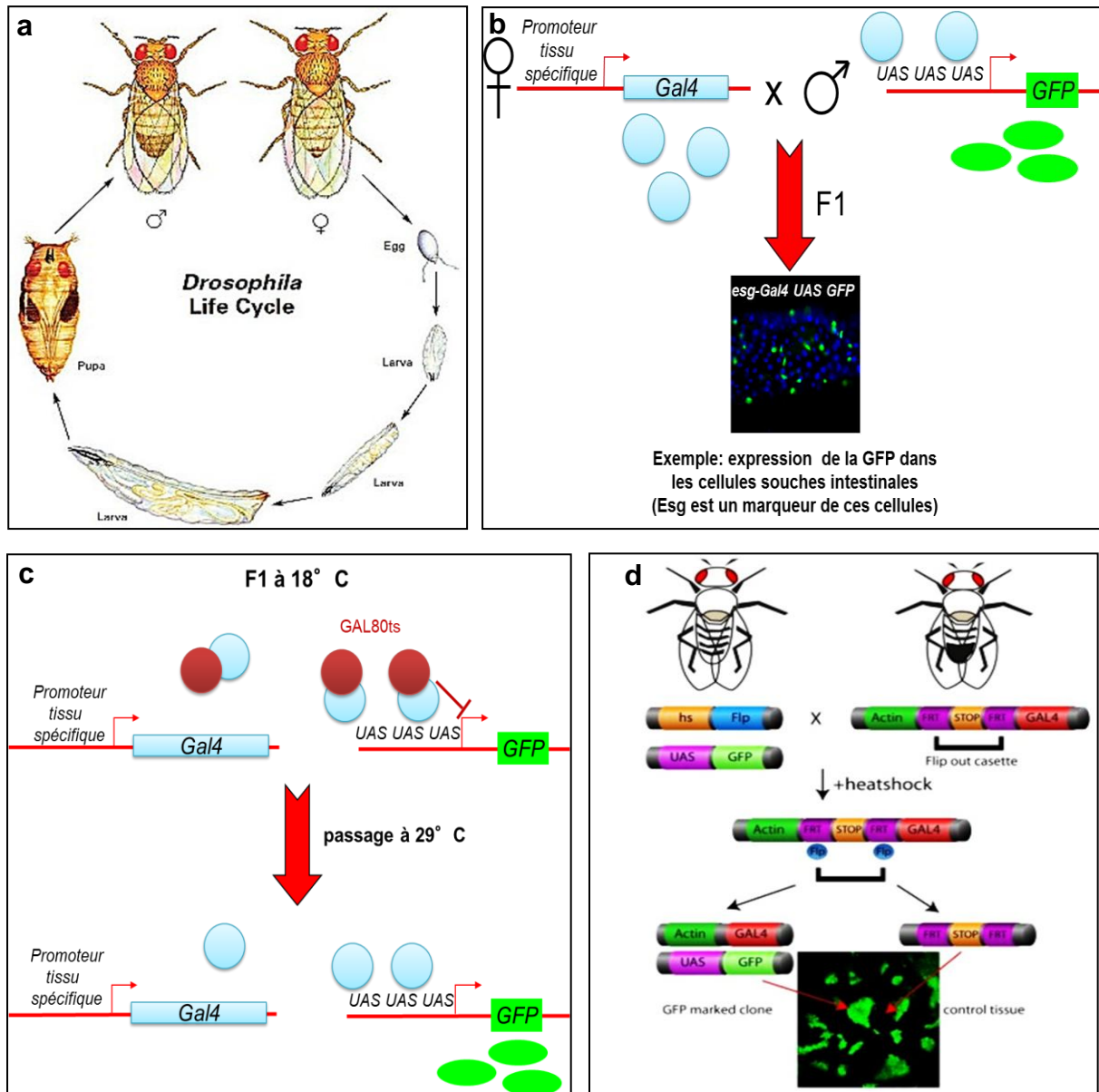
***Drosophila melanogaster* comme modèle pour  
étudier les effets de *Bacillus thuringiensis*  
sur l'intestin**

### III-1 Choix du modèle

*Drosophila melanogaster* est un petit insecte de 2 à 3 mm qui appartient à la famille des diptères. Elle est très utilisée comme modèle de laboratoire grâce aux grands avantages qu'elle apporte : facile à élever en laboratoire, cycle de reproduction court (environ deux semaines à 25°C, un mois à 18°C), (**Figure 4a**), grande productivité des femelles ce qui permet de l'utiliser en quantité suffisante pour permettre une analyse statistique des données, génome entièrement séquencé et annoté, un grand degré de conservation génétique avec les mammifères et de nombreux outils génétiques bien développés disponibles pour la manipulation et l'analyse des données (plusieurs sites web disponibles FLYBASE, FLYGUT, TRiP, VDRC...),([http://flybase.org/static\\_pages/news/whitepapers/DrosBoardWP2012.5.pdf](http://flybase.org/static_pages/news/whitepapers/DrosBoardWP2012.5.pdf)). Parmi les outils les plus utilisés chez la drosophile on trouve:

Le système UAS/GAL4: ce système existe naturellement chez la levure et a été développé et exploité chez la drosophile par Andrea Brand et Norbert Perrimon en 1993 ([Brand and Perrimon, 1993](#)). Le système UAS/GAL4 est composé de deux parties : le gène *GAL4* qui code pour un activateur transcriptionnel chez la levure et la séquence *UAS* (Upstream Activation Sequence) sur laquelle va se fixer la protéine GAL4 pour activer la transcription du gène en aval de cette séquence (**Figure 4b**). Ce système est souvent utilisé chez la drosophile pour étudier les fonctions des gènes (surexpression ou invalidation des gènes d'une manière tissu/cellule spécifique). Ce système permet aussi de marquer les différents types cellulaires pour pouvoir les étudier (nombre, localisation...). Il existe des milliers de lignées de drosophile GAL4 générées, la plupart étant disponibles auprès du Drosophila Stock Center de Bloomington (USA).

Le système UAS/GAL4-GAL80<sup>ts</sup>: l'utilisation du système UAS/GAL4 a été optimisée. En effet, ce système est répressible par la protéine GAL80 (GAL80 réprime l'activation de GAL4). Un mutant thermosensible GAL80<sup>ts</sup> peut être utilisé pour restreindre temporellement l'expression d'un transgène X. En effet, la GAL80<sup>ts</sup> est active à 18 °C permettant la répression de GAL4, mais elle est inactive à 29 °C ou à des températures plus élevées ce qui permet de lever la répression sur le système UAS/GAL4 et donc l'expression du gène d'intérêt (**Figure 4c**).



**Figure 4:** Schémas du cycle de vie de la drosophile et des outils génétiques utilisés. **a-** présentation schématique du cycle de vie de la drosophile: à 25 °C, l'œuf fertilisé met 24 heures pour donner la larve. La larve passe par 3 stades différents (L1, L2 et L3) avant de donner la pupa. Au bout de 9 jours, les drosophiles adultes émergent des pupes. **b-** Présentation schématique du système UAS/GAL4: La *Gal4* est clonée derrière un promoteur tissu-spécifique (exemples: *esg* dans les cellules souches intestinales). La protéine GAL4 produite va se fixer spécifiquement sur la séquence *UAS*, permettant ainsi l'expression du gène d'intérêt (la GFP dans cet exemple) spécifiquement dans le type cellulaire choisi. **c-** Le système UAS/GAL4-GAL80<sup>ts</sup> permet le contrôle temporel de l'expression du gène d'intérêt: à 18°C la GAL80<sup>ts</sup> réprime la GAL4 empêchant ainsi l'expression de la GFP dans cet exemple. En passant les drosophiles à 29 °C, la GAL80<sup>ts</sup> est dégradée, la GAL4 pourra ainsi se fixer sur la séquence *UAS* ce qui permet l'expression de la GFP. **d-** présentation schématique de la technique du Flip-Out (Er et al., 2012): un choc thermique (30 min à 37°C par exemple) induit l'expression de la flipase recombinase FLP. La FLP va exciser les sites FRT et la recombinaison va permettre d'enlever la cassette « FRT-STOP-FRT ». Le promoteur de l'actine va permettre ainsi l'expression de la *Gal4*. La GAL4 va se fixer sur la séquence *UAS* permettant ainsi une expression « clonale » de la GFP.

Le système FLP-OUT: ce système apporte l'avantage de contrôler l'expression d'un transgène dans les cellules où se fait la recombinaison mitotique en utilisant la recombinase de levure, la flipase (FLP) et sa séquence cible FRT (Johnston, 2002). Cette technique est utilisée pour restreindre l'expression d'un gène flanqué par des sites FRT. Les sites FRT peuvent être enlevés par l'expression de la flipase FLP ce qui conduit à l'expression du gène d'intérêt (Figure 4d). Le système FLP-OUT peut être combiné au système UAS/GAL4 pour permettre le contrôle spatial et temporel de l'expression du gène d'intérêt. En effet, une drosophile adulte portant la flipase FLP dont le promoteur est inductible par un choc thermique (*hs-FLP*) et portant un transgène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur UAS (exemple: *UAS-GFP*) peut être croisée avec une drosophile dont la GAL4 est sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression ubiquitaire (actine-5C ou alpha-tubuline par exemple) avec une séquence « stop » flanquée par deux sites FRT empêchant l'expression de la GAL4 (Figure 4d). La descendance de ce croisement peut être induite par choc thermique pour stimuler l'expression de la flipase. Il en résulte une excision de la séquence stop suite à la recombinaison entre les sites FRT. Ceci va permettre l'expression de la GAL4 et par conséquent l'expression du gène contrôlé par le promoteur UAS (Er et al., 2012), (Figure 4d). Le système FLP-OUT peut être ainsi utilisé pour générer des clones ce qui permettra de comparer des clones sauvages et des clones mutants au sein d'un même tissu.

Le système ARN interférence (RNAi): ce système offre une approche puissante de génétique inverse pour analyser les fonctions des gènes à la fois dans la culture de tissus et in vivo. Il est utilisé pour générer des mutants perte de fonction en bloquant la production des protéines cibles. L'injection des séquences RNAi dans les embryons de drosophile a montré une efficacité très élevée et a permis l'identification des fonctions d'un grand nombre de gènes (Perrimon et al., 2016). L'expression du RNAi in vivo est devenue possible et elle peut être contrôlée spatialement et temporellement grâce au système UAS/GAL4. Il existe des milliers de souches de drosophiles UAS RNAi (voir TRiP pour Transgenic RNAi Project, <http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/TRiPt.htm>).

Grâce aux outils disponibles, le modèle *Drosophila melanogaster* occupe une place très importante dans la recherche biomédicale. Cette importance a été reconnue par l'attribution du prix Nobel cinq fois à des chercheurs menant leurs travaux sur la drosophile. Le plus récent a été attribué au chercheur français Jules Hoffman en 2011 sur ses travaux sur l'immunité de la drosophile. La compréhension des principes de base de la génétique (la recombinaison génétique, la méiose, la ségrégation des chromosomes...) ont tous surgi à partir d'études effectuées chez la drosophile. De plus, des études pionnières qui reliaient les

modifications dans le génome à des phénotypes mutants ont conduit à l'identification d'un grand nombre de voies de signalisation tels que Notch, Wnt, Hedgehog, Hippo, et les récepteurs Toll. Ces voies de signalisation sont maintenant reconnues comme facteurs contributifs centraux pour plusieurs maladies humaines, y compris le cancer, les maladies cardiovasculaires, les troubles neurologiques... Les médicaments ciblant ces voies sont en cours d'utilisation ou dans les essais cliniques ce qui reflète l'importance de la drosophile pour la découverte des cibles des médicaments. Les recherches menées sur la drosophile ont également apporté des connaissances fondamentales sur les processus biologiques (réponse immunitaire innée, polarité des tissus, contrôle de la croissance, comportement animal, apprentissage, mémoire...).

Dans le cadre de mon projet de thèse, la drosophile adulte présente l'avantage d'être insensible en termes de toxicité aigüe aux bioinsecticides *Btk* commercialisés, ce qui nous permet d'étudier les effets d'intoxications subchroniques et chroniques à ces bioinsecticides (Frankenhuyzen, 2011; Gill and Ellar, 2002). La drosophile nous permettra d'investiguer les effets sur la physiologie intestinale d'une exposition aigüe et chronique à *Btk* car il est clairement établi que les mécanismes génétiques contrôlant la physiologie intestinale et la réponse immunitaire sont très bien conservés entre la drosophile et les mammifères (Bonfini et al., 2015; Panayidou and Apidianakis, 2013; Pasco et al., 2015). En effet, plusieurs études valident l'intestin de la drosophile comme modèle pour étudier la physiologie des cellules souches intestinales et le renouvellement cellulaire au cours de l'infection et pour modéliser certaines pathologies intestinales humaines (inflammations intestinales, cancers colorectaux...). C'est grâce au grand degré de conservation des voies de signalisation contrôlant le développement intestinal, la régénération et les maladies intestinales entre la drosophile et les mammifères que cela est devenu possible. De plus, plusieurs agents pathogènes humains peuvent causer des pathologies intestinales chez la drosophile (exemple du pathogène *Pseudomonas aeruginosa*), (Apidianakis and Rahme, 2011). De même, les altérations du microbiote intestinal chez la drosophile comme chez l'homme peuvent induire une dysbiose (déséquilibre de la flore commensale intestinale) qui peut être à l'origine de certaines maladies inflammatoires intestinales.

## III-2 L'intestin de la drosophile

L'intestin de la drosophile est divisé en trois domaines (**Figure 5a**) :

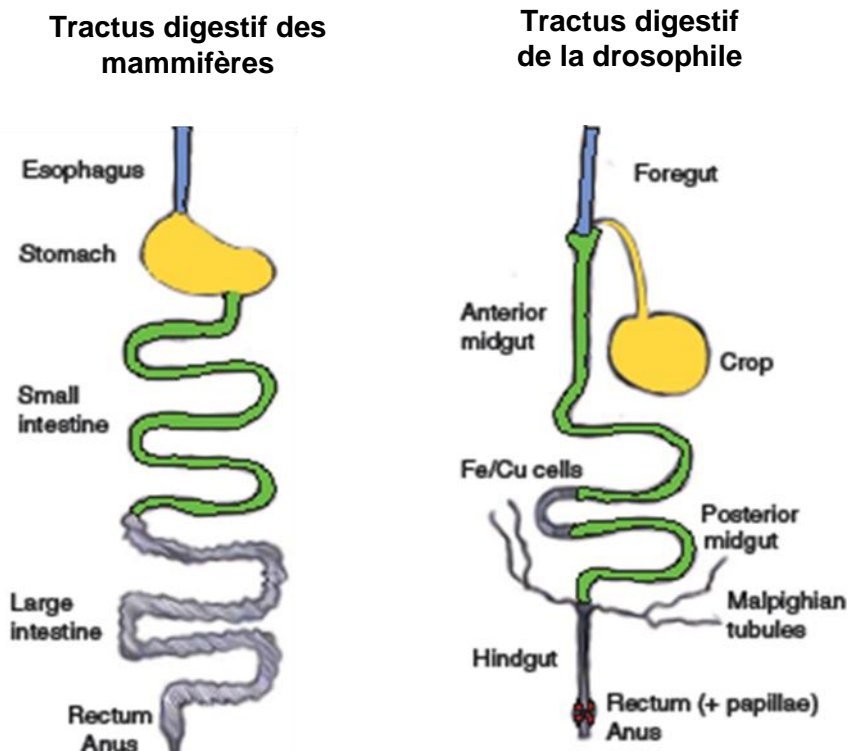
- l'intestin antérieur (foregut) d'origine ectodermique comprend la bouche, l'œsophage et le crop là où se fait l'accumulation et la digestion des aliments ingérés (équivalent de l'estomac chez les mammifères) ;
- l'intestin moyen (midgut) d'origine endodermique qui est l'équivalent de l'intestin grêle chez les mammifères ; c'est l'endroit où se passe la digestion et l'absorption des nutriments ; il est lui-même divisé en trois parties, le midgut antérieur, la zone des copper cells et le midgut postérieur ;
- l'intestin postérieur (hindgut) d'origine ectodermique qui ressemble au gros intestin chez les mammifères et permet la réabsorption d'eau.

Les tubes de Malpighi (équivalent des reins chez les mammifères) viennent s'insérer à la jonction midgut-hindgut.

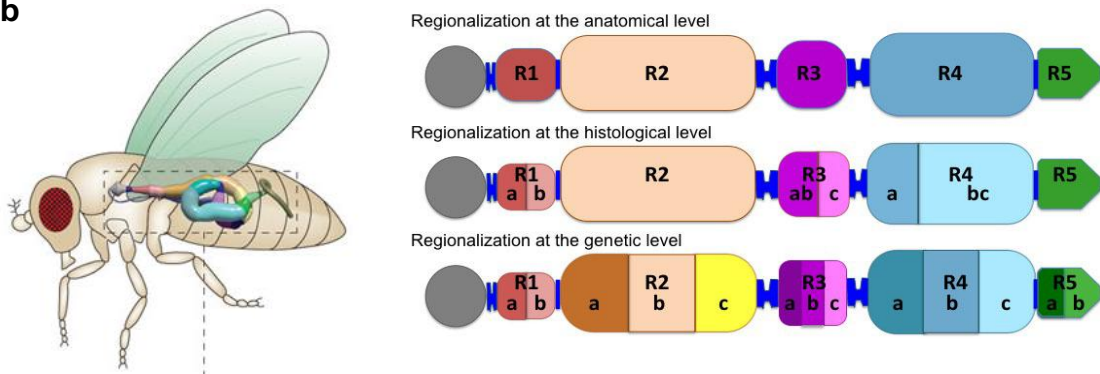
En 2013, Buchon et ses collaborateurs ainsi que Mariannes et Spradling ont montré que le midgut n'est pas un tissu homogène mais au contraire très régionalisé que ce soit à l'échelle anatomique, histologique, génétique ou fonctionnelle ([Buchon et al., 2013](#); [Marianes and Spradling, 2013](#)), (**Figure 5b**). Cette régionalisation a permis de distinguer cinq parties différentes dans le midgut, R1 à R5 en allant du midgut antérieur au midgut postérieur (<http://flygut.epfl.ch/overview>).

Les fonctions principales de l'intestin (digestion, absorption et réponse immunitaire) semblent aussi être régionalisées ([Buchon et al., 2013](#); [Capo et al., 2016](#); [Marianes and Spradling, 2013](#); [Royet et al., 2013](#)). En effet, la digestion des macromolécules se passe principalement dans le midgut antérieur, tandis que la partie postérieure du midgut est consacrée principalement à la transformation et l'absorption des petites molécules. La réponse immunitaire intestinale et l'activité antioxydante se passent principalement dans la partie antérieure du midgut.

a



b

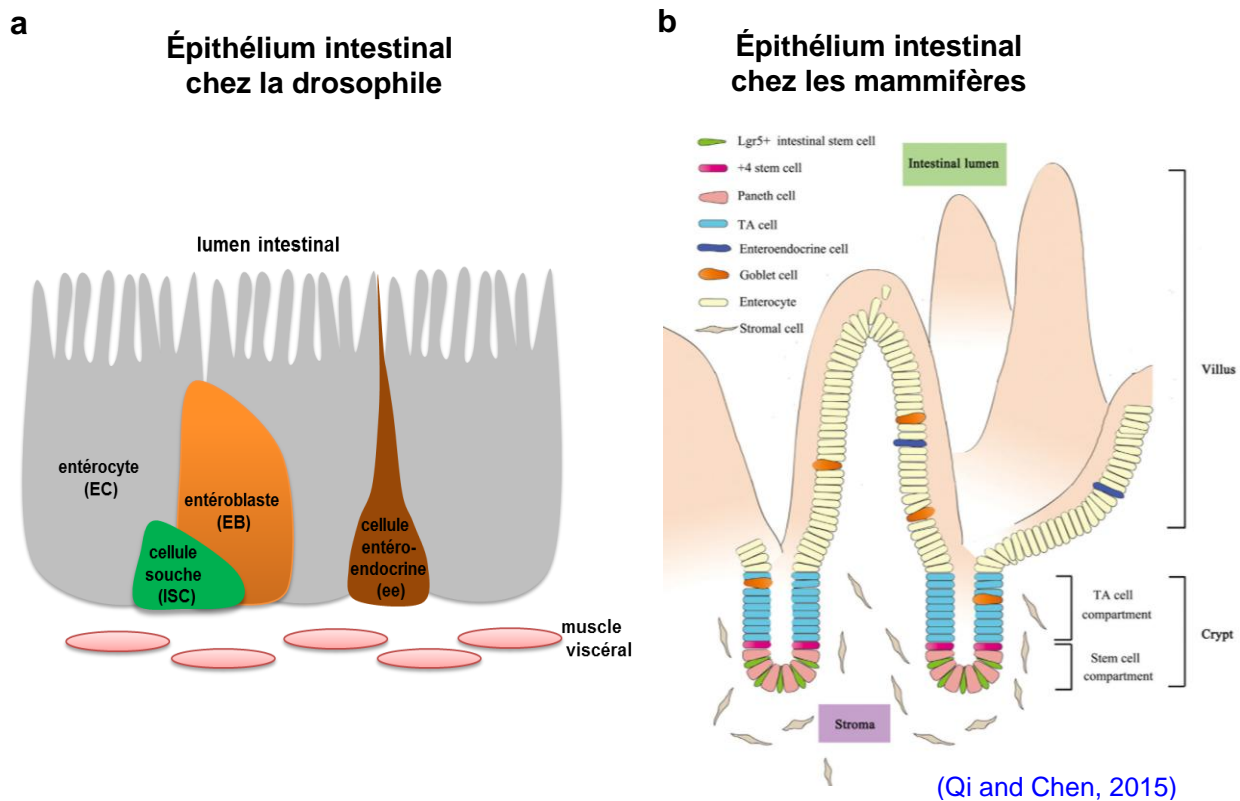


**Figure 5** : Schémas illustrant le tractus digestif de la drosophile en le comparant avec celui des mammifères. **a**- Présentation schématique du tractus digestif chez la drosophile et les mammifères. Les parties présentées par les mêmes couleurs ont des rôles fonctionnels identiques ou similaires: en bleu on trouve l'œsophage ou foregut, en jaune le crop (estomac chez les mammifères), en vert l'intestin moyen (intestin grêle) et en gris la région des copper cells et le hindgut (gros intestin chez les mammifères), (Apidianakis and Rahme, 2011). **b**- Présentation schématique des différentes parties de l'intestin: L'intestin moyen est anatomiquement divisé en 5 régions différentes. Directement après le cardia (appelé aussi proventricule) on distingue: la R1 et R2 qui forment le midgut antérieur, la R3 présente la région des copper cells et la R4 et la R5 qui forment le midgut postérieur. Histologiquement et génétiquement, chacune de ces régions est divisée en 2 ou 3 régions (Buchon et al., 2013).

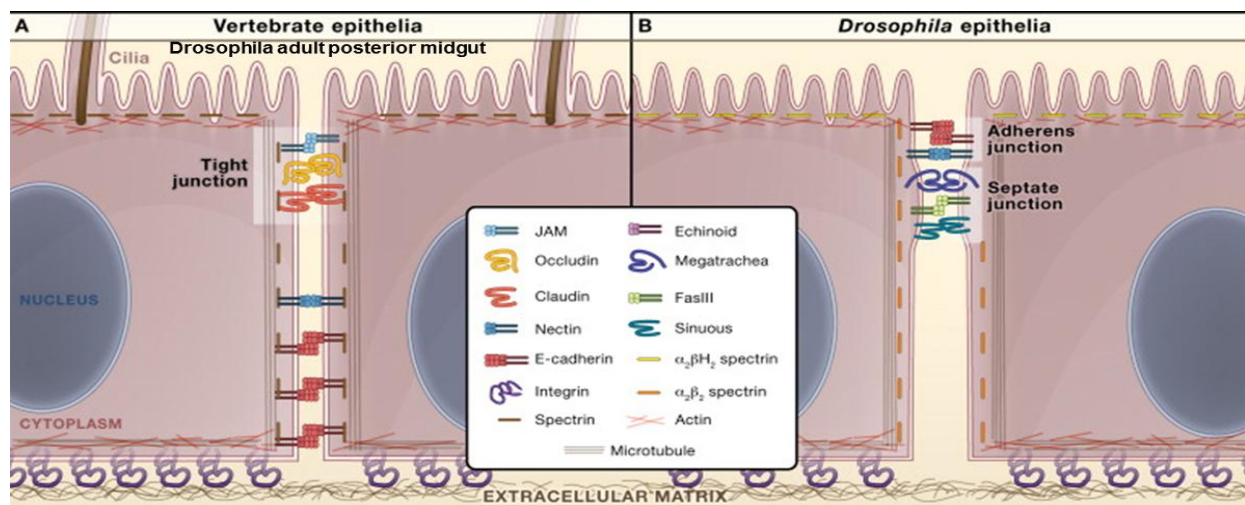
Chez la drosophile, l'épithélium intestinal est composé de quatre types cellulaires (**Figure 6a**): les cellules souches intestinales (ISC) qui se divisent soit symétriquement pour donner deux nouvelles ISC, soit asymétriquement pour donner naissance à une nouvelle cellule souche et un entéroblaste (EB). Les entéroblastes vont eux-mêmes se différencier soit en entérocytes (EC, cellules permettant l'absorption des nutriments et jouant un rôle dans la réponse immunitaire locale) soit en cellules entéro-endocrines (ee, cellules sécrétant les hormones intestinales), ([Pasco et al., 2015](#)).

Chez les mammifères, l'épithélium intestinal est organisé en villosités et en cryptes (**Figure 6b**). Au niveau cellulaire, on trouve aussi quatre grands types cellulaires : Les cellules souches intestinales, les cellules progénitrices, les cellules sécrétrices et les entérocytes. A la différence de la drosophile, il existe deux types de cellules souches intestinales (ISC) chez les mammifères. Selon les marqueurs qu'elles expriment on distingue les ISC Lgr5<sup>+</sup> situées au fond des cryptes (ces cellules permettent le renouvellement intestinal en conditions normales ou en conditions de stress) et les cellules de Potten situées en position +4 au-dessus des cellules souches Lgr5<sup>+</sup> (ce sont des cellules quiescentes dont les rôles ne sont pas clairement définis ; elles sont cependant capables de redonner les ISC Lgr5<sup>+</sup> après une agression des cellules intestinales ([Tian et al., 2011](#))). Les ISC Lgr5<sup>+</sup> se divisent asymétriquement pour donner les cellules progénitrices appelées TA (pour transient amplifying cells). Les TA peuvent donner soit des entérocytes (assurant l'absorption des nutriments), soit des cellules sécrétrices. A la différence de la drosophile, il existe trois types de cellules sécrétrices intestinales chez les mammifères: les cellules entéro-endocrines (ee, sécrétant les hormones intestinales), les cellules calciformes (Goblet cells) (permettant la production du mucus) et les cellules de Paneth (jouant un rôle dans l'immunité par la sécrétion de peptides antimicrobiens), ([Biteau et al., 2011a](#)).

Chez la drosophile comme chez les mammifères, les différentes cellules intestinales sont liées entre elles et organisées en épithélium grâce aux jonctions cellulaires qui maintiennent la stabilité et la polarité de ces cellules et l'étanchéité de l'épithélium intestinal. Ces jonctions cellulaires intestinales sont bien conservées entre la drosophile et les mammifères et leur organisation apicolatérale ou basolatérale peut différer d'une région



**c** **Jonctions épithéliales chez la drosophile et les mammifères**



(St Johnston and Ahringer, 2010)

**Figure 6:** Schémas décrivant l'épithélium intestinal et les jonctions épithéliales intestinales chez la drosophile et chez les mammifères. **a-** Présentation schématique de l'épithélium intestinal chez la drosophile: cet épithélium est formé par les EC (entérocytes), les ee (cellules entéroendocrines), les EB (entéroblastes) et les ISC (cellules souches intestinales). L'épithélium intestinal est entouré par la membrane péritrophique apicalement et par le muscle viscéral basalement. **b-** Schéma de l'épithélium intestinal chez les mammifères: l'épithélium est formé par les ISC (les Lgr5+ et les ISC+4), par les TA (cellules progénitrices équivalent des EB chez la drosophile), par les entérocytes et par 3 types de cellules sécrétrices (les ee, les cellules calciformes et les cellules de Paneth). **c-** Schéma décrivant les jonctions épithéliales chez la drosophile et chez les vertébrés: à gauche on a une photo schématisant les jonctions cellulaires chez les vertébrés et dans l'intestin postérieur de la drosophile : on trouve les jonctions serrées (apicolatérales) et les jonctions adhérentes (basolatérales). A droite, la photo schématise le positionnement des jonctions épithéliales chez la drosophile (la position des jonctions adhérentes et des jonctions serrées est différente entre l'intestin moyen antérieur et l'intestin postérieur de la drosophile).

intestinale à l'autre. Chez la drosophile, les cellules intestinales sont liées latéralement par deux types de jonctions (**Figure 6c**): les jonctions serrées (JS) formées par différentes protéines (DLG, SCRIB, LGL) et sont enrichies par des ankyrines, des  $\beta$ -spectrines et la fascicline III. Ces jonctions permettent une régulation paracellulaire sélective du transport des solutés et des ions. Le deuxième type de jonctions cellulaires est constitué par les jonctions adhérentes (JA). Les JA sont formées par le complexe cadhérines- $\beta$ -caténines (appelées Armadillo chez la drosophile). Ces dernières permettent la liaison avec les filaments d'actine permettant ainsi le maintien de la polarité cellulaire. L'organisation des JA est différente entre le midgut antérieur et le midgut postérieur de la drosophile: dans la partie antérieure de l'intestin on trouve les jonctions adhérentes dans la partie apico-latérale des entérocytes et les jonctions serrées dans la partie baso-latérale. Dans la partie postérieure, c'est l'inverse ([St Johnston and Ahringer, 2010](#)). Chez les mammifères, il y a trois types de jonctions intestinales dont les fonctions sont identiques à celles décrites chez la drosophile: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes ([Groschwitz and Hogan, 2009](#)). Les jonctions serrées sont apico-latérales et sont formées par un complexe protéique transmembranaire (les occludines, les claudines, les junctional adhesion molecules (JAMs) et les tricellulines). L'expression des protéines formant les jonctions serrées dans l'intestin est fortement régulée et dépend du compartiment intestinal (intestin grêle/colon, villosités/crypte, la localisation apicale/basale au niveau de la membrane cellulaire). Les jonctions adhérentes sont latérales et sont formées principalement par des cadhérines et des  $\beta$ -caténines. Enfin, les desmosomes sont localisés baso-latéralement, ils sont formés par des glycoprotéines membranaires et permettent la liaison avec les filaments d'actine. Chez la drosophile ou chez les mammifères, l'épithélium intestinal est entouré par le muscle lisse viscéral permettant un renforcement physique des cellules épithéliales.

### III-3 Homéostasie cellulaire intestinale

En assurant son rôle de digestion et d'absorption des aliments ingérés, l'épithélium intestinal est constamment soumis à des agents agresseurs ingérés avec la nourriture (bactéries allochtones, toxines, virus, produits chimiques...). Pour maintenir son homéostasie intestinale, les pathogènes et les différents agresseurs doivent être éliminés par une réponse immunitaire locale efficace et par la régénération intestinale rapide bien contrôlée (Garrett et al., 2010; Lee et al., 2013). Dans le même temps et dans la mesure du possible, la flore commensale doit, elle, être préservée. Chez l'homme, le renouvellement complet de l'intestin se fait en 12 jours en moyenne. Une dérégulation des différents processus permettant le maintien de l'homéostasie intestinale peut engendrer différents types de pathologies (infections intestinales, désordres métaboliques, maladies inflammatoires intestinales, voire des cancers colorectaux), (Apidianakis and Rahme, 2011; Garrett et al., 2010).

Chez la drosophile, les voies de signalisation contrôlant l'homéostasie cellulaire intestinale sont bien caractérisées, et il se trouve que plusieurs de ces voies sont conservées chez l'homme. Dans la revue ci-dessous, nous avons fait une synthèse bibliographique des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'homéostasie intestinale en absence de stress (maintien des ISC, prolifération des ISC, différenciation des EB) et les facteurs intrinsèques et extrinsèques régulant cette homéostasie (aliments disponibles, horloge circadienne...). De plus, nous avons décrit quelques travaux qui valident l'intestin de la drosophile comme modèle pour étudier certaines pathologies intestinales chez l'homme.

## **Revue Pasco et al., 2015**

Revue 1: "*The cellular homeostasis of the gut: what the Drosophila model points out*". Histol. Histopathol. 2014. Matthieu Y. Pasco, Loudhaief Rihab. and Gallet Armel

## Review

# The cellular homeostasis of the gut: what the *Drosophila* model points out

Matthieu Y. Pasco\*, Rihab Loudhaief\* and Armel Gallet

Sophia Agrobiotech Institute, UMR INRA 1355/CNRS 7254/Nice -

Sophia Antipolis University, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex - France

\* These authors contribute equally to this work

**Summary.** The digestive tract is subjected to many aggressions throughout animal life. Since disruptions of gut physiology impact on animal fitness and survival, maintenance of gut integrity and functionality is essential for the individual. Over the last 40 years, research on rodents has aimed at understanding how cellular homeostasis of the digestive tract is maintained when challenged with disruptions. Following the discovery of stem cells in the digestive tract of *Drosophila*, a flurry of studies made an important contribution to our understanding of how the proliferation and the differentiation of these cells are controlled and participate in the renewal of the digestive tract. Insights into these mechanisms in *Drosophila* have revealed many similarities with mammalian intestinal stem cells. For instance, the highly conserved EGFR, JAK/STAT, Wingless/Wnt, Hedgehog, Integrins, BMP/TGF $\beta$ , Hippo and Insulin pathways all participate in adult intestinal cellular homeostasis. Here, we provide a literature review of recent advances in the field highlighting the adult *Drosophila* midgut as a convenient model for dissecting mechanisms involved in the maintenance of the cellular homeostasis of the digestive tract in conventionally reared conditions. In addition, we shed light on recently published data putting *Drosophila* forward as a genetic tool to decipher the mechanisms underlying intestinal diseases and intestinal tumour

progression.

**Key words:** Intestinal homeostasis, Stem cell maintenance, Symmetric and asymmetric division, Intestinal diseases, Cancers

---

### Introduction

Gut physiology appears essential for the development, fitness and health of animals. One of the main functions of the digestive tract (DT) is food digestion and subsequent uptake of nutrients essential for life. The intestine is an organ endowed with an innate immune response and acts as a first barrier against ingested pathogens. It is therefore increasingly recognized that intestine function is essential for animal and human longevity. Chronic intoxications (due to bacteria, virus, toxins, chemicals...) inducing injuries of the gut promote inflammation, chronic diseases or even, in the worst cases, cancers (Radtke and Clevers, 2005; Gersemann et al., 2011; Ren and Fang, 2011; Rizzo et al., 2011; Sun and Irvine, 2011). Moreover, genetically predisposed organisms are more susceptible to develop bowel diseases or cancers upon chronic infection of the digestive tract (Garrett et al., 2010; Apidianakis and Rahme, 2011; Christofi and Apidianakis, 2013). Aging is also characterized by an overall decline of the intestinal immune function and tissue homeostasis maintenance that in turn can affect lifespan due to the occurrences of diseases (failure of nutrient absorption, susceptibility to infection and superinfections, cancers,

---

Offprint request to: Armel Gallet, Institut Sophia Agrobiotech, UMR INRA 1355/CNRS 7254/Université Nice Sophia-Antipolis, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France. e-mail: [gallet@unice.fr](mailto:gallet@unice.fr)

etc...), especially in humans whose average lifespan lengthens (DeVeale et al., 2004; Rossi et al., 2008; Biteau et al., 2008, 2010; Alper, 2010).

In order to keep its physiological functions at an optimum throughout life, the DT has to maintain its integrity and functionality as long as possible. This is what we refer to as homeostasis. Since the mid 70's, a flurry of studies carried out in vertebrates has provided significant insight into how gut integrity and physiology are maintained over time. The initial discovery was the identification of somatic stem cells residing in adult tissue capable of renewing all the differentiated cells types of the intestine (Cheng and Leblond, 1974). Although the main discoveries on gut renewal were successfully carried out in vertebrates (Radtke and Clevers, 2005; Barker et al., 2012; Vanuytsel et al., 2013), these do not provide a convenient system for studying gut replenishment in response to many different experimental or environmental challenges, being both expensive and time consuming. The discovery of intestinal stem cells in the *Drosophila* adult DT a few years ago has put forward flies as a system for studying DT homeostasis (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006). Hence, in this review, we will outline all the recent advances made in adult intestinal homeostasis using *Drosophila* as a system model. To avoid overlap with the numerous reviews describing the molecular events triggered in response to gut damage (Charroux and Royet, 2010; Apidianakis and Rahme, 2011; Biteau et al., 2011; Lucchetta and Ohlstein, 2012; Christofi and Apidianakis, 2013; Hombria and Serras, 2013), herein we will focus on how the *Drosophila* gut renews its epithelium and controls cellular homeostasis at steady state conditions. We will also discuss how external factors may challenge gut homeostasis. Finally we will put forward some examples showing the usefulness of the *Drosophila* model to understand mechanisms involved in human intestinal diseases and cancers.

### ***Drosophila melanogaster* as a system model**

Most of the studies in *Drosophila* have been made in the central part of the adult DT, the midgut, and more particularly in a region of the posterior midgut called R4 (Buchon et al., 2013) (<http://flygut.epfl.ch/>) or P1-P2 (Marianes and Spradling, 2013). This region is mainly involved in the absorption of nutrients derived from food previously digested in the anterior midgut and central acidic region (Buchon et al., 2013; Marianes and Spradling, 2013). The R4 region also participates to the reabsorption of electrolytes (Shanbhag and Tripathi, 2009). Therein, the *Drosophila* posterior midgut physiologically resembles the small intestine of vertebrates.

At the tissue level, the *Drosophila* posterior midgut displays an apico-basal arrangement of its cell-cell junctions similar to what is observed in the mammalian DT with the septate junction (acting as the vertebrate

tight junction) positioned apical to the adherens junction. By contrast, in the *Drosophila* anterior midgut the position of the septate and adherens junctions are reversed (Baumann, 2001; St Johnston and Ahringer, 2010; Goulas et al., 2012;). Moreover, while the vertebrate small intestine looks like “roller coaster” with alternating crypts and villi, the *drosophila* midgut displays a flat architecture.

The cellular composition of the *drosophila* intestine closely resembles that of vertebrates. There are roughly three types of cells: the progenitor cells, the secreting cells and the absorptive cells. The *drosophila* midgut is made of the Intestinal Stem cells (ISCs) and the Enteroblasts (EBs) (ISC+EB make up the progenitor cells), the secretory enteroendocrine cells (ee) and the absorptive Enterocytes (ECs) (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006). In *Drosophila*, ISCs are located basally in the epithelium. They are the only cells undergoing mitosis and the only supply of cells for gut replenishment. The EBs, the daughter cells of the ISCs, differentiate into either ECs (90% of the differentiated cells) or ee (10% of the differentiated cells). In vertebrates, ISCs, upon mitosis, give birth to transient-amplifying (TA) cells that are capable of undergoing 3 to 4 more divisions over a period of 2-3 days. Progenitor cells are located in the crypts with ISCs at the bottom and TA cells just above. These TA cells acquire their fate choice (absorptive vs. secretory lineage) soon after birth while migrating upwards of the villus (Takashima et al., 2013).

ECs are the main cell type of the *Drosophila* midgut. As in vertebrates, they are involved in the absorption of nutrients and water. Their apical surface is covered by microvilli (forming the brush border) and faces the lumen of the intestine (Shanbhag and Tripathi, 2009). In vertebrates most of the digestive enzymes are secreted by other organs (salivary glands, stomach and pancreas), while in *Drosophila* this function is mainly fulfilled by the ECs (Buchon et al., 2013; Marianes and Spradling, 2013). In addition, *Drosophila* ECs are involved in the production of antimicrobial peptides, whereas in vertebrates the Paneth cells are specifically dedicated to this function (Santaolalla and Abreu, 2012). Finally, ee are chemosensory cells secreting peptide hormones regulating gut physiology, food intake, metabolisms and probably behaviour in response to luminal contents (Veenstra et al., 2008; Tolhurst et al., 2012). In vertebrates, Goblet cells secrete luminal mucus involved both in the protection of gut lining and the intestinal transit. In *Drosophila*, the peritrophic membrane (secreted by the ECs) replaces mucus and functions to protect the gut (Kuraishi et al., 2011). Despite these small differences, *Drosophila* is a convenient model for studying the cellular and molecular mechanisms governing gut homeostasis due to the simplicity of its gut architecture (Shanbhag and Tripathi, 2009), the conservation of the signalling pathways (Vanuytsel et al., 2013; this review) and the multitude of existing tools (Singh et al., 2012).

## ISC maintenance

While ISCs give birth to EBs, they also have to maintain their own pool during the entire lifespan: this is what we call ISC maintenance. First and most essential for ISC maintenance is their survival. Intriguingly, many studies have observed that most of the signalling pathways that are involved in the control of ISC division (e.g. Wg/Wnt, EGFR, JAK/STAT, Hippo, Integrins and BMP signalling pathways, see below) are not required for ISC survival, since inhibiting these pathways individually or in combination does not promote ISC death (Lin et al., 2008, 2010, 2013; Karpowicz et al., 2010; Liu et al., 2010; Biteau and Jasper, 2011; Xu et al., 2011; Tian and Jiang, 2014). This suggests that, at steady state, ISC might be immortal. However, it was shown that the transcription factor FOS is required for ISC survival, since, in its absence, ISCs are rapidly lost and this can be rescued by the overexpression of the anti-apoptotic protein p35 (Biteau and Jasper, 2011). Furthermore, Buchon et al. (2009) observed that silencing of the transcription factor c-jun in ISC/EB promoted loss of ISC. Interestingly, both FOS and c-Jun act downstream of the JNK signalling pathway which is known to exert a cytoprotective activity, enabling cells to survive stress (Shaulian, 2010). In agreement with this, Bond and Foley (2012) observed that inhibiting the JNK kinase in ISCs reduced their number in the midgut. These results suggest that the JNK signalling pathway may be involved in ISC survival, though further investigations are necessary to definitively prove the implication of the JNK signalling in ISC survival.

### *Symmetric or asymmetric division, what makes the choice?*

One of the main questions concerning ISC homeostasis is to understand how the choice of symmetrical or asymmetrical division is made. The answer is of prime importance, because symmetrical division generates either two short-lived EB daughter cells, which can induce a loss of ISCs, or two ISC daughter cells with unlimited potential to divide, giving rise to stem cell tumours. By contrast, an asymmetric division allows the self-renewal of the ISC as well as replenishment of dying differentiated cells.

Many observations suggest that in *Drosophila* midgut the main mode of ISC division is asymmetric. Using ISC lineage tracing, four independent labs have recently estimated that 2/3 of ISCs divide asymmetrically while 1/3 of ISCs divide symmetrically with a stochastic compensatory neutral drift where the loss of ISC, owing to EB cell fate choice, is compensated for by the appearance of two new ISCs due to the symmetrical division of the neighbouring ISC (O'Brien et al., 2011; de Navascues et al., 2012; Goulas et al., 2012; Tian and Jiang, 2014).

At the level of ISC, the mechanism making the choice between symmetric vs. asymmetric division

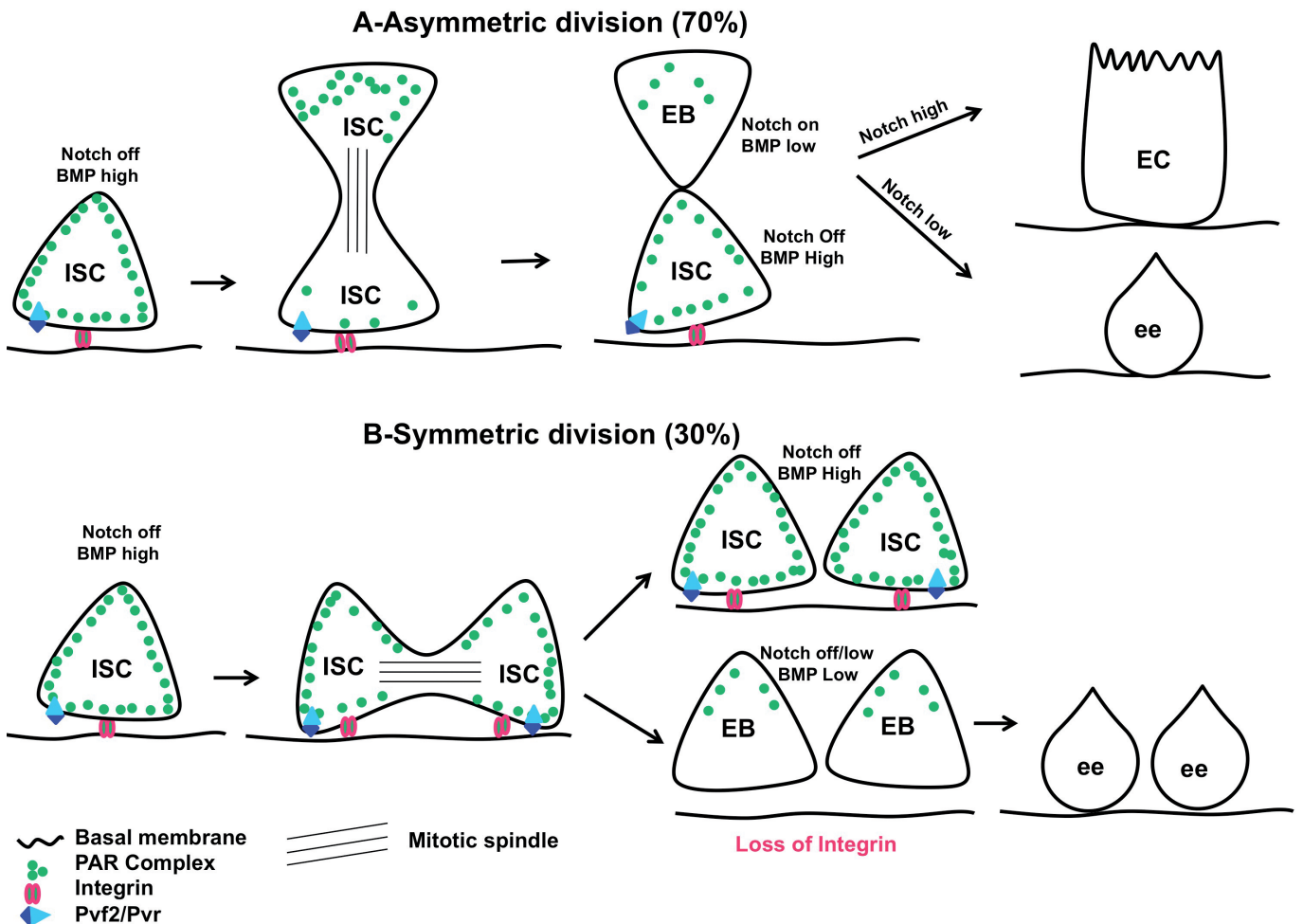
begins to be unravelled (Fig. 1). At least in *Drosophila*, Notch signalling appears to play an important role in this choice. Thus, the transmembrane ligand, *Delta*, which is only expressed by the ISCs, binds to its receptor, Notch, on neighbouring EBs. Upon asymmetric division, the ISC daughter cell maintains the expression of *delta*, while the EB daughter cell expresses Notch target genes and down regulates *delta* expression (Ohlstein and Spradling, 2007; Maeda et al., 2008; Perdigoto et al., 2011). Accordingly, inhibiting either *delta* expression in ISC or N signalling in EB promotes ISC tumours (e.g. too much ISC/ISC symmetric division) (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007). Allison Bardin and Colleagues have beautifully demonstrated that the activation of Notch signalling in EB is necessary to repress the activity of two transcription factors, *Hairless* and *Daughterless*, involved in ISC proliferation. Thus, the inhibition of *Hairless* or *Daughterless* in ISCs promotes their disappearance and differentiation into EBs. Moreover, *delta* expression is lost in *hairless* mutant ISCs. Conversely, *Hairless* overexpression increases the number of dividing ISCs (Bardin et al., 2010). By subtly manipulating Notch activity levels, they further demonstrated that a high level of Notch signalling is required in one of the two daughter cells for it to commit to an EB fate (Perdigoto et al., 2011). Therefore, once the ISC has completed its mitosis, one daughter cell keeps the expression of *Delta* (the future ISC) while the other daughter cell (the future EB) strongly activates the Notch pathway. The activation of Notch limits symmetrical division by repressing factors involved in proliferation, allowing the cell to exit the cell cycle and commit in a process of differentiation (Fig. 1).

It was recently shown that the BMP and Notch signalling pathways act antagonistically (Tian and Jiang, 2014). First, the BMP signalling is asymmetrically activated with a strong activation in ISC and a low activation in EB. Second, suppressing BMP signalling in ISC promotes symmetric EB/EB divisions at the expense of both asymmetric ISC/EB and symmetric ISC/ISC (as observed in absence of Notch signalling in EB, see above) divisions. Third, over-activation of BMP signalling in ISC promotes symmetric ISC/ISC divisions, which can be suppressed by concomitant over-activation of Notch signalling. Conversely, inhibiting Notch signalling suppresses the loss of BMP signalling (e.g. the symmetric EB/EB division) and even promotes the appearance of small clusters of ISC (e.g. the loss of Notch signalling phenotype) (Tian and Jiang, 2014). Therefore the levels of activation of these two pathways within ISC and EB fine-tune the cell fate choice of the progenitor daughter cells (Fig. 1). Interestingly, while *Delta* is a transmembrane ligand intrinsically produced by the ISC only able to bind to its receptor, Notch, in neighbouring cells (through cell-cell contact), BMP ligands originate from many sources (visceral mesoderm, trachea and EC, see below) and act at a distance. Therefore, these two ligands allow the

integration of information derived from different cells, compartments, and tissues, enabling a tight control of the mode of ISC division according to micro-environmental cues.

Interestingly, the *Drosophila* PDGF/VEGF-like signalling pathway, Pvf2/Pvr, is also implicated in EB cell fate choice. The ligand Pvf2 and its receptor Pvr are both expressed in ISC, and their absence inhibits the commitment of ISCs toward EBs (Choi et al., 2008; Bond and Foley, 2012). Whether there is a dialog between Notch, BMP and Pvf2/Pvr signalling to control ISC asymmetric division is not yet known.

One interesting question is how the decision to make symmetric or asymmetric division is made by the dividing cells. During *Drosophila* embryonic neurogenesis, the Par complex is responsible for the asymmetric division of neuroblasts and is itself asymmetrically localized inside the neuroblasts. During mitosis, the Par complex interacts with the mitotic spindle to orient it along the apico-basal axis and then segregates with the neuroblast daughter cells (Prehoda, 2009). Interestingly, the Par complex is also expressed in ISC and EB of the adult midgut. During ISC mitosis, it is apically located and then inherited by the



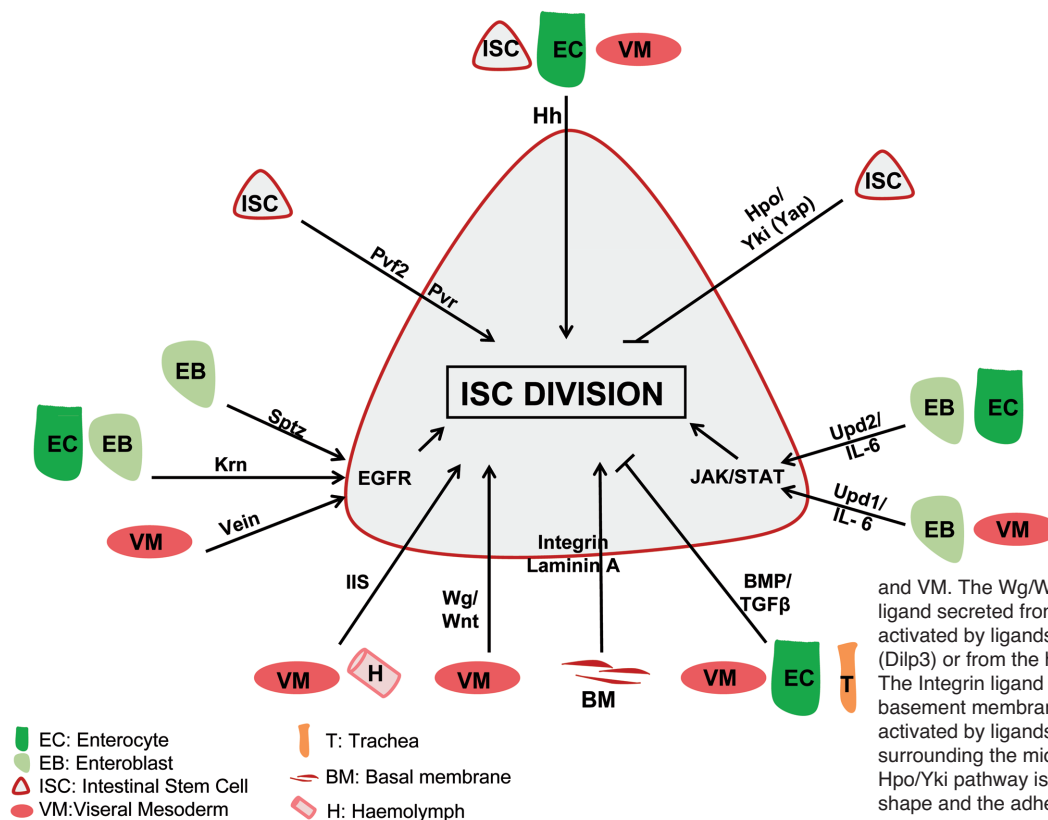
**Fig. 1.** Symmetric or asymmetric division, what is making the choice? **A.** Asymmetric division: At steady state, 70% of ISCs divide asymmetrically. Both BMP and Notch signalling are asymmetrically activated with BMP signalling ON in ISC and Notch signalling ON in EB. While the Par complex is uniformly distributed in ISC, it becomes asymmetrically localized during ISC mitosis where it is more apically distributed. The Par complex is necessary to orient the mitotic spindle perpendicular to the basement membrane. Whereas the Integrins are required to keep the ISC attached to the basement membrane (the stem cell niche), a sine qua non condition to maintain the stemness, the most apical daughter cell will become an EB. The *Drosophila* PDGF/VEGF-like signalling pathway Pvf2/Pvr is necessary for the EB cell fate choice. Then the EB will further differentiate either into enterocyte (EC) or enteroendocrine cells (ee) depending on the level of Notch signalling activity. **B.** Symmetric division: At steady state, 30% of ISCs divide symmetrically because of orientation of the mitotic spindle parallel to the basement membrane. Both daughter cells will be either ISCs or EBs. If the daughter cells remain attached to the basement membrane (the stem cell niche) thanks to Integrins, they will stay ISCs. In absence of Integrins, daughter cells move away from the basement membrane and they will become EBs. Because of the low level of Notch signalling activity due to the absence of the ligand Delta (normally expressed at the surface of ISC), the twin EB will differentiate into ee.

## Cellular homeostasis of the gut

differentiating EB (Fig. 1). Silencing components of the Par complex in ISC abrogates the apico-basal orientation of the mitotic spindle that becomes more parallel oriented to the basement membrane. As a consequence, the development of small ISC and ee tumours is observed (Goulas et al., 2012), suggesting that in the absence of Par complex, ISC divides symmetrically giving rise to two identical daughter cells, as is the case upon loss of Notch signalling (see above). Moreover, silencing Integrins (implicated in the attachment of gut lining to the basement membrane (Wolfenson et al., 2013)) in ISC impairs both the asymmetric localization of Par complex components and the orientation of the mitotic spindle (Goulas et al., 2012). Therefore Integrins appear to regulate the mode of ISC division through the asymmetric localization of the Par complex, which in turn will orient the mitotic spindle to promote asymmetric division (Fig. 1). Under homeostatic conditions, one can imagine a model in which Integrins are required to maintain ISC close to the stem cell niche (the niche being defined as the microenvironment providing all the signals, cytokines, and cellular interactions and architecture necessary for the maintenance of stem cell properties (Scadden, 2014)). During mitosis, the Integrins and the Par complex allow the orientation of the mitotic spindle along the apico-basal axis thereby retaining the basal daughter cell in the

vicinity of its niche to maintain its stemness. Instead, the apical daughter cell moves away from the niche and commits to differentiation. When the orientation of the mitotic spindle is aligned to the basement membrane the ISC divides symmetrically and both daughter cells become either ISCs or EBs (Fig. 1). If the daughter cells remain close to the basement membrane, they stay ISC, if they move away from it, they become EBs (Fig.1). In agreement with this Goulas et al. (2012) observed that a small fraction of mitotic structures displays a symmetric distribution of the Par complex that might correspond to the 30% of symmetric division normally observed (O'Brien et al., 2011; de Navascues et al., 2012; Goulas et al., 2012; Tian and Jiang, 2014). Knowing that BMP signalling is required for the stemness of ISC (Tian and Jiang, 2014), it would be interesting to determine whether BMP signalling might regulate factors such as Integrins in ISC allowing, first, to keep the ISC attached to the basement membrane (and therefore close to its niche) and, second, the apico-basal orientation of the mitotic spindle to promote asymmetric division.

It is not yet known whether Integrins play a similar role in vertebrates, but it has been shown that knocking down one of the numerous Integrin subunits in mouse induces ISC proliferation (Jones et al., 2006). It is also interesting to note that although a function of the Par-complex in ISC mitosis has yet to be demonstrated in



**Fig. 2.** Control of ISC division.

Many signalling pathways emanating from many sources are involved in the control of ISC division. Some pathways stimulate the ISC division such as EGFR, Pvf2/Pvr, JAK/STAT, Hh, Wg/Wnt, IIS, and Integrins while Hpo/Yki and BMP/TGFβ pathways restrain ISC division. The EGFR ligands (Vein, Sptz and Krn) are secreted from the Visceral Mesoderm (VM), the enteroblasts (EB) and the enterocytes (EC). Pvf2/Pvr pathway acts autonomously in ISC. The JAK/STAT pathway is activated by Upd/IL-6 ligand coming from the EB, EC and the VM. The Hh pathway is activated by the Hh ligand originating from the EC, ISC

and VM. The Wg/Wnt pathway is activated by a ligand secreted from the VM. The IIS pathway is activated by ligands coming either from the VM (Dilp3) or from the haemolymph (Dilp2 and Dilp5). The Integrin ligand Laminin A is a component of the basement membrane. BMP/TGFβ signalling is activated by ligands expressed in the tracheas surrounding the midgut, in the EC and in the VM. Hpo/Yki pathway is activated by factors sensing the shape and the adhesiveness of the cells.

vertebrates, it is asymmetrically located at the apical surface of mouse ISC (Quyn et al., 2010). Recently, it has been shown that mice ISCs preferentially divide symmetrically giving birth to either two ISCs or to two TA cells. There is also a phenomenon of neutral drift to maintain the right number of ISCs (Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010). However, regarding the orientation of the mitotic spindle, nothing is yet clear. Indeed Lopez-Garcia et al. (2010) found that the mitotic spindle of ISC in the mouse crypt base can adopt all possible angles with respect to the apico-basal axis of the crypt (with about 20% oriented parallel to apicobasal axis) while Quyn et al. (2010) found that the mitotic spindle of dividing ISCs in the crypt base of the mouse and human small intestine is mainly oriented along the apicobasal axis (55% and 60% respectively). Thus, it has been proposed that even though the spindle is oriented perpendicular to the epithelial sheet, the daughter cells do not end up in divergent locations due to the spatial constraints of the crypt epithelium. As a consequence, each daughter cell remains in contact with their niche and hence would not adopt different fates (Snippert et al., 2010).

### Control of ISC division

In healthy animals, the gut is completely renewed in about 8 days whether it is in *Drosophila* or in vertebrates (Ohlstein and Spradling, 2006; Jiang et al., 2009; Choi et al., 2011). Old ECs are eliminated and replaced by new ones derived from progenitor cells. This potential for self-renewal is due to the capacity of ISC to divide and give rise to daughter cells committed to the differentiation fate on a nearly daily basis. Understanding what is controlling ISC division is of prime importance, since it is now well established that overproliferation of stem cells promotes cancer (Radtko and Clevers, 2005). Studies of *Drosophila* gut homeostasis have highlighted many conserved signalling pathways involved in the control of ISC division (Fig. 2).

#### EGFR signalling

One of the main signalling pathways involved in the stimulation of ISC division is the EGFR pathway. In *Drosophila*, there are three EGFR ligands expressed in the intestine: Vein, Spitz and Keren. At steady state, Vein is expressed in the visceral mesoderm (VM) surrounding the gut epithelium (Biteau and Jasper, 2011; Jiang et al., 2011; Xu et al., 2011), Spitz is expressed in EB (Buchon et al., 2010; Xu et al., 2011) and Keren is expressed in both EB (Xu et al., 2011) and EC (Jiang et al., 2011) though they are present at low levels. All three ligands activate the EGFR pathway in ISCs through the activation of the small GTPase Ras and the kinase ERK that further phosphorylates the transcription factor FOS (Ren et al., 2010; Biteau and Jasper, 2011; Jiang et al., 2011; Xu et al., 2011). A prolonged inhibition of EGFR

signalling in ISCs causes them to be almost completely depleted after 4 weeks. The disappearance of ISCs is not due to cell death, but to their commitment toward the differentiation. Although Vein is probably the most important ligand for stimulating ISC division, the three ligands are somewhat redundant. Thus, after two weeks of inhibition of vein expression in the VM, the number of ISC is maintained even though the number of both ISC mitotic figures and EBs is reduced (Biteau and Jasper, 2011; Jiang et al., 2011; Xu et al., 2011). Interestingly a similar function for the EGFR/ErbB signalling pathway was recently identified in vertebrates (Wong et al., 2012).

Another EGFR related signalling pathway, the Pvf2/Pvr pathway, is also involved in the control of ISC division. It has been shown that inhibiting this pathway in ISCs slows down their division (Choi et al., 2008; Bond and Foley, 2012) and, as Pvf2/Pvr is also involved in ISC commitment toward EB (see above), small clones of ISC, which will never differentiate, accumulate over time (Bond and Foley, 2012). Interestingly, the small Ras GTPase (Bond and Foley, 2012) and the p38b MAPK (Park et al., 2009) were recently shown to act downstream of Pvr in ISC. Therefore cross talk between the EGFR and Pvf2/Pvr pathways at the level of Ras might exist allowing ISC division to be tightly controlled.

#### JAK/STAT signalling

While in vertebrates there is a wide array of cytokines activating the JAK/STAT pathway (Quintas-Cardama and Verstovsek, 2013), in *Drosophila* there are just 3 ligands named Unpaired (Upd), Upd2 and Upd3. At steady state, only Upd is expressed and secreted by both the VM surrounding the midgut (Lin et al., 2010) and the EB (Liu et al., 2010; Osman et al., 2012). Consequently the JAK/STAT pathway is activated, though weakly, in both ISC and EB (Buchon et al., 2009; Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010; Liu et al., 2010; Ren et al., 2010). Whereas it is generally accepted that over-activation of the JAK/STAT pathway in ISCs increases their rate of division (Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010; Lin et al., 2010; Liu et al., 2010; Xu et al., 2011), the effect of inhibiting JAK/STAT signalling is less clear. Some studies show that inhibiting the JAK/STAT pathway in ISCs does not alter their division (Buchon et al., 2009; Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010), whereas other groups find that ISCs disappear from the gut epithelium in the absence of JAK/STAT signalling in ISC (Lin et al., 2010; Liu et al., 2010; Xu et al., 2011) or upon inhibition of Upd production in EB (Osman et al., 2012). Interestingly, these later experiments monitored the presence of ISCs over a longer period and found ISCs to disappear after inhibiting JAK/STAT signalling in ISC for 3 weeks or more. These discrepancies suggest that either the inhibition of JAK/STAT signalling is not efficient enough in all the above experiments, explaining why a

longer period is necessary to observe the loss of ISCs, or (and) that other parallel pathways could partially compensate for the lack of JAK/STAT signalling in ISC. Although these two possibilities are not exclusive, there is a line of evidence sustaining the "compensatory" hypothesis. Indeed, the inhibition of EGFR signalling in ISC suppresses the JAK/STAT pathway overexpression-dependant ISC division. Reciprocally, the absence of JAK/STAT signalling in ISC abolishes the EGFR-dependent ISC mitosis (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2011; Xu et al., 2011). Noteworthy, in mammals, the STAT3 pathway seems to play a role in stimulating ISC proliferation (Grivennikov et al., 2009; Pickert et al., 2009).

#### *Wingless (Wg)/Wnt signalling*

In *Drosophila* (see below), as well as in vertebrates (Vanuytsel et al., 2013), the Wg/Wnt pathway is involved in the stimulation of ISC division. Indeed Wg/Wnt is secreted from the VM and activates signalling in ISC. Removing Wg from the VM or the intracellular components of the Wg/Wnt pathway within ISC reduces the rate of ISC division (Lin et al., 2008; Cordero et al., 2012b). Wg/Wnt signalling probably acts through the regulation of its target gene *myc* (Cordero et al., 2012b), which encodes a transcription factor involved in cell cycle regulation in both vertebrates and invertebrates. In agreement with this, it was recently shown that Myc is involved in ISC division at steady state, since silencing *myc* in ISC blocks their division (Ren et al., 2013). Interestingly, in ISC, *myc* is also a transcriptional target of the EGFR, JAK/STAT and Hpo/Yki (see below) pathways (Cordero et al., 2012a; Ren et al., 2013) and might be a convergent target gene of many signalling pathways controlling ISC division. This overlapping regulatory system of *myc* transcription may circumvent any deficiency in one of the aforementioned pathways. In line with this, the loss of ISCs caused by the inhibition of Wg signalling can be rescued by the overexpression of intracellular components of EGFR pathway in ISC. Conversely, the reduced rate of ISC division owing to the loss of EGFR signalling is rescued by overexpressing intracellular components of the Wg pathway within ISC (Xu et al., 2011). However *myc* is probably not the sole endpoint of these pathways to control ISC division since overexpression of Wg, Upd or EGFR ligands, but not Myc (Ren et al., 2013), is sufficient to induce ISC proliferation (Lin et al., 2008, 2010; Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010; Buchon et al., 2010; Liu et al., 2010; Jiang et al., 2011; Xu et al., 2011). This suggests that other activated downstream factors or target genes of these pathways participate in the stimulation of ISC division in conjunction with Myc.

#### *Hedgehog signalling*

There is one Hedgehog (Hh) ligand in *Drosophila*

and three in mammals. Hh peptides are novel cholesterol-linked secreted morphogens that are involved in many developmental processes (Gallet, 2011). Very recently Hh signalling was found to control ISC division in the adult *Drosophila* midgut (Li et al., 2014). Thus, the authors demonstrated that down-regulating Hh signalling in ISCs reduced their rate of division. Noteworthy, the source of Hh ligand comes from different origins, *hh* being expressed in the VM as well as in EC and ISC. Consequently, *hh* had to be silenced in all of these sources to observe a decrease in ISC proliferation (Li et al., 2014). Interestingly Hh is also involved in the regulation of ISC proliferation in vertebrates, although, contrary to the *Drosophila* gut, Hh peptides repress ISC proliferation (Vanuytsel et al., 2013).

#### *Integrins*

Very recent data in *Drosophila* show that the focal adhesion molecule Integrin, (Wolfenson et al., 2013) and more particularly the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta PS$  Integrin subunits, accumulate at the basal surface of ISC contacting the basement membrane (Goulas et al., 2012; Lin et al., 2013). Furthermore, Lin et al. (2013) observed that ISC mutant for Integrin subunits rapidly disappeared. This loss is probably due to both the slowdown of ISC division and, with time, the differentiation of non-dividing ISCs, since no ISC death was observed. Moreover, the Integrin ligand Laminin A and the downstream signalling components Talin and Integrin-linked kinase are also required for ISC division. A recent study using RNAi-targeted knockdown of the  $\beta PS$  subunits confirmed the role of Integrins in controlling ISC division (Okumura et al., 2014). Surprisingly, individual overexpression of components of the EGFR, JAK/STAT or Wg/Wnt signalling pathways did not rescue the Integrin-dependent loss of ISCs (Lin et al., 2013). It is likely that adhesion of ISCs to the basement membrane maintains them close to the VM that provides many of the cytokines/growth factors required for their division. Impairing ISC adhesion moves ISCs away from their niche, rendering them unable to perceive growth factors emanating from the VM. Strikingly, and in contrast to these results, Goulas and colleagues (2012) observed, using RNAi constructs targeting Integrin subunits or intracellular components of the Integrin signalling pathway, an increase in ISC division. How could one reconcile these opposing data? One could assume that the RNAi used by Goulas and colleagues (2012) impairs asymmetric cell division (see above), but not ISC adhesion to the basement membrane. As a consequence, the two daughter cells would still have enough Integrins to remain in their niche and stay ISC. Conversely, in ISC bearing *integrin* null mutant alleles, there are no functional Integrins to maintain the two daughter cells close to their niche, and as a result they become EBs (Fig. 1).

In vertebrates, the survival and the control of the

division of ISC also require signals and interactions emanating from the underlying mesenchyme (Yeung et al., 2011). It would be interesting to know whether Integrins play a similar role in controlling ISC division in vertebrates.

### *BMP/TGF $\beta$ signalling*

So far, we have only described signalling pathways involved in the stimulation of ISC division. However, to avoid any ISC overproliferation, which could cause breakdown of gut epithelium and ultimately give rise to tumours, some negative feedback mechanisms are necessary.

In vertebrates, the activation of BMP/TGF $\beta$  signalling plays a role in regulating ISC division. BMP is secreted from the underlying mesenchyme and signals to the gut epithelium to restrict ISC proliferation (Vanuytsel et al., 2013). Interestingly, such mechanisms appear to be conserved in *Drosophila* (Guo et al., 2013; Li et al., 2013a; Tian and Jiang, 2014). Three recent studies carried out in the *Drosophila* adult midgut show that the BMP pathway is strongly activated in EC and ISC (Guo et al., 2013; Li et al., 2013a; Tian and Jiang, 2014). Decreasing the level of BMP signalling within ISC promotes ISC overproliferation (Guo et al., 2013; Tian and Jiang, 2014), though this effect seems indirect as it depends on the activation of the EGFR pathway within ISC (Guo et al., 2013; Li et al., 2013a).

Two BMP homologues, *Decapentaplegic* (Dpp) and Glass bottom boat (Gbb), are expressed in many different cell types in the *Drosophila* midgut. These ligands are expressed by the tracheal cells surrounding the midgut (Guo et al., 2013; Li et al., 2013a; Tian and Jiang, 2014), the VM (Guo et al., 2013) and EC (Tian and Jiang, 2014). Interestingly, Li et al. (2013) state that ISC proliferation is restricted by Dpp secreted from the tracheas while Guo and colleagues (2013) claim that the VM is the source of the functional Dpp. Finally, Tian and Jiang (2014) find that the Dpp/Gbb heterodimer is secreted by EC to control ISC proliferation. Hence, the functional source of BMP ligands in *Drosophila* is still controversial, and additional studies are needed to solve this discrepancy. In fact, it is possible that all the above BMP/Dpp-producing tissues could be involved in the restriction of ISC proliferation. In agreement with this, Tian and Jiang (2014) observed that Dpp::GFP expressed in EC is secreted on the basal side of the EC and accumulates between gut lining, the underlying basement membrane, and the VM. They further demonstrate a role of Collagen IV, a component of the basement membrane, in Dpp::GFP retention. Therefore, regardless of whether BMP ligands are secreted from the trachea, the VM or the EC, they accumulate at the basal side of the gut epithelium where ISCs lie. Accordingly, the ISC niche not only includes many factors stimulating ISC division (EGF, Wg/Wnt and Upd ligands), but also ligands (BMP) that negatively control ISC proliferation. Interestingly, it also seems that activation of the

JAK/STAT pathway in the VM directly or indirectly induces *dpp* expression (Guo et al., 2013). Hence, the activation of the JAK/STAT pathway promotes ISC division, but also stimulates the activation of the BMP signalling, which in turn restricts ISC division. Such a negative feedback mechanism prevents ISC overproliferation, which could have dramatic consequences for the gut physiology (e.g. hyperplasia of the epithelium or in the worst case, ISC tumours).

### *Hippo (Hpo)/Yorkie (Yki) signalling*

Another potential negative regulator of the ISC division is the well-conserved Hpo/Yki pathway (Badouel and McNeill, 2011). Activation of the pathway triggers a cascade of phosphorylation ultimately resulting in the phosphorylation of the transactivator Yki, which as a consequence is retained in the cytoplasm. Upon inhibition of the Hippo kinase, Yki is no longer phosphorylated and translocated into the nucleus to activate its target genes. Among them, some are involved in cell proliferation (Yu and Guan, 2013). In vertebrates as in invertebrates, the nuclear translocation of Yki (named Yap in vertebrates) has been implicated in the stimulation of ISC proliferation upon gut injury (Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010; Staley and Irvine, 2010; Vanuytsel et al., 2013). In the *Drosophila* midgut, down-regulating upstream components of the Hpo pathway or overexpressing *yki* in ISCs greatly increases the rate of ISC division owing to the activation of Yki target genes involved in cell proliferation (e.g. *myc*, *cycE*, and *Bantam*) or cell survival (e.g. *diap1*). However, silencing *yki* in ISC does not impact on ISC division rate (Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010; Poernbacher et al., 2012; Ren et al., 2013; Huang et al., 2014). Thus, in steady state conditions, the Hpo pathway is ON and retains Yki in the cytoplasm. Interestingly, it was recently shown that the chromatin-remodeling protein Brahma binds directly to Yki and acts downstream of the Hpo pathway to control ISC division. Silencing *brahma* in ISCs slows down their division and rescues the hyperproliferation induced by the inhibition of the Hpo pathway (Jin et al., 2013). Therefore at steady state, the main role of the Hpo pathway is to limit the activation of Yki target genes involved in cell proliferation (e.g. *Bantam*, *myc* or *cycE*), thereby keeping the level of ISC division low. Noteworthy, one of the Yki target genes, *Bantam*, is a microRNA (Huang et al., 2014). *Bantam* is expressed in both ISC and ee but, unlike *yki*, silencing *Bantam* in ISCs reduced their rate of division (without affecting the differentiation of EB into EC). This suggests that *Bantam*, like *myc*, could be the target of multiple signalling pathways involved in the control of ISC division. Therefore, it seems that positive and negative outputs from different signalling pathways are integrated at the level of the transcriptional regulation of genes involved in the control of cell cycle. The chromatin-

remodeling protein Brahma or the microRNA *Bantam* are good illustrations of such intermingled regulation allowing the adaptation of ISC proliferation to environmental cues.

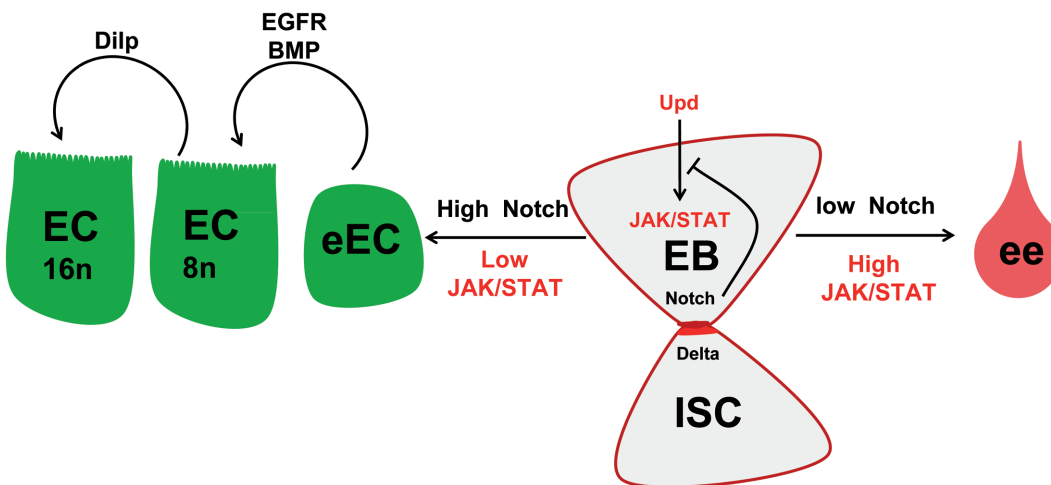
Interestingly, all the aforementioned signalling pathways are also activated upon bacterial intoxication. Indeed, many recent studies of the *Drosophila* midgut have shed light on the mechanisms involved in the restoration of gut integrity after exposure to various aggressions. In response to stressful challenges, such as infection of the gut by pathogenic bacteria, ISC proliferation is strongly increased. This regenerative response allows restoring large parts of the intestinal epithelium, allowing the individual to overcome the intoxication (for more details see these reviews and references herein: Lucchetta and Ohlstein, 2012; Pitsouli et al., 2009; Kuraishi et al., 2013).

### Progenitor cells and differentiation

Given that EB can differentiate into all the cell types making up the gut epithelium, what determines the fate choice of EB cells? In *Drosophila*, as in vertebrates, one major signalling pathway involved in this process is the Notch signalling pathway (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007). Thus, the transmembrane ligand Delta is expressed in ISCs and binds to its receptor Notch present at the surface of newborn EBs. This leads to the cleavage and intracellular relocalization of the Notch intracellular domain, activation of its target genes (Perdigoto and Bardin, 2013), and differentiation of EB into EC, which depends on high levels of Notch signalling. At lower levels of Notch activity, EB differentiates into ee (Fig. 3) (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007; Bardin et al., 2010; Beebe et al.,

2010). Peculiarly, many studies have observed ee occurring as doublets throughout the midgut (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006; Jiang et al., 2009; Perdigoto et al., 2011; our unpublished data). This phenomenon can be explained by symmetrical division of ISC giving rise to two EBs. In the absence of ISC expressing Delta, Notch is no longer strongly activated in the EB. Consequently the two EBs will differentiate into two ee staying in close proximity (Fig. 1). Interestingly, it has been proposed that a prolonged ISC-EB cell-cell contact is necessary to allow Notch signalling to reach the threshold necessary for the differentiation of EB into EC (Maeda et al., 2008). In agreement with this, the adherens junction molecules, DE-Cadherin and Armadillo/ $\beta$ Catenin, strongly mark the plasma membranes involved in the cell-cell contact between the ISC and the EB (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007; Maeda et al., 2008; Choi et al., 2011). Moreover, Maeda and colleagues (2008) observed that reducing ISC/EB cell-cell adhesion promotes either EB misdifferentiation or differentiation of EB into ee. Notably, Choi and colleagues (2011) did not observe such phenotypes though ECs appeared to be smaller than usual. Therefore, more work is required to decipher the relationship between cell adhesion and Notch signalling in the control of EB differentiation. Noteworthy, in the mammalian intestine, it is well-established that Notch signalling plays an important role in cell fate determination (Vanuysel et al., 2013).

JAK/STAT signalling is also involved in the cell fate choice made by EB. In the absence of JAK/STAT signalling, undifferentiated EBs accumulate (Buchon et al., 2009; Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010; Lin et al., 2010; Liu et al., 2010; Ren et al., 2010; Osman et al., 2012). In addition, the contributions of Notch and JAK/STAT signalling to the terminal differentiation of



**Fig. 3.** Enteroblast differentiation. The ligand Delta is expressed in ISCs and binds to the receptor Notch at the surface of the newborn EB. This leads to the activation of Notch target genes in the EB. A high level of Notch signalling is required for EB differentiation toward EC. At lower level of Notch, EB will differentiate into ee. At steady state, only the cytokine Upd1 is secreted and activates the JAK/STAT pathway in EB. A higher level of JAK/STAT signaling is required for EB differentiation toward ee compared to the lower level required for EB

differentiation toward EC. A high level of Notch signalling in EB diminishes the level of JAK/STAT activation. Conversely, a lower level of Notch signalling in EB enables a stronger activation of JAK/STAT pathway. Both EGFR and BMP/TGF $\beta$  signalling are involved in EC maturation. Finally the Insulin-like growth factor Dilp3 is required for EC growth (by increasing their ploidy) in presence of abundant food.

EB are interdependent, since each pathway regulates the expression of the ligand for the other pathway. Indeed, while JAK/STAT positively regulates the expression of *delta* in ISC (Jiang et al., 2009; Beebe et al., 2010), Notch signalling negatively regulates the expression of *upd* in EB (Liu et al., 2010). Consequently, a balance between the levels of activation of either pathway determines EB cell fate choice. Thus, a high level of Notch signalling in EB associated with a low level of JAK/STAT activation promotes differentiation of EB into EC. Conversely, low levels of Notch signalling in EB enable strong activation of the JAK/STAT pathway and promote EB differentiation into ee (Fig. 3) (Lin et al., 2010; Liu et al., 2010). A similar function for JAK/STAT signalling in vertebrates has yet to be identified.

Studies carried out in *Drosophila* also highlight the involvement of many other pathways in the terminal differentiation of EB into EC. The BMP and EGFR signalling pathways both contribute to EC maturation, as reduced BMP signalling slows down EC maturation (Li et al., 2013b; Tian and Jiang, 2014) and reduced EGFR signalling impacts EC shape (Buchon et al., 2010). Furthermore, BMP signalling also plays an anti-apoptotic role in EC (Li et al., 2013b). How Notch, JAK/STAT, BMP and EGFR signalling are coordinated to control EB differentiation and maturation remains unexplored, but *Drosophila* will be an ideal tool to carry out such studies.

### Extrinsic factors regulating midgut homeostasis

In this part, we detail a few novel mechanisms that may regulate ISC and cellular homeostasis of the gut. ISC proliferation, EB differentiation and EC turn-over are not only controlled by factors intrinsic to gut structure, but also by external factors including the circadian clock and nutrient availability.

#### Circadian clock

The circadian clock is an ancient molecular pathway that synchronizes organisms with daily environmental cues such as light intensity and temperature oscillations. Circadian rhythms are thought to influence the cell cycle, and there is some evidence that the clock plays a role in regeneration and proliferation. The *Drosophila* circadian pacemaker comprises the transcription factor partners Clock (CLK) and Cycle (CYC), which are negatively regulated by PER and Timeless (TIM). One transcriptional target of CLK/CYC is PER itself, which represses its own production and causes the cyc transcriptional rhythms that underlie circadian rhythms (Hardin, 2011). Interestingly, Karpowicz and colleagues (2013) observed that upon gut damage, ISC mitosis increases at dawn, suggesting the involvement of the circadian clock in gut damage response. They further observed an accumulation of *per* mRNA in the early evening, while PER normally accumulates in the nucleus

of ICS and EC in the late night/early morning. Then they also found that while, at steady state, the loss of the circadian clock does not alter cellular homeostasis of the gut, its absence (using mutants for *per* and *cyc*) affects regeneration of the gut lining in response to damage (Karpowicz et al., 2013) with the disappearance of the peak of mitoses and reduced rate of ISC proliferation and fly survival. It remains to be determined how the circadian clock is coupled with other signalling pathways involved in gut regeneration. In addition, it is not yet known whether the role of the circadian clock in gut regeneration is conserved in vertebrates. It is also possible that environmental inputs such as temperature could modulate ISC division. *Drosophila* likely provides a good model for deciphering the links between gut homeostasis and environmental conditions.

#### Nutrient availability and Insulin signalling pathway (IIS)

In *Drosophila* there are eight insulin-like peptides, designated Dilp1–8. These Dilps have unique properties, and varying tissue and temporal expression patterns, and established roles in adult physiology including regulation of gut homeostasis (Kannan and Fridell, 2013).

Interestingly in *Drosophila*, it was shown that nutrient availability modulates ISC division. Indeed, flies starved of protein have less ISC/EB than flies reared on a protein-rich diet. Nonetheless, refeeding quickly (in less than 4 days) increases the size of the gut and the number of ISC/EB back to levels comparable to those of control animals, indicating that ISC/EB number is tightly controlled by nutrition (McLeod et al., 2010; O'Brien et al., 2011). Accordingly, flies fed a rich diet have higher rates of ISC division than flies fed a poor diet (Choi et al., 2011; O'Brien et al., 2011). Moreover, the 2/3 asymmetric-1/3 symmetric ratio of ISC division is reversed in response to a diet rich in proteins allowing the gut to grow rapidly. In this condition, EB rapidly differentiate into ECs in order to adapt nutrient absorption to food availability. Upon food withdrawal, the ratio of asymmetric to symmetric division returns to normal and a wave of apoptosis takes place, thereby shrinking the gut (O'Brien et al., 2011). Hence the ratio of asymmetric to symmetric divisions of ISC is not fixed, as initially thought, but can be modulated according to nutritional cues. The IIS pathway is therefore a good candidate for coupling food intake with ISC proliferation and gut growth. Accordingly, silencing *dInR*, encoding for the receptor of Dilps, or components of the IIS pathway in ISC/EB reduces the rate of ISC division (Amcheslavsky et al., 2009; Biteau et al., 2010; Choi et al., 2011; O'Brien et al., 2011).

Interestingly, compelling data highlight the fact that both a local and a systemic production of Dilps intervene to control ISC division, each source of Dilps likely responding to specific inputs. Systemic Dilps are secreted into the haemolymph by brain-specific neurons and ablating these neurons reduces ISC division

(Amcheslavsky et al., 2009; Biteau et al., 2010). Among the systemic Dilps secreted, dILP2 is probably involved in the systemic regulation of ISC division since its overexpression in brain neurons increases the rate of ISC division (Amcheslavsky et al., 2009). It has also been shown that feeding flies on a rich diet moderately increases the levels of *dilp2* and *dilp5* mRNA in the brain neurons, though their production is delayed relative to the change in diet (O'Brien et al., 2011). However, it was previously shown that the level of the transcription of *dilps* mRNA by brain neurons is not an efficient readout for monitoring systemic Dilps secretion (Geminard et al., 2009). Indeed, Dilps are stored in intercellular vesicles and are rapidly secreted (in less than 15min.) into the haemolymph in response to metabolic signals (Geminard et al., 2009).

Remarkably, Dilp3 was found to be quickly, strongly, and locally produced by the VM in response to a rich diet and this could be reversed upon withdrawal of food (O'Brien et al., 2011). Silencing *dilp3* in the VM decreases the rate of ISC division irrespectively of plentiful nutritional availability and conversely, the overexpression of *dilp3* in the VM stimulates ISC proliferation in fasted flies (O'Brien et al., 2011). It would now be interesting to investigate the relative importance of each source of Dilps (e.g. systemic vs. paracrine) in the regulation of ISC proliferation, whether they respond to identical cues and whether they can have redundant activities.

Nutrient availability could also be a major signal driving terminal differentiation, growth and death of EC. Indeed a protein-rich diet was shown to promote EC growth, owing to increased polyploidy (with a majority of 8n and 16n EC instead of 4n and 8n under normal conditions), and rapid EC turnover (1 week), while on poor diet, EC turnover slowed down during the first week and then ceased (Choi et al., 2011). Then the authors showed that activation of the IIS pathway in EC was responsible for their growth and rapid turnover in presence of rich food (Choi et al., 2011). Hence, the IIS pathway could function as a sensor coupling EB cell fate choice and EC growth with nutrient availability in the gut lumen. In line with this, the rapid local production of Dilp3 by the VM following food intake can, in addition to promoting ISC proliferation (see below), support EC growth and turnover (O'Brien et al., 2011).

Therefore, in the adult *Drosophila* midgut, ISCs interpret a nutrient cue to "break homeostasis" and drive growth of the gut when food is abundant. The niche (e.g. the VM) production of Insulin-like growth factor allows an immediate response while the systemic production of Insulin-like growth factor is likely involved in a long lasting adaptation of growth to nutrient availability. We can imagine a two step scenario in which the first step involves local production of Dilp3 in response to food abundance to rapidly increase organ size and nutrient absorption by the gut. In a second step, elevated levels of circulating Dilp2 and 5, which are secreted from brain neurons, in response to increased availability of nutrients

in the haemolymph, promotes growth of the whole individual and the storage of nutrients. The data described above using *Drosophila* could provide a foundation for future studies in vertebrates.

### ***Drosophila* as a tool to decipher intestinal diseases**

Various studies have demonstrated that failure to maintain cellular homeostasis and integrity of the gut contributes to the development of bowel diseases and/or cancers. The appearance of human gastrointestinal cancers is mainly caused by mutations occurring in components of the signalling pathways described above. It is likely that the high frequency of gastrointestinal malignancies reflects the importance of these signalling pathways (e.g. EGFR/Ras, Wg/Wnt, Notch, JAK/STAT, Hippo/Yki (YAP) and Hh) in controlling ISC division. Here, we will focus on some examples emphasizing the usefulness of *Drosophila* as a genetic tool to decipher the mechanisms underlying intestinal diseases.

For example, the tightly regulated process of ISC self-renewal controlled by Wg/Wnt signalling in stem and progenitor cells is subverted in cancer cells allowing malignant proliferation to take place (Reya and Clevers, 2005). Almost invariably, intestinal tumours carry activating mutations in the Wg/Wnt pathway, which mainly target tumour suppressor genes such as *APC*. Allelic loss and somatic mutations of *APC* tumour suppressor genes represent the most frequent molecular events in colorectal cancer (Nathke, 2004). Indeed, *APC* loss promotes the appearance of adenomas that when coupled with secondary oncogenic mutations in Ras (acting downstream of EGFR signalling) or in Smad (acting downstream of BMP/TGF $\beta$  signalling) can develop into aggressive adenocarcinomas giving rise to metastases (Reya and Clevers, 2005; Berg and Soreide, 2012). Interestingly, recent data on *Drosophila* shed light on the underlying mechanisms linking loss of *APC* with the appearance of tumours. Thus, in the *Drosophila* midgut, loss of *APC* leads to ISC over-proliferation and intestinal hyperplasia, a process which also involves non-autonomous cross-talk with the JAK/STAT and EGFR pathways (Lee et al., 2009; Cordero et al., 2012a). *Drosophila* genetics also permitted demonstrating that in addition to the loss of *APC*-mediated ISC over-proliferation, oncogenic mutations in Ras or Raf (acting downstream of EGFR) are required to block EB differentiation and down-regulate DE-Cadherin, two steps promoting intestinal outgrowth and tumour progression (Wang et al., 2013).

Over-activation of the Notch pathway is also implicated in various cancers (Geissler and Zach, 2012; Guilmeau, 2012). Particularly, in many cases of colorectal cancer owing to the loss of *APC*, the Notch ligand, Jagged1, is transcriptionally up-regulated arguing for a cooperation between Notch and Wg/Wnt signalling in promoting cancer (Bertrand et al., 2012; Guilmeau, 2012). Over-activation of Hh signalling was also found in a variety of human malignancies. A wide range of

digestive tract tumours, including most of those originating in the esophagus, stomach, biliary tract, and pancreas, display increased Hh pathway activity, often in conjunction with deregulation of other signalling pathways such as Notch and Wg/Wnt (Bertrand et al., 2012; Geissler and Zach, 2012). Conversely, while the constitutive activities of the Wg/Wnt, EGFR, Notch and Hh pathways are responsible for tumour appearance, development and metastasis, the loss of BMP and Hippo pathways activity also contribute to the development of intestinal cancers (Reya and Clevers, 2005; Avruch et al., 2012; Bertrand et al., 2012; Yu and Guan, 2013). The discovery that all of these pathways have conserved functions in flies renders *Drosophila* as a useful tool for deciphering crosstalks taking place to promote tumour growth.

Cancer has long been considered as a genetic disease. However, accumulating evidence supports the involvement of infectious agents in the development of cancers. This is especially true for those organs that are continuously exposed to microorganisms, such as the large intestine. Bacteria may initiate oncogenesis due to, first, their production of cell-damaging toxins and second, the induction of pro-inflammatory cytokines by the host in response to the damage, both events facilitating tumorigenesis in animals susceptible to developing cancers (Collins et al., 2011; Sun and Irvine, 2011; Tjalsma et al., 2012; Christofi and Apidianakis, 2013). Once again, *Drosophila melanogaster* has emerged as a powerful tool to unravel the underlying mechanisms. Adult flies bearing a latent oncogenic allele of the mammalian ortholog *K-Ras* (*Ras1<sup>ACT</sup>*) and fed with the human pathogenic bacteria *P. aeruginosa* develop huge intestinal dysplasia (Apidianakis et al., 2009). Indeed *Ras1<sup>ACT</sup>* can synergize with the inflammatory signals (JAK/STAT and JNK pathways) triggered by the bacteria to induce stem cell-originating tumours. This ultimately leads to intestinal dysplasia, a pre-malignant condition characterized by profound ISC or progenitor proliferation, impaired differentiation, epithelial multilayering and alterations in apicobasal polarity (Apidianakis et al., 2009). More recently, Bangi et al. (2012) demonstrated that *P. aeruginosa* intestinal infection cooperates with the oncogenic allele *Ras1<sup>ACT</sup>* to activate the pro-inflammatory JNK pathway inducing expression of its transcriptional target, *metalloprotease 1* (MMP1). An excess of MMP1 provokes the degradation of the basement membrane and facilitates the delamination of proliferating *Ras<sup>ACT</sup>* mutant ISCs (Bangi et al., 2012).

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*), another Human pathogenic bacterium colonizing gastric mucosae, was found to be the primary cause of upper gastrointestinal disorders, such as acute and chronic gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer, which is the second most common cause of cancer-related deaths worldwide (Makola et al., 2007; Atherton and Blaser, 2009). Strains of *H. pylori* that can inject their CagA effector protein into host cells are known to be more virulent, but the

potential contributions of host genetics to pathogenesis are not well-understood (Atherton and Blaser, 2009). Using *Drosophila melanogaster*, Wandler and Guillemin (2012) showed that CagA acts through the activation of JNK signalling to induce apoptosis and disrupt tissue integrity. Moreover, in the presence of an oncogenic allele of *Ras*, CagA expression promotes growth and invasion of tumours in a JNK-dependent manner (Wandler and Guillemin, 2012). Therefore, the host genetic background can influence the outcome of *H. pylori* (or *P. aeruginosa*) pathogenesis and hence disease progression.

In conclusion, the conservation of molecular, cellular and tissue structures, as well as the high conservation of oncogenes and tumour suppressors between flies and mammals, justify *Drosophila* as a model for studying mammalian cancers and infections.

## Conclusion

Since *Drosophila* has emerged as an easily manageable model to study mechanisms involved in gut renewing and replenishment, much progress has been made. The insights gained from the studies discussed in this review show the particular importance of controlling self-renewal and regenerative capacity of the intestinal epithelium in order to maintain cellular homeostasis. This homeostasis is tightly controlled by a panoply of signalling pathways ensuring appropriate renewal of the epithelium and protecting the organism from potential aggressors present in daily ingested food. A coordinate network of more than ten signalling pathways exhibiting more or less redundancy is implicated in ISC maintenance and division, and EB differentiation. Consequently, in human, deregulations in these pathways lead to the appearance of intestinal diseases such as cancers. The discovery that all of these pathways have conserved functions in fly renders *Drosophila* a good model for deciphering crosstalks taking place to promote tumour growth and to understand the relationship between the presence of oncogenic alleles and bacterial intoxication.

Very recently, thanks to a *Drosophila* study, enteroendocrine cells (ee) have emerged as a new piece of the puzzle in regulating cellular homeostasis of the gut. Indeed, it appears that the neuropeptide Bursicon secreted by ee can restrain ISC proliferation by limiting the production of the EGFR ligand by the VM (Scopelliti et al., 2014). Knowing that the apical pole of the ee faces the lumen and that their basal pole is in direct contact with the VM, hormones secreted by ee are probably key regulators of the gut homeostasis, adapting ISC division and EB differentiation in function of the luminal content.

Moreover, the regenerative capacity of the intestinal epithelium can be influenced by extrinsic factors such as the circadian clock and the quality and abundance of nutrients. Accordingly, all future studies should take into account extrinsic regulations of gut homeostasis. Thus,

numerous discrepancies between independent labs reviewed here could be explained by differences in rearing/feeding conditions. In addition, all the studies in mouse were performed with conventionally fed mice. Knowing that food quality can potentially modulate the mode of ISC division, it would be interesting to study how nutrients may influence ISC division in mice. Finally, several studies validate the adult *Drosophila* midgut as a useful model for studying the behaviour of stem cells under homeostatic conditions and during pathogenic infection of the DT. The conservation of molecular, cellular and tissue structures between flies and mammals suggests that flies can be used to shed light on several aspects of biology relevant to human disease, including epithelial regeneration in the context of cancer and intestinal bowl diseases.

---

*Acknowledgements.* We are grateful to J. Colombani and C. G eminard for their advice and corrections on the manuscript. A special thank to D. Andersen. MYP was supported by the ANR-13-CESA-0003-01 grant. RL was supported by the Minist ere de l'Enseignement Sup erieur et de la Recherche. AG was supported by the CNRS.

---

## References

- Alper S. (2010). Model systems to the rescue: The relationship between aging and innate immunity. *Commun. Integr. Biol.* 3, 409-414.
- Amcheslavsky A., Jiang J. and Ip Y.T. (2009). Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 4, 49-61.
- Apidianakis Y. and Rahme L.G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis. Model. Mech.* 4, 21-30.
- Apidianakis Y., Pitsouli C., Perrimon N. and Rahme L. (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20883-20888.00
- Atherton J.C. and Blaser M.J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119, 2475-2487.
- Avruch J., Zhou D. and Bardeesy N. (2012). YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. *Cell Cycle* 11, 1090-1096.
- Badouel C. and McNeill H. (2011). SnapShot: The hippo signaling pathway. *Cell* 145, 484-484.e1.
- Bangi E., Pitsouli C., Rahme L.G., Cagan R. and Apidianakis Y. (2012). Immune response to bacteria induces dissemination of Ras-activated *Drosophila* hindgut cells. *EMBO Rep.* 13, 569-576.
- Bardin A.J., Perdigoto C.N., Southall T.D., Brand A.H. and Schweisguth F. (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* 137, 705-714.
- Barker N., van Oudenaarden A. and Clevers H. (2012). Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell* 11, 452-460.
- Baumann O. (2001). Posterior midgut epithelial cells differ in their organization of the membrane skeleton from other *drosophila* epithelia. *Exp. Cell. Res.* 270, 176-187.
- Beebe K., Lee W.C. and Micchelli C.A. (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Dev. Biol.* 338, 28-37.
- Berg M. and Soreide K. (2012). EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov. Med.* 14, 207-214.
- Bertrand F.E., Angus C.W., Partis W.J. and Sigounas G. (2012). Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell* 11, 4344-51.
- Biteau B. and Jasper H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* 138, 1045-1055.
- Biteau B., Hochmuth C.E. and Jasper H. (2008). JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* 3, 442-455.
- Biteau B., Karpac J., Supoyo S., Degennaro M., Lehmann R. and Jasper H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 6, e1001159.
- Biteau B., Hochmuth C. E. and Jasper H. (2011). Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell* 9, 402-11.
- Bond D. and Foley E. (2012). Autocrine platelet-derived growth factor-vascular endothelial growth factor receptor-related (Pvr) pathway activity controls intestinal stem cell proliferation in the adult *Drosophila* midgut. *J. Biol. Chem.* 287, 27359-27370.
- Buchon N., Broderick N.A., Chakrabarti S. and Lemaitre B. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 23, 2333-2344.
- Buchon N., Broderick N.A., Kuraishi T. and Lemaitre B. (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* 8, 152.
- Buchon N., Osman D., David F.P., Fang H.Y., Boquete J.P., Deplancke B. and Lemaitre B. (2013). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* 3, 1725-1738.
- Charroux B. and Royet J. (2010). *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly* 4, 40-47.
- Cheng H. and Leblond C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141, 537-561.
- Choi N.H., Kim J.G., Yang D.J., Kim Y.S. and Yoo M.A. (2008). Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* 7, 318-324.
- Choi N.H., Lucchetta E. and Ohlstein B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18702-18707.
- Christofi T. and Apidianakis Y. (2013). Ras-oncogenic *Drosophila* hindgut but not midgut cells use an inflammation-like program to disseminate to distant sites. *Gut* 4, 54-9.22429.
- Collins D., Hogan A.M. and Winter D.C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 12, 504-512.
- Cordero J.B., Stefanatos R.K., Myant K., Vidal M. and Sansom, O.J. (2012a). Non-autonomous crosstalk between the Jak/Stat and Egfr pathways mediates Apc1-driven intestinal stem cell hyperplasia in the *Drosophila* adult midgut. *Development* 139, 4524-45235.
- Cordero J.B., Stefanatos R.K., Scopelliti A., Vidal M. and Sansom O.J. (2012b). Inducible progenitor-derived Wingless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *EMBO J.* 31, 3901-3917.
- de Navascues J., Perdigoto C.N., Bian Y., Schneider M.H., Bardin A.J.,

- Martinez-Arias A. and Simons B.D. (2012). *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. *EMBO J.* 31, 2473-2485.
- DeVeale B., Brummel T. and Seroude L. (2004). Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell* 3, 195-208.
- Gallet A. (2011). Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends Cell. Biol.* 21, 238-246.
- Garrett W.S., Gordon J.I. and Glimcher L.H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140, 859-870.
- Geissler K. and Zach O. (2012). Pathways involved in *Drosophila* and human cancer development: the Notch, Hedgehog, Wingless, Runt and Trithorax pathway. *Ann. Hematol.* 91, 645-669.
- Geminard C., Rullifson E.J. and Leopold P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*. *Cell. Metab.* 10, 199-207.
- Gersemann M., Stange E.F. and Wehkamp J. (2011). From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 17, 3198-3203.
- Goulas S., Conder R. and Knoblich J.A. (2012). The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 529-540.
- Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.Y., Vallabhapurapu S., Scheller J., Rose-John S., Cheroutre H., Eckmann L. and Karin M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15, 103-113.
- Guilmeau S. (2012). Notch signaling and intestinal cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727, 272-288.
- Guo Z., Driver I. and Ohlstein B. (2013). Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. *J. Cell. Biol.* 201, 945-461.
- Hardin P.E. (2011). Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv. Genet.* 74, 141-173.
- Hombria J.C. and Serras F. (2013). Why should we care about fly tumors? The case of JAK-STAT and EGFR cooperation in oncogenesis. *JAKSTAT* 2, e23203.
- Huang H., Li J., Hu L., Ge L., Ji H., Zhao Y. and Zhang L. (2014). Bantam is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. *Dev. Biol.* 385, 211-219.
- Jiang H., Patel P.H., Kohlmaier A., Grenley M.O., McEwen D.G. and Edgar B.A. (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137, 1343-1355.
- Jiang H., Grenley M.O., Bravo M.J., Blumhagen R.Z. and Edgar B.A. (2011). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 8, 84-95.
- Jin Y., Xu J., Yin M.X., Lu Y., Hu L., Li P., Zhang P., Yuan Z., Ho M.S., Ji H., Zhao Y. and Zhang L. (2013). Brahma is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation and regulated by Hippo signaling. *Elife* 2, e00999.
- Jones R.G., Li X., Gray P.D., Kuang J., Clayton F., Samowitz W.S., Madison B.B., Gumucio D.L. and Kuwada S.K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia and early postnatal lethality. *J. Cell. Biol.* 175, 505-154.
- Kannan K. and Fridell Y.W. (2013). Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging and dietary restriction. *Front. Physiol.* 4, 288.
- Karpowicz P., Perez J. and Perrimon N. (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* 137, 4135-45.
- Karpowicz P., Zhang Y., Hogenesch J.B., Emery P. and Perrimon N. (2013). The circadian clock gates the intestinal stem cell regenerative state. *Cell Rep.* 3, 996-1004.
- Kuraishi T., Binggeli O., Opota O., Buchon N. and Lemaitre B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 15966-15771.
- Kuraishi T., Hori A. and Kurata S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.* 4, 375.
- Lee W.C., Beebe K., Sudmeier L. and Micchelli C.A. (2009). Adenomatous polyposis coli regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation. *Development* 136, 2255-2264.
- Li H., Qi Y. and Jasper H. (2013a). Dpp signaling determines regional stem cell identity in the regenerating adult *Drosophila* gastrointestinal tract. *Cell Rep.* 4, 10-18.
- Li Z., Zhang Y., Han L., Shi L. and Lin X. (2013b). Trachea-derived dpp controls adult midgut homeostasis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 24, 133-143.
- Li Z., Guo Y., Han L., Zhang Y., Shi L., Huang X. and Lin X. (2014). Debra-mediated ci degradation controls tissue homeostasis in *Drosophila* adult midgut. *Stem Cell Rep.* 2, 135-144.
- Lin G., Xu N. and Xi R. (2008). Paracrine Wingless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature* 455, 1119-1123.
- Lin G., Xu N. and Xi R. (2010). Paracrine unpaired signaling through the JAK/STAT pathway controls self-renewal and lineage differentiation of *drosophila* intestinal stem cells. *J. Mol. Cell. Biol.* 2, 37-49.
- Lin G., Zhang X., Ren J., Pang Z., Wang C., Xu N. and Xi R. (2013). Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 377, 177-187.
- Liu W., Singh S.R. and Hou S.X. (2010). JAK-STAT is restrained by Notch to control cell proliferation of the *Drosophila* intestinal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 109, 992-999.
- Lopez-Garcia C., Klein A.M., Simons B.D. and Winton D.J. (2010). Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* 330, 822-825.
- Lucchetta E.M. and Ohlstein B. (2012). The *Drosophila* midgut: a model for stem cell driven tissue regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 781-788.
- Maeda K., Takemura M., Umemori M. and Adachi-Yamada T. (2008). E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes Cells* 13, 1219-1227.
- Makola D., Peura D.A. and Crowe S.E. (2007). Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* 41, 548-558.
- Marianes A. and Spradling A.C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife* 2, e00886.
- McLeod C.J., Wang L., Wong C. and Jones D.L. (2010). Stem cell dynamics in response to nutrient availability. *Curr. Biol.* 20, 2100-2105.
- Micchelli C.A. and Perrimon N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439, 475-479.
- Natke I.S. (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20, 337-366.
- O'Brien L.E., Soliman S.S., Li X. and Bilder D. (2011). Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* 147, 603-614.

## Cellular homeostasis of the gut

- Ohlstein B. and Spradling A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439, 470-474.
- Ohlstein B. and Spradling A. (2007). Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 315, 988-992.
- Okumura T., Takeda K., Taniguchi K. and Adachi-Yamada T. (2014). betanin integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in *Drosophila* adult midgut. *PLoS One* 9, e89387.
- Osman D., Buchon N., Chakrabarti S., Huang Y.T., Su W.C., Poidevin M., Tsai Y.C. and Lemaitre B. (2012). Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *J. Cell Sci.* 125, 5944-5949.
- Park J.S., Kim Y.S. and Yoo M.A. (2009). The role of p38b MAPK in age-related modulation of intestinal stem cell proliferation and differentiation in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)* 1, 637-651.
- Perdigoto C.N. and Bardin A.J. (2013). Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2307-22.
- Perdigoto C.N., Schweisguth F. and Bardin A.J. (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* 138, 4585-95.
- Pickert G., Neufert C., Leppkes M., Zheng Y., Wittkopf N., Warntjen M., Lehr H.A., Hirth S., Weigmann B., Wirtz S., Ouyang W., Neurath M.F. and Becker C. (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206, 1465-14672.
- Pitsouli C., Apidianakis Y. and Perrimon N. (2009). Homeostasis in infected epithelia: stem cells take the lead. *Cell Host Microbe* 6, 301-317.
- Poernbacher I., Baumgartner R., Marada S.K., Edwards K. and Stocker H. (2012). *Drosophila* Pez acts in Hippo signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Curr. Biol.* 22, 389-396.
- Prehoda K.E. (2009). Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001388.
- Quintas-Cardama A. and Verstevosek S. (2013). Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors and resistance. *Clin. Cancer Res.* 19, 1933-1940.
- Quyn A.J., Appleton P.L., Carey F.A., Steele R.J., Barker N., Clevers H., Ridgway R.A., Sansom O.J. and Nathke I.S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell* 6, 175-181.
- Radtke F. and Clevers H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-9.
- Ren L.L. and Fang J.Y. (2011). Should we sound the alarm? Dysplasia and colitis-associated colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12, 1881-1886.
- Ren F., Wang B., Yue T., Yun E.Y., Ip Y.T. and Jiang J. (2010). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21064-21069.
- Ren F., Shi Q., Chen Y., Jiang A., Ip Y.T., Jiang H. and Jiang J. (2013). *Drosophila* Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Res.* 23, 1133-1146.
- Reya T. and Clevers H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Rizzo A., Pallone F., Monteleone G. and Fantini M.C. (2011). Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J.* 17, 3092-3100.
- Rossi D.J., Jamieson C.H. and Weissman I.L. (2008). Stem cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132, 681-696.
- Santaolalla R. and Abreu M.T. (2012). Innate immunity in the small intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 28, 124-129.
- Scadden D.T. (2014). Nice neighborhood: Emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* 157, 41-50.
- Scopelliti A., Cordero J.B., Diao F., Strathdee K., White B.H., Sansom O.J. and Vidal M. (2014). Local control of intestinal stem cell homeostasis by enteroendocrine cells in the adult *Drosophila* midgut. *Curr. Biol.* 24, 1199-1211.
- Shanbhag S. and Tripathi S. (2009). Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *J. Exp. Biol.* 212, 1731-1744.
- Shaulian E. (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 22, 894-9.
- Shaw R.L., Kohlmaier A., Polesello C., Veelken C., Edgar B.A. and Tapon N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* 137, 4147-58.
- Singh S.R., Mishra M.K., Kango-Singh M. and Hou S.X. (2012). Generation and staining of intestinal stem cell lineage in adult midgut. *Methods Mol. Biol.* 879 47-69.
- Snippert H.J., van der Flier L.G., Sato T., van Es J.H., van den Born M., Kroon-Veenboer C., Barker N., Klein A.M., van Rheenen J., Simons B.D. and Clevers H. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143, 134-144.
- St Johnston D. and Ahringer J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774.
- Staley B.K. and Irvine K.D. (2010). Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* 20, 1580-1587.
- Sun G. and Irvine K.D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration and in neoplastic tumors. *Dev. Biol.* 350, 139-151.
- Takashima S., Gold D. and Hartenstein V. (2013). Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. *Dev. Genes Evol.* 223, 85-102.
- Tian A. and Jiang J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife* 3, e01857.
- Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R. and Dutilh B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 575-582.
- Tolhurst G., Reimann F. and Gribble F.M. (2012). Intestinal sensing of nutrients. *Handb. Exp. Pharmacol.* 209, 309-335.
- Vanuytsel T., Senger S., Fasano A. and Shea-Donohue T. (2013). Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2410-2426.
- Veenstra J.A., Agricola H.J. and Sellami A. (2008). Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res.* 334, 499-516.
- Wandler A.M. and Guillemin K. (2012). Transgenic expression of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes apoptosis or tumorigenesis through JNK activation in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 8, e1002939.
- Wang C., Zhao R., Huang P., Yang F., Quan Z., Xu N. and Xi R. (2013). APC loss-induced intestinal tumorigenesis in *Drosophila*: Roles of Ras in Wnt signaling activation and tumor progression. *Dev. Biol.* 378, 122-140.

*Cellular homeostasis of the gut*

- Wolfenson H., Lavelin I. and Geiger B. (2013). Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev. Cell* 24, 447-58.
- Wong V.W., Stange D.E., Page M.E., Buczacki S., Wabik A., Itami S., van de Wetering M., Poulsom R., Wright N.A., Trotter M.W., Watt F.M., Winton D.J., Clevers H. and Jensen K.B. (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 14, 401-408.
- Xu N., Wang S.Q., Tan D., Gao, Y., Lin G. and Xi R. (2011). EGFR, Wingless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain *Drosophila* intestinal stem cells. *Dev. Biol.* 354, 31-43.
- Yeung T.M., Chia L.A., Kosinski C.M. and Kuo C.J. (2011). Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2513-2523.
- Yu F.X. and Guan K.L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev.* 27, 355-371.

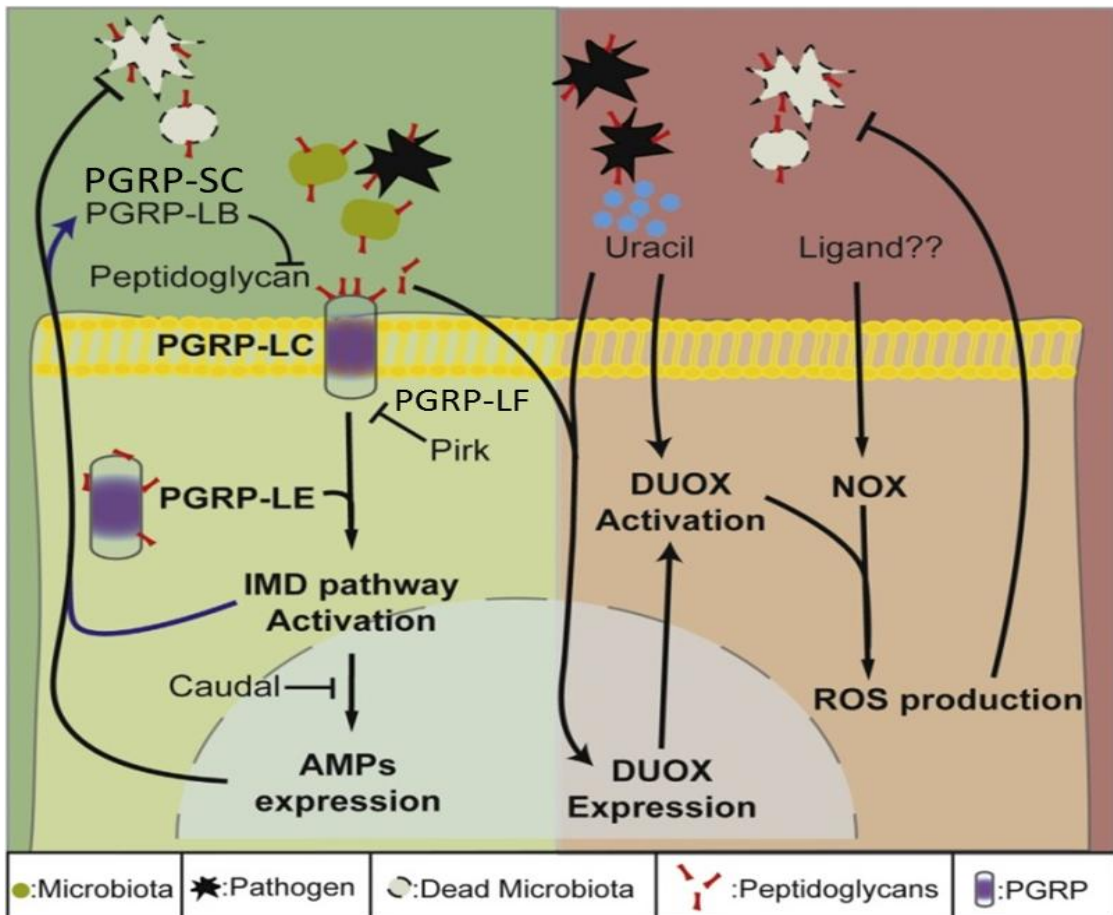
Accepted October 8, 2014

## III-4 Réponses intestinales aux intoxications bactériennes

### III-4-1 Réponse immunitaire locale

La drosophile est dotée d'une réponse immunitaire innée assurée par des mécanismes cellulaires et humoraux. Les mécanismes cellulaires sont médiés par les hémocytes (les plasmotocytes qui assurent la phagocytose des particules étrangères et les lamellocytes qui assurent l'encapsulation et la mélanisation de ces particules). La réponse immunitaire humorale permet la production d'une batterie de peptides antimicrobiens (diptéricine, drosocine, cécropine, attacine, défensine, drosomicine...) en faisant intervenir deux voies de signalisation: la voie TOLL et la voie IMD. Ces deux voies sont activées dans le corps gras en cas de réponse immunitaire systémique. Dans l'intestin (lieu de la réponse immunitaire locale) c'est la voie IMD qui contrôle la production des peptides antimicrobiens sans que la voie TOLL soit impliquée (Gold and Bruckner, 2015).

En cas d'ingestion de bactéries allochtones, la réponse immunitaire locale est induite dans l'épithélium intestinal, principalement dans la partie antérieure du midgut (dans la R1). Cette réponse est assurée par la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et de peptides antimicrobiens (PAMs) (Figure 7). La production de ROS est activée par la libération d'uracile par les bactéries allochtones, molécule indispensable pour leur prolifération. L'enzyme responsable de la production de ROS de type HOCl est la Dual oxidase (Duox). Les ROS sont produits rapidement suite à l'intoxication pour participer à l'élimination des bactéries ingérées (Du et al., 2016). La voie de signalisation Duox/Uracile semble aussi être nécessaire pour l'expulsion des bactéries ingérées de l'intestin en augmentant la défécation (Du et al., 2016). En plus de la production des ROS, la réponse immunitaire locale est renforcée par la production des PAMs suite à l'activation de la voie IMD (Buchon et al., 2009a; Lee et al., 2013). En effet, l'activation de cette voie de signalisation se fait par l'intermédiaire des peptidoglycans (PGNs) de la paroi bactérienne. Les PGNs se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques appelés PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins), plus précisément PGRP-LC et PGRP-LE (Bonfini et al., 2015; Gottar et al., 2002). Cette fixation induit une cascade de réactions intracellulaires entraînant la coupure protéolytique de Relish (Rel, facteur de transcription de la famille NF- $\kappa$ B, effecteur de la voie). Ceci permet la translocation nucléaire du domaine Rel qui peut ainsi activer

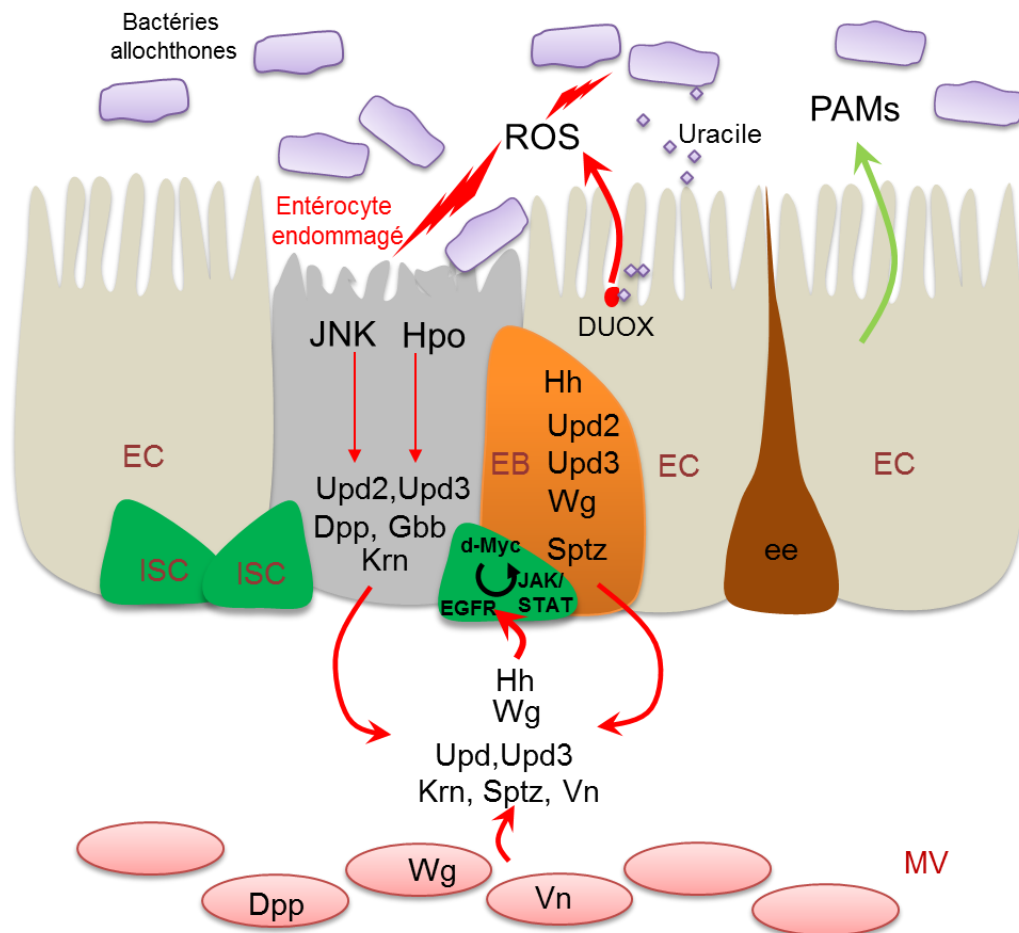


**Figure 7:** Schéma décrivant les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire locale de la drosophile. L'uracile secrétée par les pathogènes induit la production des ROS suite à l'activation de la DUOX (pour contrôler la flore commensale, c'est la NOX qui est responsable de la production des ROS). Les pathogènes activent la voie IMD suite à la détection de leurs PGNs et leur fixation sur leurs récepteurs (les PGRP-LC et PGRP-LE). Cette fixation permet l'activation de la voie IMD et par conséquent la production de peptides antimicrobiens. Une boucle de rétrocontrôle négatif se met en place pour moduler l'activation de la voie IMD. La flore commensale n'est pas capable d'induire la voie IMD car leur PGN libérés sont constamment dégradés par les PGRP-SC et PGRP-LB (Adapté de (Bonfini et al., 2015)).

l'expression de ses gènes cibles (Stöven et al., 2000) dont les peptides antimicrobiens dirigés contre les bactéries ingérées (Capo et al., 2016). Le rétrocontrôle négatif de la voie IMD est assuré par trois PGRP : PGRP-LB, PGRP-SC1 et PGRP-LF (Bosco-Drayon et al., 2012). PGRP- SC1 et PGRP-LB sont des enzymes qui dégradent les PGNs pour réduire leur capacité à déclencher la réponse immunitaire (Bischoff et al., 2006) tandis que PGRP-LF lie directement PGRP-LC pour former des hétérodimères inactifs empêchant ainsi l'activation de la voie IMD (Basbous et al., 2011). Pirk est un autre régulateur négatif de la voie IMD qui agit sur la localisation membranaire de PGRP-LC perturbant ainsi son interaction avec la voie IMD. Par ailleurs, il est connu que l'intestin de la drosophile peut abriter différents types de bactéries commensales (en moyenne  $10^3$  CFU de bactéries commensales majoritairement du *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Acetobacter pomorum* et *Acetobacter tropicalis*), (Bonfini et al., 2015; Chandler et al., 2011). En absence d'infection et pour protéger la flore commensale, la liaison des PGNs libérés par les bactéries endogènes au récepteur PGRP-LC et PGRP-LE est inhibée par les régulateurs négatifs de la voie IMD PGRP-SC1/2, PGRP-LB, et PGRP-LF (Bischoff et al., 2006). Les bactéries commensales sont capables aussi de produire modérément les ROS en activant la NOX (NADPH oxidase, enzyme permettant la production de ROS de type  $H_2O_2$ ), (Bonfini et al., 2015; Jones et al., 2013). Ceci permet le contrôle de la quantité des bactéries commensales dans l'intestin. La réponse immunitaire locale médiée par les ROS et la voie IMD joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie intestinale en contrôlant à la fois la flore intestinale et les bactéries allochtones ingérées. La dérégulation des voies de la réponse immunitaire locale peut induire une dysbiose de la flore commensale, une hyper-prolifération des cellules souches intestinales voir même une dysplasie intestinale et une réduction de la longévité des drosophiles (Paredes et al., 2011).

### III-4-2 Accélération de la régénération intestinale

La récupération efficace et rapide suite à une infection bactérienne est possible uniquement lorsque la réponse immunitaire locale médiée par les PAMs et les ROS est coordonnée avec le renouvellement épithélial pour réparer les dommages causés par l'infection et les ROS. La capacité de survivre à une infection repose non seulement sur les mécanismes permettant l'élimination de l'agent pathogène, mais aussi sur les mécanismes assurant l'accélération du renouvellement des cellules endommagées ce qui augmente la capacité de l'hôte à supporter l'infection. En effet, une fois dans l'intestin, les bactéries allochtones vont activer la production de HOCl par la DUOX, (Du et al., 2016; Ha et al., 2005; Lee et al., 2013). Ce ROS sert à tuer les bactéries ingérées, mais, quand il est produit en fortes quantités, il peut endommager l'épithélium intestinal en induisant l'apoptose des entérocytes. Les bactéries ingérées peuvent elles-mêmes endommager les entérocytes. Dans tous ces cas, les cellules endommagées vont envoyer des signaux de détresse aux cellules voisines (cellules souches, entéroblastes, muscle viscéral). L'intégration des différents signaux par les cellules souches intestinales permet l'accélération de leur prolifération pour remplacer les entérocytes mourants. Ce mécanisme est connu sous le nom de la « Regenerative Cell death » ou « mort cellulaire régénérative » (Vriz et al., 2014), (**Figure 8**). En effet, dans les entérocytes endommagés, les voies de stress JNK et Hippo sont activées. L'activation de ces voies de signalisation induit une forte production des cytokines Unpaired (principalement Upd3 et un peu moins Upd2) par les entérocytes (Osman et al., 2012) mais aussi par les entéroblastes (Buchon et al., 2009a; Zhou et al., 2013). Ces cytokines Unpaired provenant de différents types cellulaires (EC et EB) vont activer la voie de signalisation JAK/STAT au niveau des cellules souches voisines. Les entérocytes endommagés stimulent aussi la production de certains facteurs de croissance (EGFs) en réponse à un stress bactérien : le facteur de croissance Keren (Krn) est produit par les entérocytes, Spitz (Sptz) est produit par les entéroblastes, alors que Vein (Vn) est produit par le muscle viscéral (Jiang et al., 2011). Vn, Sptz et Krn vont se fixer sur des récepteurs spécifiques (EGFR) au niveau des ISC ce qui permet l'activation de la prolifération de ces cellules. Les ligands de TGF- $\beta$  (Dpp et Gbb) sont aussi produits par les entérocytes et le muscle viscéral en réponse à une infection (Tian and Jiang, 2014). Ces facteurs de croissance vont participer à l'activation de la prolifération des cellules souches intestinales. De plus, les facteurs de croissance Hh (produit



**Figure 8:** Schéma illustrant les voies de signalisation contrôlant le renouvellement intestinal de la drosophile suite à une agression intestinale par des bactéries allochtones. Les ROS produites par la DUOX et dirigées contre les bactéries ingérées peuvent endommager les entérocytes. Dans les entérocytes endommagés, les voies de stress JNK et Hpo sont activées. Le résultat de cette activation est la production de signaux de détresse (cytokines et facteurs de croissance) par les entérocytes, les entéroblastes et le muscle viscéral. Les signaux émis vont se fixer sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des cellules souches intestinales permettant ainsi l'activation des voies de signalisation activant la prolifération cellulaire. La voie de signalisation JAK/STAT, la voie EGFR et dMyc sont les principales voies de signalisation contrôlant la prolifération des ISC. Ces dernières vont se diviser asymétriquement pour accélérer le remplacement des entérocytes endommagés. **EC:** entérocyte, **EB:** entéroblaste, **ISC:** cellule souche intestinale, **ee:** cellule entéroendocrine, **MV:** muscle viscéral, **ROS:** espèces réactives d'oxygène, **PAMs:** peptides anti-microbiens, **DUOX:** dual oxydase.

par les entéroblastes) et Wg (produit par les entéroblastes et le muscle viscéral en cas d'infection) sont impliqués dans la stimulation de la prolifération des ISC en réponse à une infection bactérienne (Lin et al., 2010; Tian et al., 2015). L'intégration des différents signaux (cytokines et facteurs de croissance) par les cellules souches intestinales permet l'activation des voies de signalisation JAK/STAT, EGFR et d-Myc. L'activation de ces voies de signalisation stimule la prolifération de ces cellules. Les ISC vont se diviser asymétriquement pour donner une nouvelle cellule souche et un entéroblaste. Les cellules souches vont donner principalement des entérocytes pour remplacer les cellules endommagées (Charroux and Royet, 2010) (Figure 8). L'impact sur l'intestin peut varier selon la nature de l'agresseur (bactérie pathogène, bactérie non pathogène, agresseurs abiotiques...). La survie de la mouche va dépendre de sa capacité à surmonter le stress intestinal subi.

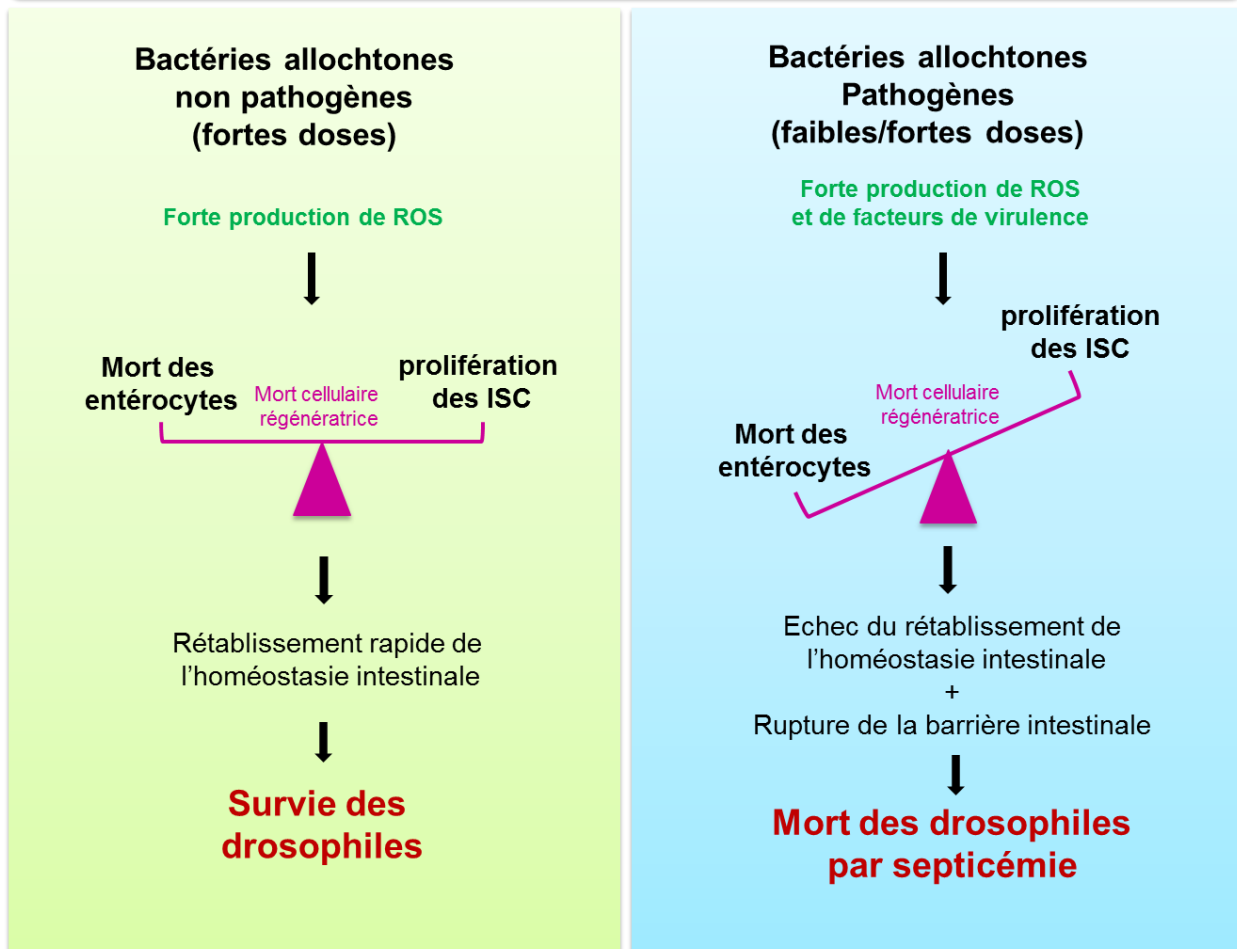
### III-4-3 Impact des bactéries non pathogènes sur l'intestin

Les bactéries allochtones non pathogènes quand elles sont ingérées à fortes doses sont capables de perturber l'homéostasie intestinale de leur hôte sans pouvoir le tuer grâce à l'efficacité de la régénération intestinale. *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc*) est la bactérie la plus utilisée pour étudier l'effet d'une forte intoxication avec un non-pathogène sur l'homéostasie intestinale de la drosophile. *Ecc*, quand elle est ingérée à fortes doses, est capable d'endommager les entérocytes soit directement soit indirectement par l'induction de la production des ROS par les cellules intestinales. Par conséquent, les voies de signalisation activant la prolifération des cellules souches intestinales sont activées pour un remplacement rapide des entérocytes endommagés. Cette régénération intestinale est assez rapide et efficace pour réparer l'épithélium intestinal en moins de 24 heures empêchant ainsi les bactéries de traverser la barrière intestinale. Par conséquent, l'homéostasie intestinale est rapidement rétablie (**Figure 9a**), (Amcheslavsky and Ip, 2008; Apidianakis et al., 2009; Biteau et al., 2008; Buchon et al., 2009b; Choi et al., 2008; Jiang et al., 2009, 2016). Il est important de noter que ces différentes études sont faites avec de fortes doses de bactéries. L'utilisation de ces fortes doses a été nécessaire pour mettre en évidence les mécanismes génétiques impliqués dans les réponses au stress bactérien. Il est intéressant donc d'investiguer les effets d'une ingestion de faibles doses de ces bactéries (des doses qu'on peut trouver naturellement dans l'environnement après utilisation de *Bt*). Cela permettra d'étudier les réponses physiologiques de l'intestin sans pousser le système à ses limites. On pourra donc voir des réponses intestinales plus souvent rencontrées que celles décrites avec de fortes doses de bactéries.

### III-4-4 Impact des bactéries pathogènes sur l'intestin

Pour survivre à l'infection par un agent pathogène, l'hôte doit activer les défenses immunitaires, ainsi que les mécanismes de réparation qui maintiennent l'intégrité des tissus. Cependant, dans certains cas, ces mécanismes ne parviennent pas à rétablir l'homéostasie intestinale, ce qui conduit à la mort de l'hôte (**Figure 9b**). Les bactéries pathogènes sont aussi capables d'endommager l'épithélium intestinal et d'induire une forte prolifération des cellules souches intestinales (mort cellulaire régénératrice) et sont donc utilisées pour étudier et

Mort cellulaire régénératrice: efficacité bactérie dépendante (non pathogène/pathogène)



**Figure 9:** Schéma résumant les conséquences d'une intoxication soit par des bactéries pathogènes soit par de fortes doses de bactéries non pathogènes sur l'homéostasie intestinale. **a-** L'intoxication par de fortes doses de bactéries non pathogènes induit une forte production de ROS et l'apoptose des entérocytes. L'accélération de la prolifération des ISC permet un remplacement rapide des entérocytes endommagés et un rétablissement rapide de l'homéostasie intestinale. Par conséquent les mouches survivent suite à cette intoxication. **b-** Les bactéries pathogènes induisent une forte production de ROS et de facteurs de virulence (par conséquent une forte apoptose des entérocytes) et une rupture de la barrière intestinale. Les dégâts causés par ses bactéries dépassent la capacité de l'intestin à remplacer les cellules mourantes ; de plus les bactéries s'infiltrant dans l'hémolymphe et prolifèrent induisant ainsi une septicémie. L'échec du rétablissement de l'homéostasie intestinale et la septicémie provoquent la mort des drosophiles intoxiquées dans les premiers jours qui suivent l'intoxication.

caractériser les voies de réponse à des pathogènes mises en place suite à l'intoxication. Les bactéries pathogènes dont les effets sont étudiés chez la drosophile sont *Pseudomonas entomophila* (pathogène naturel de la drosophile), *Pseudomonas aeruginosa* (pathogène pour l'homme) et *Serratia marcescens* (pathogène pour différentes espèces d'insectes, de nématodes et de mammifères). Ces bactéries induisent une forte apoptose des entérocytes et une forte activation des voies de signalisation JNK et Hippo ce qui résulte en une hyperprolifération des cellules souches intestinales (Apidianakis et al., 2009) Les dommages induits par *P.entomophila* sont aussi dûs aux toxines formant des pores au niveau des entérocytes (les monalysines) et à la forte production de ROS par les cellules intestinales. De plus, *P. entomophila* conduit à une diminution des taux de traduction de protéines impactant de fait la productions des effecteurs de la réponse immunitaire et des facteurs de croissance régulant la réparation de l'épithélium intestinal (Chakrabarti et al., 2012). En conséquence, le renouvellement de l'épithélium est perturbé et les dommages causés par l'infection dépassent la capacité de réparation intestinale ce qui conduit à la mort de la mouche dans les deux ou trois jours qui suivent l'intoxication (Chakrabarti et al., 2012; Vodovar et al., 2005). *P. aeruginosa* est capable de tuer les cellules intestinales et de traverser l'épithélium digestif vers la cavité générale de la drosophile ce qui permet d'induire une infection systémique. Les drosophiles meurent donc par septicémie. *S. marcescens* résiste à la réponse immunitaire dans l'intestin de la drosophile et elle est capable de traverser la barrière intestinale vers l'hémolymph. La mort des drosophiles intervient dans les 6 jours qui suivent l'intoxication orale (Nehme et al., 2007). Malgré la forte prolifération cellulaire intestinale induite suite à l'intoxication par ces pathogènes, cette prolifération n'est pas suffisante pour rétablir l'intégrité de l'épithélium digestif. Par conséquent, l'infiltration des pathogènes dans l'hémolymph et leur multiplication induisent une septicémie, cause principale de la mort des drosophiles intoxiquées (Bonfini et al., 2015; Limmer et al., 2011). On peut conclure donc qu'une intoxication orale par des pathogènes peut mettre en péril la santé des drosophiles en affectant l'intégrité intestinale. Chez l'homme, plusieurs études suggèrent l'implication de certaines bactéries pathogènes dans le développement de maladies inflammatoires intestinales voire des cancers. En effet, certaines bactéries peuvent initier l'apparition de cancers par les toxines qu'elles produisent ou par la stimulation de production de cytokines inflammatoires par l'hôte (Pasco et al., 2015). En 2012, Bangi et ses collègues ont montré qu'une infection intestinale par le pathogène humain *P. aeruginosa* interagit avec l'oncogène Ras1<sup>ACT</sup> pour activer la voie pro-inflammatoire JNK. L'activation de cette voie induit une surexpression d'une métallo-protéase, MMP1. L'excès de MMP1 provoque la dégradation de la membrane

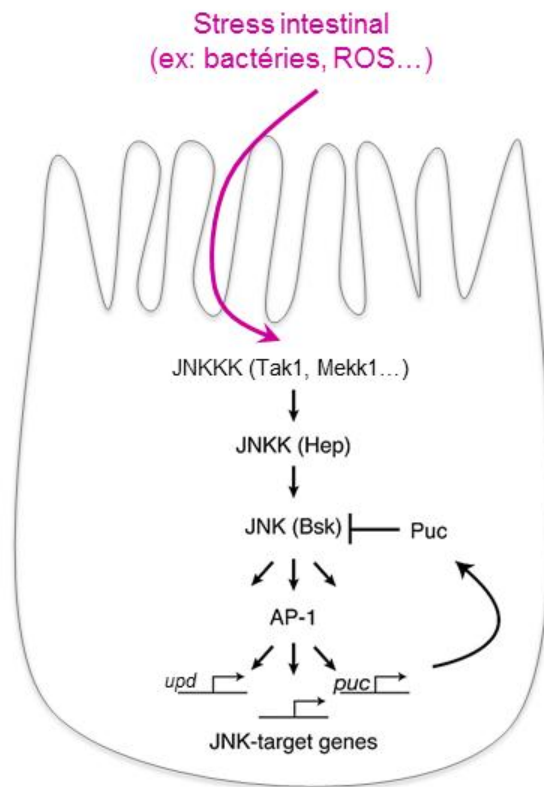
basale et facilite la délamination des cellules souches portant la mutation oncogénique Ras1<sup>ACT</sup> (Bangl et al., 2012). *Helicobacter pylori* est une autre bactérie pathogène pour l'être humain, cette bactérie est capable de coloniser la muqueuse gastrique et elle est identifiée comme cause majeure de plusieurs désordres gastro-intestinaux (gastrites, ulcères, cancers...), (Atherton and Blaser, 2009). *H. pylori* injecte un facteur de virulence (CagA) qui semble être impliqué dans des pathologies intestinales, mais des facteurs génétiques de l'hôte semblent être impliqués dans le développement de ces pathologies (Atherton and Blaser, 2009). En utilisant la drosophile comme modèle, Wandler et Guillemin (2012) ont montré que CagA active la voie JNK et induit une apoptose des cellules du disque imaginal de l'aile. De plus, en présence de l'oncogène Ras1<sup>ACT</sup>, CagA induit la croissance et l'invasion de tumeur d'une manière JNK-dépendante (Wandler and Guillemin, 2012). Ces données suggèrent que l'intoxication par des bactéries pathogènes peut avoir des conséquences délétères sur l'intestin qui, malgré ses grandes capacités de régénération, n'arrive pas à surmonter le pouvoir pathogène de ces bactéries. Ces effets semblent être plus marqués chez les organismes prédisposés.

## III-5 JNK et Hippo: deux voies de signalisation clés pour le maintien de l'homéostasie

La réponse intestinale à des intoxications bactériennes est médiée par un large éventail de voies de signalisations cellulaires. Les voies de signalisation JNK et Hippo sont connues pour répondre rapidement aux stress intestinaux. L'activation de JNK et Hippo dans les entérocytes endommagés est responsable de l'accélération de la régénération intestinale (Apidianakis et al., 2009; Biteau et al., 2011a; Karpowicz et al., 2010; Osman et al., 2012; Panayidou and Apidianakis, 2013; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010). Une dérégulation de ces voies de signalisation peut entraîner une hyperprolifération ou un arrêt de la prolifération des cellules souches intestinales.

### III-5-1 La voie de signalisation JNK

La voie de signalisation JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) est conservée chez les métazoaires. Cette voie de signalisation est activée par plusieurs facteurs environnementaux (cytokines, stress osmotique, UV, perte de polarité cellulaire, bactéries, ROS...) (Apidianakis et al., 2009; Manning and Davis, 2003) et elle joue un rôle très important dans différents processus (cytoprotection, régénération, apoptose et développement), (Biteau et al., 2011b). La voie JNK est composée d'une cascade de kinases conduisant à la phosphorylation et l'activation de la kinase JNK (**Figure 10**). Chez la Drosophile, JNK (Basket) est activée par les JNKKs (Hemipterous et dMKK4) qui sont elles-mêmes activées par différentes JNKKKs (d-Mekk1, d-Tak1...). La JNK activée est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle les facteurs de transcription (Jun, Fos et Foxo), modulant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles (*puckered*, *unpaired*,...). Puckered (Puc) est une phosphatase qui joue un rôle de rétrocontrôle négatif de la voie, le niveau d'expression de cette cible de la voie JNK reflète le niveau d'activation de la voie (Biteau et al., 2011a). Chez les mammifères comme chez la drosophile, l'action de la voie JNK est tissu- et contexte-dépendante. Selon les stimuli et selon la force et la durée de l'activation de la voie JNK, la réponse cellulaire peut être différente (induction de l'apoptose, prolifération, cytoprotection...), (Wandler and Guillemin, 2012; Weston and Davis, 2007). Par exemple, les conséquences de l'activation de JNK dans



**Figure 10:** Schéma de la voie de signalisation JNK au niveau des entérocytes chez la drosophile. Le stress perçu par les cellules induit l'activation de la kinase JNKKK. Cette dernière va phosphoryler la kinase Hep. Hep va activer à son tour la kinase JNK (Bsk). Bsk est transloqué dans le noyau pour phosphoryler le facteur de transcription AP-1 modulant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles. Parmi les gènes cibles, on trouve les cytokines *upd* et *puc* qui joue le rôle de régulateur négatif de la voie (inspiré de [Wang et al., 2003](#)).

les cellules prolifératives *in vivo* restent controversées. Bien que la capacité de la voie JNK à induire l'apoptose dans certaines conditions suggère qu'elle peut agir comme un suppresseur de tumeurs, diverses études ont également décrit des fonctions pro-oncogéniques potentielles de JNK (Tournier et al., 2000; Wandler and Guillemin, 2012; Whitmarsh and Davis, 2007). Les études réalisées pour étudier les fonctions cellulaires de la voie JNK utilisent divers conditions et paramètres expérimentaux et des contextes cellulaires et génétiques différents. Par conséquent, les messages à tirer de ces différentes études sont complexes et dépendent des contextes des expérimentations effectués.

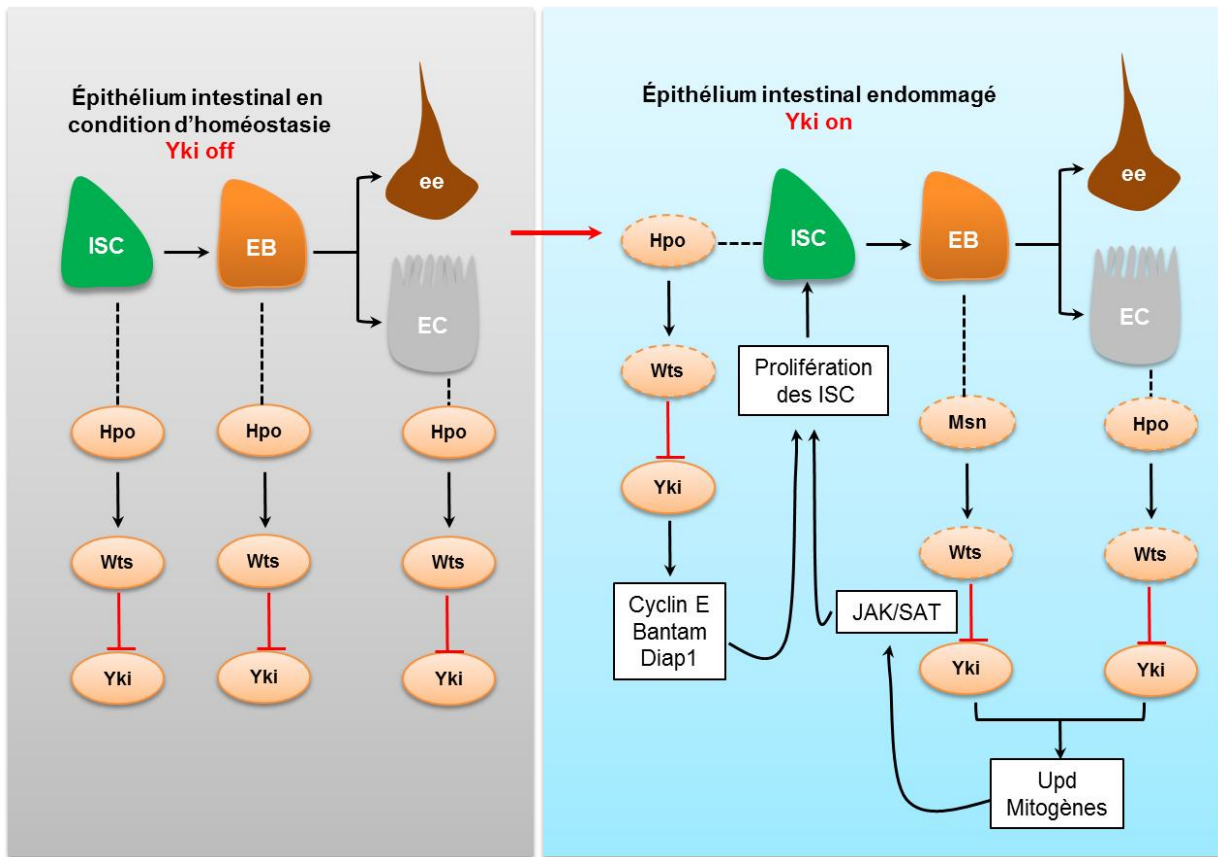
Afin de ne pas densifier et complexifier le rôle de la voie JNK, Je vais donc me contenter de décrire son rôle dans l'intestin de drosophile. Dans l'épithélium intestinal, la voie JNK intervient dans le contrôle de la prolifération de cellules souches et le renouvellement intestinal suite à une agression des cellules intestinales. En effet, cette voie est activée dans les entérocytes endommagés rapidement après un stress intestinal et induit principalement l'expression des cytokines *unpaired* (*upd3* et *upd2*) et de facteurs de croissance (*egf*, *wg*, *hh*, *dpp*, *gbb*...). Ces signaux de détresse vont être sécrétés par les entérocytes et ou par d'autres cellules de la niche des cellules souches (entéroblastes et muscle viscéral) et vont se fixer sur des récepteurs spécifiques au niveau des cellules souches intestinales (Buchon et al., 2009b; Jiang et al., 2009). Ceci conduit à l'activation des voies de signalisation contrôlant la prolifération des ISC (JAK/STAT, EGFR, d-Myc) (Bonfini et al., 2015; Osman et al., 2012).

En plus de sa fonction dans la réponse à une agression, la voie JNK semble être suractivée dans les cellules souches intestinales des drosophiles âgées. Cette sur-activation de la voie conduit à une hyper-prolifération des cellules souches intestinales (Biteau et al., 2008). A part son rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules souches, la voie JNK semble avoir un rôle cytoprotecteur de ces cellules. En effet, JNK apparait au centre d'un réseau de transduction de signaux aboutissant à l'induction de gènes de cytoprotection (*jafrac1*, *hsp68*...) contre le stress oxydatif provoqué par l'intoxication bactérienne (Biteau et al., 2008; Wang et al., 2003).

Chez les mammifères, la voie de signalisation JNK semble être impliquée dans certaines tumeurs (Radtke, 2005). Chez la souris par exemple, JNK est capable d'induire une prolifération des cellules souches intestinales au niveau des cryptes augmentant ainsi l'incidence de l'apparition de tumeurs dans un modèle de cancer colorectal induit (Sancho et al., 2009).

### III-5-2 La voie de signalisation Hippo

La voie de signalisation Hippo (Hpo) est conservée entre la drosophile et les mammifères. Elle est connue pour son rôle dans le contrôle de la taille des organes en régulant la croissance, la prolifération et l'apoptose durant le développement et elle est aussi considérée comme un senseur de la forme et la densité cellulaire (Gaspar and Tapon, 2014; Zhao et al., 2007). Chez la drosophile, la voie Hpo est composée d'une cascade de kinases. En amont, se trouve la kinase Hpo (homologue de MST1 et MST2 chez les mammifères). Quand la voie est activée, Hpo phosphoryle la kinase Wts (homologue de Lats 1 et Lats 2 chez les mammifères) et cette dernière phosphoryle le facteur de transcription Yorkie (Yki) l'homologue de Yap/Taz chez les mammifères. A l'état phosphorylé, Yki est retenu dans le cytoplasme et donc ses gènes cibles intervenant dans la croissance et la prolifération cellulaire ne sont pas exprimés. Dans ce cas il y a un arrêt de la prolifération cellulaire voire l'induction de l'apoptose dans certains cas (Halder and Johnson, 2011). Parmi les gènes cibles de Yki, se trouvent *bantam* et la *cycline E* qui interviennent dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'anti-apoptotique *Diap1* et *expanded (ex)* qui joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la voie Hpo. Plusieurs études utilisant le modèle *Drosophila melanogaster* ont montré l'implication de la voie de signalisation Hpo dans le contrôle de la prolifération des cellules souches, entre autres les cellules souches intestinales (Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010). La voie de signalisation Hpo intervient aussi pour contrôler la taille finale des organes en différenciation, pas en agissant sur la prolifération cellulaire, mais en induisant la mort cellulaire. Une étude a démontré l'implication de la voie Hpo pour éliminer les cellules inter-ommatidiales surnuméraires de l'œil de la drosophile au cours du développement (Kango-Singh and Singh, 2009). Par ailleurs, il a également été montré que l'absence de l'apoptose dans les clones sur-exprimant Yki au cours du développement de l'œil de la drosophile est compensée par une augmentation de l'apoptose des cellules sauvages adjacentes (Huang et al., 2005). Chez les vertébrés, la voie Hpo semble être impliquée aussi dans le contrôle de la densité cellulaire et la prolifération. En effet, il a été démontré dans des cultures de cellules de vertébrés que la voie de signalisation Hpo détecte la morphologie et la densité des cellules. Quand la densité cellulaire est faible le facteur de transcription Yap est nucléaire et favorise la prolifération. Par contre, quand la densité cellulaire est élevée, le facteur de transcription Yap reste cytoplasmique et la prolifération



**Figure 11** : Schéma décrivant le rôle de la voie de signalisation Hippo dans les différentes cellules intestinales. Dans les conditions d'homéostasie la voie Hippo est activée dans les ISC, les EB, les EC et les ee. Par conséquent le facteur de transcription Yki est inactivé et ses gènes cibles impliqués dans l'activation des ISC ne sont pas exprimés. Quand l'épithélium intestinal subit un stress, Hpo est inactivé et, par conséquent le facteur de transcription Yki est activé (non phosphorylé). Yki est dans ce cas transloqué vers le noyau pour activer ses gènes cibles induisant ainsi une activation de la prolifération des ISC (Schéma inspiré de (Hong et al., 2016)).

s'arrête (Ota and Sasaki, 2008; Varelas et al., 2010; Zhao et al., 2007). Ces deux réponses de la voie Hpo semblent être régulées par les filaments d'actine. En effet, le changement de l'organisation du cytosquelette d'actine (suite à l'augmentation de la densité cellulaire) peut induire la phosphorylation de Yap qui reste cytoplasmique sous sa forme phosphorylée (Gaspar and Tapon, 2014; Wada et al., 2011).

Dans l'intestin de la drosophile, l'inactivation de Hpo ou Wts ou la surexpression de Yki dans les cellules souches ou dans les entérocytes résulte en une sur-prolifération des cellules souches intestinales, ce qui suggère que Hpo restreint la prolifération des ISC dans des conditions d'homéostasie (**Figure 11**) (Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010). La fonction non autonome de Hpo passe par les cytokines Upd secrétées par les entérocytes et qui activent la voie JAK/STAT dans les cellules souches (Shaw et al., 2010), alors que la fonction autonome est médiée par dMyc et *bantam* (Karpowicz et al., 2010). Par contre, en cas d'agression intestinale, les niveaux de Yki sont élevés dans les entérocytes et dans les cellules souches intestinales et les gènes cibles de Yki sont activés. L'inactivation génétique de Yki dans les cellules souches ou dans les entérocytes bloque la prolifération des cellules souches qui est censée se produire suite à un stress (infection bactérienne, bléomycine...). Ce rôle semble être conservé chez les mammifères car l'inactivation de Yap (homologue de Yki) dans l'intestin de mammifères empêche la prolifération des ISC induite par un stress. Le mécanisme d'activation de Yki en réponse à un stress intestinal n'est pas encore identifié, mais la voie de signalisation JNK semble être impliquée dans cette activation car la sur-activation de JNK dans les entérocytes suite à une intoxication par la bactérie *Pseudomonas entomophila*, augmente la localisation de Yki dans le noyau et active les gènes cibles de Yki (Shaw et al., 2010).

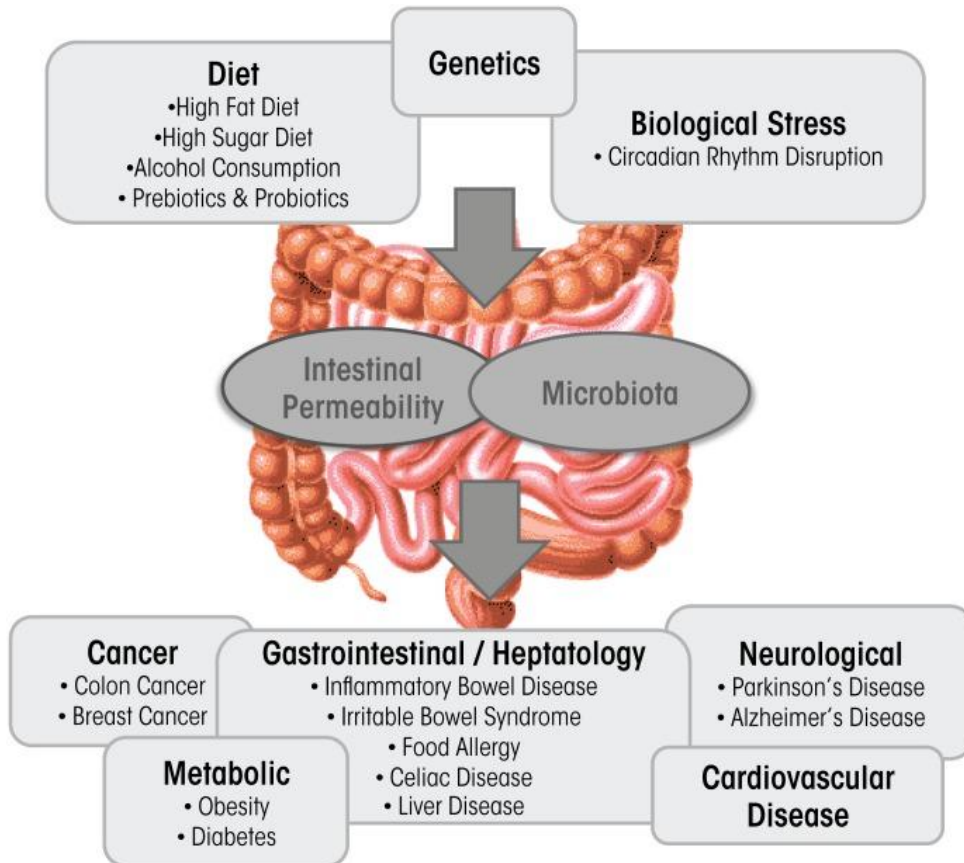
### III-6 Conséquences physiologiques de la perturbation de l'homéostasie intestinale

Malgré ses grandes capacités de renouvellement, l'épithélium intestinal peut être sujet à des dérégulations physiologiques qui peuvent affecter son intégrité et par conséquent la santé de l'organisme. Les infections bactériennes sont admises comme facteur majeur perturbant l'homéostasie cellulaire intestinale. Ces perturbations peuvent avoir un impact sur les fonctions physiologiques de l'intestin (digestion, barrière physique, défense...). Buchon et ses collègues (Buchon et al., 2009b) ont montré par l'analyse de microarrays faits sur intestins de drosophiles jeunes intoxiquées par la bactérie *Ecc* qu'il y a une modulation de certaines enzymes métaboliques et une répression de certaines enzymes digestives, probablement à cause des dommages intestinaux engendrés suite à l'intoxication. De plus, l'intégrité intestinale semble être affectée suite à une intoxication par certaines bactéries pathogènes (*P. entomophila*, *P. aeruginosa* et *S. marcescens*) ce qui induit la mort des drosophiles infectées par septicémie (Amcheslavsky and Ip, 2008; Apidianakis et al., 2009; Biteau et al., 2008; Buchon et al., 2009b; Choi et al., 2008; Jiang et al., 2009, 2016).

Par ailleurs, il a été montré que les dérégulations intestinales sont plus répandues chez les drosophiles âgées (Jasper, 2015). La perturbation de l'homéostasie intestinale chez les drosophiles âgées semble être liée à la dérégulation de l'interaction entre la flore commensale et l'épithélium intestinal ce qui résulte en une dysbiose (déséquilibre de la flore commensale) induisant une inflammation. Cette inflammation est responsable de la stimulation chronique de la prolifération des cellules souches intestinales (Guo et al., 2015). Les dérégulations intestinales comportent une forte production de ROS, une sur-activation de la réponse immunitaire intestinale (sur-activation de la voie IMD) qui va cibler la flore commensale induisant un déséquilibre entre les différentes bactéries composant la flore commensale, une prolifération incontrôlée des cellules souches intestinales due à une sur-activation chronique de la voie JNK par les ROS et la flore commensale ce qui conduit à l'apparition de la dysplasie. L'accumulation de cellules indifférenciées peut engendrer des désordres métaboliques affectant les capacités d'absorption et la digestion (réduction de l'activité trypsique, réduction de l'expression de lipases intestinales et diminution du stockage d'énergie (glycogène et triglycérides)), (Biteau et al., 2010; Jasper, 2015; Karpac et al., 2013).

La barrière intestinale joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre l'infiltration des agresseurs dans la circulation générale. Chez la drosophile, Rera et ses collègues ont montré que la perte de l'intégrité intestinale chez les drosophiles âgées est liée à des dysfonctionnements au niveau de la barrière intestinale (Rera et al., 2011). Par conséquent la mortalité observée chez ces drosophiles se produit suite à une infection systémique.

Chez l'homme, les changements dans la composition de la flore commensale (liés à plusieurs facteurs : génétiques, diététiques, stress biologiques...) semblent être en partie impliqués dans l'apparition ou le développement de plusieurs pathologies intestinales (maladies inflammatoires, cancers colorectaux, désordres métaboliques...) (**Figure 12**). Par exemple, 50% de la population occidentale développent des polypes intestinaux qui sont susceptibles de donner des cancers chez les personnes âgées et ceci semble être lié en partie à des déséquilibres de la flore commensale, (Claesson et al., 2012; Kaser et al., 2010; Kostic et al., 2012; Uronis et al., 2009; Wei et al., 2014). De plus, des dysfonctionnements de la barrière intestinale chez l'homme ont été liés à des syndromes de dysfonctionnement des organes et peuvent suggérer un rôle critique de cette barrière dans l'apparition de certaines maladies (**Figure 12**), (Doig et al., 1998; Engen et al., 2015).



**Figure 12** : Schéma décrivant les conséquences de la dysbiose chez l'être humain : la perturbation de l'homéostasie de la flore commensale (dysbiose) et la rupture de la barrière intestinale sont associées avec plusieurs maladies (décrites sur le schéma). La dysbiose peut être cause par plusieurs facteurs, entre autres les stress biologiques. Les intoxications bactériennes peuvent participer à l'enclenchement de cette dysbiose surtout chez les sujets prédisposés et chez les personnes âgées (Engen et al., 2015).

## Chapitre IV

### **Objectifs de la thèse : Etude des effets de *Btk* sur la physiologie intestinale**

*Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) est le bioinsecticide le plus utilisé dans le monde. De ce fait, il est de plus en plus répandu dans la nature. Certains effets non intentionnels ont été observés chez plusieurs espèces non cibles (**voir introduction pages 31-33**), entre autres chez l'homme. Toutes les études décrivant les effets non intentionnels utilisent des tests toxicologiques ou des observations épidémiologiques. Aucune étude fonctionnelle et mécanistique n'a été faite pour voir le devenir des sporanges de *Btk* et leurs toxines dans l'organisme ingérant ces sporanges et les possibles modifications physiologiques qu'elles peuvent induire. Les bioinsecticides *Btk* ciblent l'intestin chez les insectes cibles. L'intestin est un milieu propice pour leur germination et les toxines Cry libérées détruisent les cellules intestinales pour permettre aux bactéries d'envahir tout l'organisme. Chez les espèces non cibles, les spores de *Btk* germent et les toxines Cry sont dissoutes sans qu'elles manifestent une toxicité aiguë. L'hypothèse la plus admise expliquant l'absence de toxicité aiguë est l'absence des récepteurs secondaires des Cry chez les espèces non cibles. Dans ce cas les toxines Cry activées ne peuvent pas s'oligomériser pour former des pores au niveau des entérocytes.

Malgré l'absence de dégradation de l'intestin, les spores de *Bt* trouvent les bonnes conditions pour germer. Par ailleurs, il est connu que l'ingestion de bactéries allochtones peut perturber la physiologie intestinale et que l'exposition chronique à ces bactéries peut avoir à long terme des conséquences délétères sur l'organisme. Mon projet de thèse avait pour objectif d'examiner par des approches génétiques et cellulaires les effets non intentionnels du bioinsecticide *Btk* sur la physiologie intestinale du modèle *Drosophila melanogaster*. Cette stratégie permet de mettre en évidence des effets non décelables/déTECTABLES par des approches toxicologiques classiques mais qui peuvent avoir des conséquences importantes à long terme sur la santé de l'organisme.

Le sporange de *Btk* est un système à plusieurs composantes formé par la spore (bactérie en état de dormance) et plusieurs types de toxines dont les toxines Cry (**Figure 1**).

Pour faciliter l'interprétation des observations et des résultats, l'équipe a choisi d'étudier séparément chaque composante des sporanges *Btk*: la forme végétative de *Btk* (la bactérie), les toxines Cry, le sporange de *Btk* sans toxines Cry, et le sporange de *Btk* avec les toxines Cry.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée à l'étude de l'effet de la bactérie *Btk* sur la physiologie intestinale de la drosophile. Par la suite j'ai commencé à examiner les effets du sporange *Btk* et ses toxines Cry. Pour être le plus proche possible des conditions environnementales j'ai décidé d'examiner les effets de *Btk* en utilisant la dose « environnementale », c'est-à-dire la dose préconisée dans les produits commercialisés de *Btk* et c'est aussi la dose qu'on trouve sur nos légumes et nos fruits après l'aspersion (<https://www.anses.fr/fr/system/files/DPR2013sa0039.pdf>).



## **Partie II: Résultats et discussion**

# **Chapitre I**

## **Effets de *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) sur la physiologie intestinale**

## I-1 Méthode standardisée d'intoxication des drosophiles

Le protocole décrit ci-dessous a été mis au point dans notre laboratoire en s'appuyant sur les nombreux travaux publiés dans le domaine et en tenant compte des doses d'utilisation « plein champ » du bioinsecticide *Btk*. Il permet ainsi une très grande reproductibilité des résultats et limite les variations liées au sexe, la température, la lumière, la nourriture, etc. Ce protocole est utilisé dans toutes mes expériences. Des drosophiles femelles âgées de 3 à 5 jours sont utilisées (car plus grosses et donc plus facile à disséquer et leur intestin est totalement mature 3 jours post-éclosion). Toutes les expérimentations *in vivo* sont effectuées à 25°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, sauf pour les expérimentations de longévité (drosophiles maintenues à 29°C) et les expérimentations avec le système UAS/GAL4 thermo-inductible qui nécessitent un passage à 29°C pour activer le système (**voir introduction page 41 et Figure 4**). Les mouches sont élevées sur du milieu nutritif standardisé. Les drosophiles sont mises à jeûner 1h30 avant intoxication afin de synchroniser la prise de nourriture. Les solutions d'intoxications (avec les bactéries ou les sporanges) sont déposées sur un papier filtre dans des tubes de 5 cm<sup>2</sup> de surface. Les doses utilisées dépendent des expérimentations (soit 10<sup>6</sup> CFU/drosophile, soit 10<sup>8</sup> CFU/drosophile). Pour chaque expérimentation, 10 mouches sont introduites par tube. Comme contrôles, j'ai intoxiqué les drosophiles soit par du LB-sucrose à 5% (contrôle pour les intoxications avec les bactéries), soit par de l'eau (contrôle pour les intoxications avec les sporanges car les sporanges sont dilués dans l'eau). Les drosophiles ne sont pas changées de tubes pour qu'elles restent en contact avec le milieu traité. Les drosophiles sont ensuite prélevées pour dissection à différents temps selon les expérimentations (de 1h à plusieurs jours post-ingestion).

## I-2 Effets de la bactérie *Btk* sur la physiologie intestinale

### I-2-1 Résumé

Les formulations bioinsecticides à base de *Btk* sont formées majoritairement par les sporanges de *Btk* et les toxines Cry. Les sporanges de *Btk* sont composés de la spore (bactérie en état de dormance) et l'inclusion cristalline renfermant les toxines Cry (**Figure 1**). Une fois ingérés, les sporanges de *Btk* peuvent éclater dans l'intestin de l'hôte et libérer spores et toxines. En trouvant des conditions propices, les spores *Btk* sont capables de germer pour redonner la forme végétative. Le premier objectif de ma thèse était d'étudier les effets de la bactérie végétative *Btk* sur la physiologie intestinale en utilisant la dose d'épandage ( $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>/drosophile) pour s'approcher le plus possible de ce qui se passe dans la nature. D'autres bactéries dont les effets sur l'intestin sont plus au moins bien caractérisés ont été utilisées comme contrôles (le pathogène opportuniste *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc*), le pathogène *Pseudomonas entomophila* (*Pe*) et la bactérie commensale *Lactobacillus plantarum*). Ces bactéries ont été déposées sur le milieu nutritif et sont donc ingérées avec la nourriture. L'épithélium intestinal est donc le premier organe en contact avec les bactéries ingérées. Chez la drosophile, l'ingestion de fortes doses de bactéries opportunistes telles qu'*Ecc* (plus de  $10^8$  CFU par drosophile) ou de pathogènes tels que *Pe* induit l'apoptose des entérocytes. Cette apoptose stimule la prolifération des cellules souches intestinales pour remplacer les entérocytes mourants. Ce modèle est appelé «mort cellulaire régénératrice», (voir introduction pages 72-76 et **Figure 9**). A une dose plus faible ( $10^6$  CFU par drosophile), les bactéries *Btk* sont éliminées rapidement au bout de 4 heures, et pourtant, ce passage rapide est suffisant pour stimuler la régénération intestinale sans qu'il y ait apoptose d'entérocytes. En examinant l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress par RT-q-PCR ou par l'utilisation de gènes rapporteurs, nous avons observé une activation de la voie de signalisation JNK et une production des cytokines Upd par les entérocytes 4 heures après intoxication. J'ai ensuite vérifié que la production des cytokines Upd induisait bien la voie de signalisation JAK/STAT dans les ISC (ref au chapitre de l'intro où tu l'expliques). En conséquence, j'ai observé une prolifération des ISC et cette prolifération des ISC est bloquée lorsque j'ai inhibé la voie JAK/STAT spécifiquement dans les ISC. Fait intéressant, j'ai observé le même résultat avec une faible dose d'*Ecc*. A l'instar de faibles doses de *Btk*, la dose de  $10^6$  CFU par drosophile d'*Ecc* n'induit pas non plus de mort cellulaire, et pourtant,

elle stimule la prolifération des cellules souches intestinales. Ces résultats inattendus nous laissent suggérer que la stimulation de la prolifération des ISC n'est pas seulement liée à la mort des entérocytes comme cela a déjà été décrit dans le modèle de « mort cellulaire régénératrice » (Amcheslavsky and Ip, 2008; Apidianakis et al., 2009; Biteau et al., 2008; Buchon et al., 2009b; Choi et al., 2008; Jiang et al., 2009, 2016). En effet, une activation modérée de la voie JNK et de la production des cytokines Upd est suffisante pour stimuler le processus de renouvellement intestinal suite à l'ingestion de faibles quantités de bactéries végétative qu'elles soient Gram+ (*Btk*) ou Gram- (*Ecc*).

La prolifération des ISC induite par *Bt* ou *Ecc* n'est pas sans conséquences. En effet, les ISC en se divisant donnent naissances à des entéroblastes. Ces derniers se différencient en entérocytes. Par conséquent, l'augmentation significative du nombre d'entérocytes en absence de mort cellulaire affecte les fonctions digestives de l'intestin. Nous avons observé une réduction de l'activité des enzymes digestives de type trypsine et une diminution du stockage des lipides associés à une baisse de l'expression du gène codant pour la lipase A. Nous avons aussi constaté une réduction significative de la longévité après une exposition chronique à ces deux bactéries. En examinant les différentes jonctions cellulaires intestinales, nous n'avons pas vu une dégradation de la barrière intestinale car l'étanchéité et la polarité ne sont pas affectées suite à l'ingestion de *Btk* ou *Ecc*.

La poursuite de mes investigations a montré que l'augmentation du nombre d'entérocytes est transitoire, car l'intestin rétablit son homéostasie cellulaire cinq jours après intoxication. J'ai ensuite montré que l'élimination de ces entérocytes surnuméraires est liée à l'induction d'une vague d'apoptose qui cible spécifiquement les vieux entérocytes. De manière intéressante, la survenue d'apoptose pour éliminer des cellules surnuméraires a déjà été décrite au cours du développement de l'œil de drosophile. Une étude a démontré l'implication de la voie Hpo pour éliminer les cellules inter-ommatidiales surnuméraires du disque imaginal d'œil de la drosophile au cours du développement (Kango-Singh and Singh, 2009). J'ai donc voulu vérifier si elle pouvait avoir le même rôle dans un organe adulte. Les résultats que j'ai obtenus avec une dizaine d'expérimentations faites avec différents acteurs de la voie Hippo démontrent son implication dans l'induction de l'apoptose des entérocytes surnuméraires (précisément les vieux entérocytes). Entre autres, l'inhibition de la kinase Hippo ou la surexpression de son facteur de transcription Yki ou de sa cible anti-apoptotique Diap1 dans les entérocytes sont suffisantes pour inhiber l'apoptose de ces cellules.

Toutes ces observations fondamentales apportent de nouveaux éclaircissements quant aux mécanismes régulant l'homéostasie intestinale après un stress bactérien modéré. Mes travaux démontrent que la « mort cellulaire régénératrice » n'est pas le seul mécanisme permettant un renouvellement de l'épithélium suite à une ingestion de bactéries. Ce mécanisme est nécessaire lors d'une forte agression de l'intestin mais dans des conditions plus « environnementales » que nous rencontrons probablement quotidiennement, il n'est pas requis. J'ai ainsi montré qu'un mécanisme de renouvellement cellulaire plus modéré se met en place indépendamment de l'apparition de mort cellulaire. Tous les résultats décrits sont détaillés dans un article soumis au journal « *Development* » :

### **I-2-2 Article Loudhaief et al., 2016**

« *Apoptosis restores cellular density in the Drosophila midgut by eliminating the excess of enterocytes physiologically or genetically induced* » (en revision à *Development*)

Rihab Loudhaief, Alexandra Brun-Barale, Olivia Benguettat, Marie-Paule Nawrot-Esposito, David Pauron, Marcel Amichot, and Armel Gallet



**Apoptosis restores cellular density in the *Drosophila* midgut by eliminating the excess of enterocytes physiologically or genetically induced**

Rihab Loudhaief, Alexandra Brun-Barale, Olivia Benguettat, Marie-Paule Nawrot-Esposito, David Pauron, Marcel Amichot, and Armel Gallet\*

INRA, Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France

\*Correspondence: [gallet@unice.fr](mailto:gallet@unice.fr)

## **Abstract**

Using pathogens or high amounts of opportunistic bacteria to damage the gut, studies in *Drosophila* identified many signaling pathways involved in gut regeneration. Dying cells are emitting signal molecules that accelerate intestinal stem cell proliferation and progenitor differentiation to quickly replace the dying cells. This process has been named "regenerative cell death". Here, mimicking environmental conditions, we point out a mechanism of gut cellular renewing independent of the regenerative cell death. We show that the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria, owing to the moderate induction of the JNK pathway that stimulates stem cell proliferation, was sufficient to launch a cellular renewing program despite the brief passage of bacteria in the gut and the absence of cell death. Consequently, the addition of new differentiated cells to the gut epithelium, without preceding cell loss, leads to enterocyte overcrowding. Finally; we showed that a couple of day later, the right density of enterocytes is promptly restored thanks to a wave of apoptosis involving Hippo signaling and preferentially removing old enterocytes.

Keywords: Opportunistic bacteria; Apoptosis; Cellular homeostasis; *Drosophila* intestine; JNK signaling; Hippo signaling

## INTRODUCTION

In the animal kingdom, the digestive tract (DT) is a vital organ required for nutrient absorption and also constitutes the first barrier against pathogens and toxins ingested along with food. In both vertebrates and invertebrates, well-conserved mechanisms of defense have been elaborated to maintain DT epithelial integrity and prevent aggressors from the lumen (the external environment) to penetrate into the internal milieu. Among these mechanisms of defense, the DT triggers a cell replenishment program to rapidly replace damaged cells upon injury (Sun and Irvine, 2014).

Many studies have been performed in *Drosophila* to gain insight into the mechanisms underlying intestine regeneration upon pathogenic intoxication or injury (Sun and Irvine, 2014). Deciphering these mechanisms has highlighted the importance of many conserved signaling pathways already known to be required for the maintenance of gut homeostasis under normal conditions. The *Drosophila* posterior midgut epithelium shares some similarity with the vertebrate intestine and consists of 4 cell types. The basally located intestinal stem cells (ISCs) serve to regenerate each gut cell type. Upon division, ISCs can either give rise to ISCs and/or enteroblasts (EBs). EBs can then differentiate either into absorptive enterocytes (ECs) or secretory enteroendocrine cells (ee) (Pasco et al., 2015).

Two Gram-negative bacteria have been primarily used to study gut regeneration upon ingestion: the opportunistic *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc*) and the entomopathogenic *Pseudomonas entomophila* (*Pe*). Large amounts of *Ecc* or smaller amounts of *Pe* lead to EC damages, then death (Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2010; Chatterjee and Ip, 2009). The chronology of the events is now well described: less than 4h post-ingestion, ECs produce Reactive Oxygen Species (ROS) to fight the ingested bacteria. In the same time window, due to cellular damage and death caused by the production of ROS as well as by the ingested bacteria, JNK and Hippo (Hpo)/Yorkie (Yki) stress signaling pathways are activated in ECs. Activation of these pathways results in the nuclear translocation and activation of the

transcription factors Ap1 (downstream of JNK pathway) and Yorkie (Yki) that induce the expression of cytokine and growth factor-encoding genes. During the next 24-48h, those secreted factors act non-autonomously on ISCs, increasing their rate of proliferation to generate more EBs which then differentiate into new ECs to replace the dead ones (Apidianakis et al., 2009; Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2010; Cronin et al., 2009; Jiang et al., 2009; Kim and Lee, 2014; Kux and Pitsouli, 2014; Lee et al., 2013; Myant et al., 2013; Osman et al., 2012; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010; Sun and Irvine, 2014; Zhou et al., 2013). The dedicated process of cell replenishment is termed "regenerative cell death" where dying cells are releasing a variety of growth factors and cytokines involved in tissue repair and/or regeneration (Sun and Irvine, 2014; Vriza et al., 2014). Increasing the speed of gut replenishment upon injury helps at maintaining the barrier function of the gut epithelium, avoiding the penetration of bacteria into the internal milieu. Failure to properly replenish the gut lining generates holes in the epithelium, facilitating pathogen invasion of the body, ultimately leading to sepsis-induced death.

The studies summarized above were performed using either a large amount of opportunistic bacteria or pathogenic bacteria. However, under normal conditions, the DT is constantly in contact with smaller amounts of bacteria swallowed along with food. Here, using the *Drosophila* adult midgut, we investigated the effect of dietary exposure to low amounts of opportunistic bacteria on gut cellular homeostasis. Surprisingly, ingestion of low amounts of Gram+ or Gram- bacteria, despite their rapid elimination, triggers a cell renewing program, while not inducing intestinal cell death. Consequently, within a couple of days, the newly added differentiated ECs cause an excess of differentiated cells, significantly diminishing the digestive capacities of the gut although polarity and integrity of the epithelium are maintained. Interestingly, we showed that the gut homeostasis is restored 2-3 days after bacteria clearance thanks to a wave of apoptosis preferentially removing old ECs. Interestingly, a similar wave of apoptosis is also involved to eliminate an excess of EC

genetically induced. Finally, we demonstrate that the Hpo signaling pathway is necessary to trigger the wave of apoptosis removing the supernumerary cells.

## RESULTS

### **Low amounts of opportunistic bacteria induces a mild early stress response in the *Drosophila* posterior midgut**

To assess the impacts on the intestinal epithelium of ingesting a small amount of **opportunistic** bacteria along with food, we chose the Gram-positive *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) because this bacterium is used worldwide as bioinsecticides in agriculture and can be therefore present at low concentration in food. Moreover, *Btk* is also known as a potent opportunistic bacterium for many organisms (Raymond et al., 2010), and being responsible, among others, for nosocomial diseases or food-poisoning associated diarrheas (Celandroni et al., 2014).

To define what we called "low doses" of ingested bacteria, we took in account the amount of *Btk* found on the vegetables after one aerial spreading *i.e.*  $1.10^5$  colony forming units (CFU)/g (Frederiksen et al., 2006; Stephan et al., 2014) and the application doses recommended by the manufacturers of *Btk* bioinsecticides, *i.e.*  $5.10^5$  to  $2.5 \cdot 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> depending on the type of crop to treat. Therefore, we exposed adult flies to bacteria by contaminating the culture medium with  $1.10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly (referred as  $10^6$  CFU in the following text). Flies were then left on the contaminated medium until dissection. *Btk* was completely eliminated from the midgut in less than 4 hours post-ingestion (PI) (Fig. 1A). The maximal number of bacteria we detected in the midgut was approximately 100 CFU, present 1 hour PI. We noticed that *Btk* was rapidly cleared from the surface of the culture medium (data not shown) highlighting the fact that flies were not submitted to chronic intoxication. Conversely when flies were fed with higher amounts of *Btk* (e.g.  $1.10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly) the bacteria persisted for a longer time in the gut (Fig. 1A). Finally, when flies were fed with low

doses ( $1.10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly) of the commensal Gram+ bacterium *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), the bacteria were still detected in the gut 3 days post ingestion at the dose of  $10^4$  CFU/gut (Fig. 1A) (Storelli et al., 2011). Of note, we easily differentiated the food-provided *L. plantarum* from the indigenous one present in the commensal flora of our *Drosophila* strains since we assessed the amount of indigenous *L. plantarum/brevis* at  $1.5 \cdot 10^2$  CFU/gut (i.e. 100 times less, data not shown).

Because low amounts of *Btk* were rapidly eliminated from the intestine, we wondered whether its transient presence could nevertheless trigger a stress reaction in the posterior midgut epithelium. Thus, we followed the activation of both JNK and Hpo/Yki signaling pathways by monitoring the expression of their target genes using either *lacZ* reporter genes or RT-qPCR. We found that, 4 hours following the ingestion of low amounts of *Btk*, the expression of the JNK signaling reporter gene *puc-lacZ* was indeed induced in ECs (Fig. S1A and S1B). We confirmed the induction of *puc* by RT-qPCR (Fig. 1B). Nevertheless JNK signaling activation was no longer maintained 24h PI (Fig. S1G). We did not observe any Hpo/Yki target gene induction (*Diap1* and *expanded (ex)*) (Fig. 1B). We next wondered whether ingestion of low amounts of the Gram-negative model bacterium *Ecc* could also trigger a brief and moderate stress response by the gut. As expected, ingestion of low amounts of *Ecc* ( $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly) induced a similar brief and moderate gut response although we noticed an induction of the Hpo/Yki target gene *ex* (Fig. 1B and Fig. S1D and I). As control, we used the commensal *L. plantarum* also at  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly that did not trigger any stress signaling in the adult gut (data not shown).

To fine-tune the read-out of our study, we included two other genes encoding the cytokines, *upd1* and *upd3*, which are known to be induced by both JNK and/or Yki signaling in ECs following ingestion of *Pe* or high amounts of *Ecc* and to be responsible for ISC proliferation upon damages (Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2009b; Bunker et al., 2015; Jiang et al., 2009; Karpowicz et al., 2010; Osman et al., 2012; Patel et al., 2015; Ren et al.,

2010; Shaw et al., 2010; Staley and Irvine, 2010). We found that low amounts of *Btk* activated *upd1*, but not *upd3*; while low amounts of *Ecc* activated *upd1* (although not significant in our statistical test) and *upd3* (Fig. 1B). We further compared the results we obtained for the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria with the stress induced by the ingestion of low amounts of the entomopathogenic *Pe* (Fig. 1B) or high amounts of *Btk* or *Ecc* ( $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>/fly) (Fig. S1K). As expected, all the target genes were activated. Moreover, the amplitude of *upd1* and *upd3* induction was greatly increased (Fig. S1K). We noticed that the Gram-positive *Btk* preferentially induced *upd1*, while the Gram-negative *Ecc* induced *upd3* and *Pe* both (Fig. 1B and Fig. S1K). We also observed that when flies were fed with high amounts of *Btk* or *Ecc*, the tissue stress was maintained for a longer time, as highlighted by the prolonged expression of *puc-lacZ* 24h PI (Fig. S1H and J). Therefore, our data demonstrated that the ingestion of low amounts of opportunistic Gram-negative or Gram-positive bacteria triggers a mild and brief stress response by the posterior midgut.

Because JNK signaling has been shown to be the first stress signaling pathway activated upon huge damages (in less than 30min); (Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2009b; Jiang et al., 2009), we wondered whether JNK signaling was also responsible for the primary response of the gut to a moderate stress. Therefore, we assessed the expression of *puc*, *upd1*, *upd3*, *ex* and *Diap1* 4 hours PI in homozygous mutant females for the loss of function allele *hep*<sup>1</sup> (*hemipterous* (*hep*) encodes for the upstream JNK activating kinase (JNKK)) fed with either low amounts of *Btk*, *Ecc* or *Pe*. Interestingly, none of these target genes were expressed (Fig. 1C) even with *Pe*. Therefore the stress response of the gut to the ingestion of low amounts of opportunistic or pathogenic bacteria appears to primarily depend on JNK signaling activation.

### **Mild-stress induces ISC proliferation and an accumulation of enterocytes**

Although the ingestion of low amounts of *Btk* or *Ecc* only moderately induced a stress response by the gut, we wondered whether this was sufficient to trigger ISC proliferation. We first monitored the mitotic indices of ISC using the Phospho-Histone 3 (PH3) antibody in the whole midgut. We observed an increase of mitotic ISCs with a peak 48h PI although weaker than in flies fed with  $10^8$  CFU (Fig. 2A). As it has been shown that the Upd/JAK/STAT signaling is required in ISC to stimulate their proliferation upon the ingestion of *Pe* or *Ecc* (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2011; Jiang et al., 2009; Osman et al., 2012; Zhou et al., 2013), we tested whether this was also the case upon ingestion of low amounts of *Btk*. We blocked Upd/JAK/STAT signaling in ISCs by temporally expressing a dominant negative form of the Upd receptor Dome (Dome<sup>ΔCyt2-3</sup>) using the TARGET system (McGuire et al., 2003) with the *escargot<sup>ts</sup>* driver (*esg<sup>ts</sup>*, expressed in ISCs and EBs, (Micchelli and Perrimon, 2006)) and fed these flies with low amounts of *Btk*. As expected, ISC proliferation was blocked (Fig. 2B) and no increase in *esg>GFP* cells was observed (Fig. S2A-D). Therefore, as for *Ecc* and *Pe*, the Upd/JAK/STAT signaling is also required in ISC to stimulate their proliferation upon ingestion of low amounts of *Btk*.

Since upon division ISCs give rise to EBs, we next followed the number of progenitor cells (ISCs + EBs) in the posterior midgut using the *esg-lacZ* or *esg>GFP* markers. A higher density of *esg*<sup>+</sup> cells was present from day 1 until day 4 PI (Fig. 2C and E-H"). However, at day 3 PI, many of the *esg*<sup>+</sup> cells no longer divided (Fig. 2A and C) and were already committed towards EC differentiation. Indeed, those cells also expressed the EC marker *myo1A>GFP*, indicating that they correspond to early ECs (eECs) (yellow arrows in Fig. 2G' and G"). Since eECs (*esg-lacZ*<sup>+</sup>, *myo>GFP*<sup>+</sup>) have not completed their endoreplication (Bardin et al., 2010), they are also recognizable by their smaller nucleus compared to old ECs (*esg-lacZ*, *myo>GFP*<sup>+</sup>; white arrowheads in Fig. 2G").

The addition of new ECs was correlated with an increase (about 20%) in the density of ECs between days 1 and 3 PI (red curve in Fig. 2D) while the number of ee remained constant (Fig. 2E', F', G', H' and Fig. S2E). Moreover, the excess in ECs resulted in a disturbance of the midgut epithelium as illustrated by the formation of EC multilayers and a change of EC cell shape from hexagonal to round with an extended apical pole (Fig. 2E-G" and Fig. S3A-C"). Nonetheless, epithelial polarity was maintained as illustrated by the proper positioning of different apico-basal markers (Fig. S3 B-C"). Interestingly this phenomenon was also conserved upon the ingestion of a small amount of *Ecc* (Fig. S2F-J and Fig. S3D-E"). The gut recovered its cellular homeostasis and structure within 5 or 6 days after exposure to *Btk* or to *Ecc*, respectively (Fig 2C, D and H-H", Fig S2F-J). Therefore, our data show that ingestion of low amounts of opportunistic bacteria triggers an accelerated cell renewal program, which generates a transient enterocyte accumulation in the posterior midgut.

### **Early absence of cell death is responsible for EC accumulation**

The EC accumulation appeared to be linked with the ingestion of low amounts of bacteria since when flies were fed with higher amounts of bacteria (*Btk* or *Ecc*) no EC accumulation was observed. On the contrary, we and others observed a decrease in EC density under those conditions (grey curve in Fig. 2D)(Buchon et al., 2010), even though the number of mitotic ISCs and progenitor cells was higher than upon the ingestion of lower amounts of bacteria (Fig. 2A and C)(Buchon et al., 2010). Therefore, we hypothesized that, while accelerating the cell renewal program at low bacterial doses ( $10^6$  CFU), the brief passage of bacteria in the gut may not be sufficient to promote cell death. Thus, the addition of new ECs to the epithelium may lead to an excess of ECs.

We first verified that high amounts of *Btk* and *Ecc* are indeed capable of inducing cell death. As expected  $10^8$  CFU of *Btk* or *Ecc* significantly increased the number of apoptotic ECs (labeled by the anti-activated-Caspase 3 antibody) at day 1 PI as compared to

unchallenged flies (Fig. 3A and C and Fig. S4B) (Buchon et al., 2009b). About 12% of ECs were labeled by the anti-Casp3 antibody as compared to 1.8% in unchallenged guts (Fig. S4E). In fact, as mentioned above, there were less ECs at day 1, 2 and 3 PI than in unchallenged flies (Fig. 2D). Interestingly, at day 4 PI, the number of ECs was equivalent to that of unchallenged guts, indicating that the cell replenishment program had efficiently replaced dead ECs (Fig. 2D).

As expected, when flies were fed with  $10^6$  CFU of *Btk* or *Ecc*, we did not detect any cell death during the first day (Fig. 3B and Fig. S4A and E). Therefore, if the excess of ECs was indeed due to the absence of cell death, inducing EC apoptosis genetically should suppress the supernumerary ECs. Using the TARGET system, we briefly expressed the pro-apoptotic gene *grim* specifically in ECs soon after ingestion of *Btk* and counted the number of ECs at day 3 PI (see method in Fig. 3D). In agreement, forced EC apoptosis (Fig. S4C) compensated for the lack of *Btk*-induced EC death and no excess of ECs was observed (Fig. 3E and Fig. S4D).

To confirm that the excess of ECs was indeed caused by the addition of newly formed ECs as well as the absence of early cell death, we marked all newborn ECs with  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ Gal) antibodies from the time of *Btk* ingestion to the peak of EC number (at day 3) by combining the "flip out" and TARGET systems (see Supplemental Procedures). We then compared the percentage of marked ECs in guts from unchallenged,  $10^6$  CFU- and  $10^8$  CFU-fed flies at days 1 and 3 PI. In unchallenged flies only 1.9% of ECs were marked after one day and about 6% were labeled at day 3 PI (Fig. 3F, I and L). We also observed that a little over 12 days were necessary to completely renew the gut epithelium (Fig. S4F-H'), which is consistent with previous estimates ranging between 12 (Jiang et al., 2009) and 21 days (Antonello et al., 2015). In  $10^6$  CFU fed flies, 11.3% of ECs were labeled at day 1 and 18.2% at day 3 (Fig. 3G, J and L). Since this percentage is close to the percentage of total EC increase (Fig. 2D), the excess of ECs can indeed be attributed to the addition of newborn ECs

to the epithelium and the absence of early bacterial-induced apoptosis. In contrast, although the proportion of newborn ECs labeled at day 3 PI was much larger (almost 28%) in flies fed with  $10^8$  CFU of *Btk* (Fig. 3H, K and L), the total number of ECs was reduced (Fig. 2D), demonstrating that the cell replenishment program is barely sufficient to overcome early-occurring EC death. Taken together our results demonstrate that the excess of ECs observed during the three days following the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria is due to the induction of a mild cell renewal program in absence of bacteria-induced cell death.

### **A late wave of cell death eliminates supernumerary ECs**

We further investigated how the midgut resorbs the excess of ECs to return to its homeostatic state. One efficient mechanism to return to homeostasis could be the elimination of supernumerary ECs by apoptosis. We therefore monitored apoptosis from the day following the intoxication by  $10^6$  CFU of *Btk* up until midgut recovery. No cell death was observed at 1 day PI as mentioned above (Fig. 3B). However, we started to detect apoptotic ECs during day 2 PI, with a peak at day 3 PI. EC apoptosis then decreased during day 4 PI and had disappeared by day 5 PI (Fig. 4A-I). To demonstrate that EC apoptosis is required to restore cellular homeostasis of the posterior midgut, we blocked EC death (using the anti-apoptotic p35 factor) from day 2 PI onwards and checked whether the excess of ECs was maintained. As expected, while control midguts had regained their normal cell density by day 5 PI, (Fig. 4H and L), midguts in which cell death had been blocked still displayed an excess of ECs (Fig. 4J and L and Fig. S5A). We also noticed that inhibiting EC death in unchallenged flies slightly increased the number of ECs (UC *myoIA<sup>Δs</sup>*>*p35* in graph Fig. 4L), mostly reflecting the inhibition of naturally occurring cell death (dark red in Fig. 4I). We further transiently blocked apoptosis during day 2 PI (according to the protocol in Fig. 5B). In this case, EC excess was prolonged (Fig. S5B) and EC apoptosis was delayed, only peaking at day 5 PI (i.e. once the inhibition had faded) (Fig. 4K). Hence, apoptosis is indeed the mechanism employed

for the elimination of supernumerary ECs. To control that the wave of EC apoptosis was specific to the excess of ECs and not due to residual opportunistic bacteria remaining in the gut, we monitored the occurrence of apoptotic cells 3 days PI in *esg<sup>ts</sup>>Dome<sup>4Cyt2-3</sup>* flies fed with low amounts of *Btk*. In these flies there was neither ISC proliferation (Fig. 2B) nor accumulation of ECs (Fig. 4M). Consequently we did not observe any apoptotic cell 3 days PI (Fig. 4N).

We then wondered whether inducing genetically an excess of ECs would also trigger a wave of apoptosis to remove supernumerary ECs. To explore this possibility, we used the ISC specific driver *delta-Gal4* to transiently express the *Ras<sup>85D</sup>* oncogenic allele (*dl<sup>ts</sup>>Ras<sup>85D</sup>*). A pulse of 1h of *Ras<sup>85D</sup>* expression in ISC was sufficient to promote ISC proliferation as highlighted by the increase in the mitotic PH3 labeling (Fig. 4O). Interestingly, we observed a wave of apoptosis at day 3 (Fig. 4P) demonstrating that apoptosis is a physiological mechanism required to remove supernumerary EC whatever is the cause of their excess.

Finally, we asked whether the wave of EC death removed ECs randomly or selectively (i.e. the newborn ones and/or the old ones). To do so, we took advantage of the perdurance of the  $\beta$ Gal labeling and used a *Drosophila* line in which eECs are co-labeled by *esg-lacZ* and *myo1A>GFP* markers. Strikingly, we observed that at day 3 PI, dying ECs were never  $\beta$ Gal<sup>+</sup> (i.e. eECs, Fig. 4Q-Q"). On the contrary the Casp3 staining mainly marked old ECs recognizable by their large nuclei and their GFP labeling (Fig. 4Q' and Q"). We confirmed this result using the lineage tracing "Flip Out/TARGET" system that labels all newborn ECs with  $\beta$ Gal. Consistently, dying ECs were unmarked and had large nuclei, hence dying ECs were exclusively old ECs (Fig. 4R-R"). Together, our results demonstrate that following the induction (physiologically or genetically) of an excess of ECs, the midgut returns to its cellular homeostasis by triggering a wave of EC death that selectively removes old ECs.

### **Hpo is involved in EC apoptosis in response to their excess**

In order to gain further insight into the physiological process triggering cell death, we searched for the signaling pathways that might sense the supernumerary ECs and promote the wave of EC death. The JNK and/or Hpo/Yki pathways appeared as good candidates due to their known implication in the control of apoptosis. While JNK signaling corresponds to a cascade of phosphorylation ultimately leading to the activation of the transcription factor Ap1, the activation of the Hpo pathway ultimately results in retention of the Yki transcription factor in the cytoplasm and consequently to the repression of Yki target genes, (Halder and Johnson, 2011).

The JNK pathway was quickly ruled out because (i) the JNK target gene *puc* was not induced at the time of the wave of cell death (e.g. at days 1 and 3 PI, Fig. 5A and Fig. S1G and S6A) and (ii) overexpressing the JNK inhibitor Puc in ECs at day 2 PI did not inhibit EC death at day 3 PI (Fig. 5C). On the contrary, the Yki target genes *Diap1* and *ex* were induced at day 3 (Fig. 5A), as confirmed using *Diap1-lacZ* (Fig. 5D-E) and *ex-lacZ* (Fig. S6B-C) reporter genes. Remarkably, *Diap1*, which encodes an anti-apoptotic factor, was strongly expressed in non-apoptotic ECs (Fig. 5E-E"). We observed a similar *ex-lacZ* expression in non-dying cells (Fig. S6D-E"). Overexpressing either *Diap1* or *Yki* in ECs during day 2 PI (according to the protocol in Fig. 5B) inhibited EC apoptosis during the third day (Fig. 5F-H). These data suggest that Hpo activation in ECs might indeed be responsible for inducing apoptosis of supernumerary ECs by inhibiting Yki activity in cells destined to die. To verify this hypothesis, we first silenced *yki* expression in all ECs during day 2 PI and monitored apoptosis at day 3 PI (according to Fig 5B.). As expected, in *yki*-depleted guts, the ingestion of low amounts of *Btk* drastically increased EC apoptosis at day 3 PI as compared to wild type *Btk*-fed flies (compare Fig. 5J to 4F and Fig. 5K). It is noteworthy that in unchallenged guts, transient depletion of *yki* in the ECs did not significantly increase their apoptosis (Fig. 5I and K). We then transiently silenced *hpo* expression in ECs at day 2 PI (according to Fig. 5B).

Consistently, cell death was abolished at day 3 PI (Fig. 5L). Moreover, the excess of ECs was maintained and the wave of cell death was postponed to day 5 PI (Fig. 5M and N). Furthermore, continuous silencing of *hpo*, completely inhibited EC death up until day 5PI (Fig. S6F). To confirm this result, we used the "Flip Out" system to randomly and briefly silence *hpo* expression in the midgut epithelial cells during day 2 PI. In this case, EC apoptosis was observed exclusively in the tissue surrounding *hpo*-depleted cells (Fig. S6G-G"). We confirmed the requirement of Hpo signaling by transiently silencing *salvador* (*sav*, encoding the binding partner of Hpo, Fig. S6H and I). Finally, we performed an epistasis test to show that indeed Hpo is involved in the wave of apoptosis through the inhibition of Yki activity by transiently knocking down the expression of both *hpo* and *yki* in ECs (according to the protocol in Fig. 5B). As expected, a wave of cell death occurred at day 3 PI (Fig 5O) and the gut recovered its cellular homeostasis by day 5 PI (Fig. 5P). Taken together our data strongly suggest that activation of Hpo signaling acts autonomously in ECs to trigger the wave of apoptosis necessary to remove the supernumerary ECs induced by the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria.

### **Physiological consequences**

To complete our study, we assessed the functional impact underlying the excess of ECs, assuming that the digestive and absorptive functions of the gut might be reduced due to the presence of early immature ECs and of dying old ECs. Therefore, we monitored several metabolic and enzymatic parameters in the midgut. A reduction of EC lipid storage appeared by day 2 PI (Fig. 6A and B) which correlated with a lower expression of *lipaseA* (*lipA* - in charge of lipid absorption by ECs) at day 1 PI (Fig. 6C; (Karpac et al., 2013)). At day 3 PI, *lipA* expression increased again, likely compensating the impaired lipid absorption during the previous days. Protein digestion was also impaired as highlighted by the decrease in *trypsin*  $\epsilon$  expression and trypsin activity (Fig. 7D and E,(Biteau et al., 2008)). Since flies overcame

acute food poisoning without any mortality ([data not shown](#)), we wondered whether chronic ingestion of low amounts of *Btk* bacteria could affect fly longevity. Based on the fact that the gut needs 5 to 6 days PI to regain homeostasis, we provided flies with low amounts of bacteria ( $10^6$ CFU) once a week during all their life and further monitored their longevity. Under such chronic intoxication, fly longevity appeared reduced by almost 24% ([Fig. 6F](#)). Thus, our results indicate that acute ingestion of low amounts of opportunistic bacteria although apparently inoffensive transiently affects the digestive and absorptive functions of the gut and, on the long run, a chronic ingestion reduces lifespan.

## **DISCUSSION**

### **Cell renewing *vs.* cell replenishment**

In this study, we uncovered a new physiological mechanism to accelerate cellular gut renewing that probably occurs more frequently than the previously characterized regenerative cell death model. Indeed animals as well as humans are more likely to be subject to the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria than to the ingestion of virulent pathogens or high amounts of opportunistic bacteria. Upon ingestion of low amounts of bacteria, a cell renewal program is launched in spite of the fact that the ingested bacteria are rapidly eliminated from the gut without promoting any cell death. Our data demonstrate that ISC division is stimulated, but to a lesser extent than in the "regenerative cell death" program triggered by pathogens or harmful chemicals that promote widespread cell death ([Amcheslavsky et al., 2009](#); [Apidianakis et al., 2009](#); [Buchon et al., 2009a](#); [Chakrabarti et al., 2012](#); [Chatterjee and Ip, 2009](#); [Cordero et al., 2012](#); [Jiang et al., 2011](#); [Jiang et al., 2009](#); [Karpowicz et al., 2010](#); [Ren et al., 2013](#); [Ren et al., 2010](#); [Staley and Irvine, 2010](#); [Sun and Irvine, 2014](#); [Vriz et al., 2014](#)). Interestingly, the switch between accelerated cell renewing and regenerative cell death appears correlated with the activation of the Hpo/Yki signaling.

Indeed, we showed that low amounts of opportunistic bacteria briefly activate JNK signaling and do not promote cell death. Consequently, the mild induction of *upd* genes by JNK signaling in absence of cell death leads to a cell renewing program giving rise to an excess of ECs (Fig. 6G). Upon a stronger aggression (e.g. high amounts of opportunistic bacteria or *Pe*), the level of JNK signaling pathway activation is higher and prolonged (our work) (Buchon et al., 2009a). Knowing that (i) EC death can be caused by sustained activation of JNK signaling, (Apidianakis et al., 2009; Jiang et al., 2009), (ii) cells destined to die rapidly change their adhesive properties with their neighboring cells (Taylor et al., 2008) and (iii) Hpo/Yki signaling pathway is sensitive to cell-cell contact (Boggiano and Fehon, 2012), we propose that EC engagement toward apoptosis upon sustained JNK activation promotes changes in cell adhesion that repress Hpo, inducing Yki activities. This model is supported by the absence of Yki target gene activation by *Pe* when JNK signaling is abolished (Fig 1B). In agreement, it was previously shown that activation of the JNK pathway is able to induce Yki target gene expression to levels comparable with ours (Shaw et al., 2010). It has also been shown that overexpression of JNKK (Hep) in ECs promotes nuclear Yki localization (Staley and Irvine, 2010). Consequently, the concomitant activation of JNK and Yki strongly activates their common target genes such as *upd* cytokines. Those cytokines will non-autonomously induce ISC proliferation and differentiation to quickly replace the dying EC. Therefore it is likely that EC apoptosis occurring in regenerative cell death is in fact required to accelerate the rate of ISC proliferation rather than to trigger ISC proliferation *per se*. Switching from a cell renewal program to a cell replenishment program is probably necessary for an efficient replacement of the dying cells to maintain gut integrity upon huge damages.

### **Maintenance of cell density in the gut**

In this study, we showed that the excess of EC generated either by the ingestion of low amounts of opportunistic bacteria or genetically is rapidly overcome and the gut recovers its

normal EC number in less than a week thanks to a wave of apoptosis. This phenomenon presents similarities with the adaptation of gut size to nutrient availability. Indeed, while feasting stimulates gut growth, subsequent fasting for several days induces widespread apoptosis to reduce the size of the gut (O'Brien et al., 2011). This is also reminiscent to what happens during *Drosophila* eye development where the Hpo pathway controls the final size of the differentiating organ by inducing cell death to remove unspecified supernumerary interommatidial cells (Kango-Singh and Singh, 2009). Since we found that the Hpo pathway was involved in triggering the wave of apoptosis to remove the supernumerary ECs, our data show that a mechanism used during development can be reused during adulthood to facilitate the removal of extra cells and restore gut integrity (Fig. 6G). Moreover, in many vertebrate cell culture studies, Yki/Yap and Hpo signaling are involved in the sensing of cell morphology and density (Gaspar and Tapon, 2014). At low density, cells spread and Yki/Yap is nuclear, promoting cell proliferation. At higher density, cells are rounder and smaller, Yki/Yap is cytoplasmic and proliferation is halted (Ota and Sasaki, 2008; Varelas et al., 2010; Zhao et al., 2007). Therefore we assume that the implication of Hpo signaling in triggering the wave of apoptosis to remove supernumerary ECs could be due to both a change in EC shape and an increase in their density (Fig. 6G). Indeed we observed at day 1 PI, that the density of EC was higher and their shape become rounder with an increased apical pole (Fig. S3). Taken together these modifications can activate Hpo signaling leading to Yki inhibition and to the death of supernumerary ECs. This preferentially occurs in old ECs because they are probably more susceptible to cell shape change because this arises as soon as day one while eEC are not yet differentiated (the first eECs appear during day 3 PI). Moreover as ISCs are basally located in the gut epithelium, while the new eECs arise, the old ones are pushed toward the lumen facing the putative aggressors, thus protecting the new ones. Once the aggression is resolved, the old ECs (that may be damaged) are eliminated, leaving the new ones intact.

Finally, it is increasingly thought that the ingestion of bacteria may trigger or exacerbate inflammatory bowel diseases and/or colorectal cancer (Collins et al., 2011; Tjalsma et al., 2012). Our work thus brings new insight into the understanding of the mechanisms and signaling pathways that may be involved in those pathologies upon ingestion opportunistic bacteria along with the food.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*See supplemental data.*

## ACKNOWLEDGMENTS,

We are grateful to N. Tapon, J Colombani, R. Rousset, T. Adachi-Yamada, T. Ip, M. Kango-Singh, S. Hou, X. Zeng, Y. Apidianakis, C. Micchelli and D. Osman for fly stocks. We also would like to thanks R. Delanoue, J. Colombani and R. Rousset for constructive discussions and for critical analysis of the manuscript. We thank the Microscopy Platform of the Institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355- UNS - CNRS 7254, Sophia Antipolis) for access to instruments. R.L. was supported by a MESR grant from the French Government and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Other authors were supported by the INRA and the CNRS. This work was supported by the ANR-13-CESA-0003-01 grant.

## REFERENCES

- Amcheslavsky, A., Jiang, J. and Ip, Y. T.** (2009). Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **4**, 49-61. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.016.
- Antonello, Z. A., Reiff, T., Ballesta-Illan, E. and Dominguez, M.** (2015). Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch. *EMBO* **34**, 2025-41. doi: 10.15252/embj.201591517. Epub 2015 Jun 15.
- Apidianakis, Y., Pitsouli, C., Perrimon, N. and Rahme, L.** (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20883-8. Epub 2009 Nov 23.
- Bardin, A. J., Perdigoto, C. N., Southall, T. D., Brand, A. H. and Schweisguth, F.** (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* **137**, 705-14. doi: 10.1242/dev.039404.

- Biteau, B., Hochmuth, C. E. and Jasper, H.** (2008). JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* **3**, 442-55.
- Boggiano, J. C. and Fehon, R. G.** (2012). Growth control by committee: intercellular junctions, cell polarity, and the cytoskeleton regulate Hippo signaling. *Dev Cell* **22**, 695-702. doi: 10.1016/j.devcel.2012.03.013.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S. and Lemaitre, B.** (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev* **23**, 2333-44. doi: 10.1101/gad.1827009.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Kuraishi, T. and Lemaitre, B.** (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol* **8**:152., 10.1186/1741-7007-8-152.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S. and Lemaitre, B.** (2009b). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* **5**, 200-11. doi: 10.1016/j.chom.2009.01.003.
- Bunker, B. D., Nellimoottil, T. T., Boileau, R. M., Classen, A. K. and Bilder, D.** (2015). The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in *Drosophila*. *Elife* **4**, 10.7554/eLife.03189.
- Celandroni, F., Salvetti, S., Senesi, S. and Ghelardi, E.** (2014). *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* **361**, 95-103.
- Chakrabarti, S., Liehl, P., Buchon, N. and Lemaitre, B.** (2012). Infection-induced host translational blockage inhibits immune responses and epithelial renewal in the *Drosophila* gut. *Cell Host Microbe* **12**, 60-70. doi: 10.1016/j.chom.2012.06.001.
- Chatterjee, M. and Ip, Y. T.** (2009). Pathogenic stimulation of intestinal stem cell response in *Drosophila*. *J Cell Physiol* **220**, 664-71. doi: 10.1002/jcp.21808.
- Collins, D., Hogan, A. M. and Winter, D. C.** (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* **12**, 504-12. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70186-8. Epub 2010 Nov 8.
- Cordero, J. B., Stefanatos, R. K., Scopelliti, A., Vidal, M. and Sansom, O. J.** (2012). Inducible progenitor-derived Wingless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *EMBO J* **31**, 3901-17. doi: 10.1038/emboj.2012.248. Epub 2012 Sep 4.
- Cronin, S. J., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J. A., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes Rde, M., Gruber, S., Puc, U. et al.** (2009). Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science* **325**, 340-3. doi: 10.1126/science.1173164. Epub 2009 Jun 11.
- Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jorgensen, K. and Wilks, A.** (2006). Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3435-40.
- Gaspar, P. and Tapon, N.** (2014). Sensing the local environment: actin architecture and Hippo signalling. *Curr Opin Cell Biol* **31**:74-83., 10.1016/j.ceb.2014.09.003. Epub 2014 Sep 25.
- Halder, G. and Johnson, R. L.** (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* **138**, 9-22. doi: 10.1242/dev.045500.
- Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M. J., Blumhagen, R. Z. and Edgar, B. A.** (2011). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **8**, 84-95. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.026. Epub 2010 Dec 16.
- Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G. and Edgar, B. A.** (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* **137**, 1343-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.014.
- Kango-Singh, M. and Singh, A.** (2009). Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Dev Dyn* **238**, 1627-37. doi: 10.1002/dvdy.21996.

**Karpac, J., Biteau, B. and Jasper, H.** (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell Rep* **4**, 1250-61. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.004. Epub 2013 Sep 12.

**Karpowicz, P., Perez, J. and Perrimon, N.** (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* **137**, 4135-45. doi: 10.1242/dev.060483.

**Kim, S. H. and Lee, W. J.** (2014). Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Front Infect Microbiol.* **3**, 116.

**Kux, K. and Pitsouli, C.** (2014). Tissue communication in regenerative inflammatory signaling: lessons from the fly gut. *Front Infect Microbiol.* **4**, 49.

**Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H. and Lee, W. J.** (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell* **153**, 797-811. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.009.

**McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.

**Micchelli, C. A. and Perrimon, N.** (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* **439**, 475-9. Epub 2005 Dec 7.

**Myant, K. B., Scopelliti, A., Haque, S., Vidal, M., Sansom, O. J. and Cordero, J. B.** (2013). Rac1 drives intestinal stem cell proliferation and regeneration. *Cell* **12**, 2973-7. doi: 10.4161/cc.26031. Epub 2013 Aug 12.

**O'Brien, L. E., Soliman, S. S., Li, X. and Bilder, D.** (2011). Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* **147**, 603-14. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.048.

**Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y. T., Su, W. C., Poidevin, M., Tsai, Y. C. and Lemaitre, B.** (2012). Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *J Cell Sci* **125**, 5944-9. doi: 10.1242/jcs.113100. Epub 2012 Oct 4.

**Ota, M. and Sasaki, H.** (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* **135**, 4059-69. doi: 10.1242/dev.027151. Epub 2008 Nov 12.

**Pasco, M. Y., Loudhaief, R. and Gallet, A.** (2015). The cellular homeostasis of the gut: what the *Drosophila* model points out. *Histol Histopathol.* **Vol 30**, pp 277-292.

**Patel, P. H., Dutta, D. and Edgar, B. A.** (2015). Niche appropriation by *Drosophila* intestinal stem cell tumours. *Nat Cell Biol* **17**, 1182-92. doi: 10.1038/ncb3214. Epub 2015 Aug 3.

**Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. and Crickmore, N.** (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends* **18**, 189-94. Epub 2010 Mar 24.

**Ren, F., Shi, Q., Chen, Y., Jiang, A., Ip, Y. T., Jiang, H. and Jiang, J.** (2013). *Drosophila* Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Res* **23**, 1133-46. doi: 10.1038/cr.2013.101. Epub 2013 Jul 30.

**Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E. Y., Ip, Y. T. and Jiang, J.** (2010). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21064-9. doi: 10.1073/pnas.1012759107. Epub 2010 Nov 15.

**Shaw, R. L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B. A. and Tapon, N.** (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* **137**, 4147-58. doi: 10.1242/dev.052506. Epub 2010 Nov 10.

- Staley, B. K. and Irvine, K. D.** (2010). Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr Biol* **20**, 1580-7. doi: 10.1016/j.cub.2010.07.041. Epub 2010 Aug 19.
- Stephan, D., Scholz-Döbelin, H., Kessler, H. and Reintges, T.** (2014). Investigations on residues of *Bacillus thuringiensis* on tomato. *DGaaE-Nachrichten* **28**, 56-56.
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J. and Leulier, F.** (2011). *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab* **14**, 403-14. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.012.
- Sun, G. and Irvine, K. D.** (2014). Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol* **108:95-120.**, 10.1016/B978-0-12-391498-9.00003-6.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J.** (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231-41.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R. and Dutilh, B. E.** (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* **10**, 575-82. doi: 10.1038/nrmicro2819.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., Rossant, J. and Wrana, J. L.** (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell* **19**, 831-44. doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.012.
- Vriz, S., Reiter, S. and Galliot, B.** (2014). Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol* **108**, 121-51.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L. et al.** (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* **21**, 2747-61.
- Zhou, F., Rasmussen, A., Lee, S. and Agaisse, H.** (2013). The UPD3 cytokine couples environmental challenge and intestinal stem cell division through modulation of JAK/STAT signaling in the stem cell microenvironment. *Dev Biol* **373**, 383-93. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.10.023. Epub 2012 Oct 27.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: Low amounts of opportunistic bacteria induces a mild early stress response in the *Drosophila* posterior midgut

(A) Counting of bacteria in guts (n=30) from 1h to 3 days PI. The initial dose provided with the food to flies is  $10^6$  CFU or  $10^8$  CFU of *Btk* and  $10^6$  CFU of *L. plantarum* per fly/cm<sup>2</sup>. (B and C) RT-qPCR on whole midguts 4h PI. Normalized expression of *puc*, *ex*, *Diap1*, *upd1* and *upd3* are shown (n=30). (B) WT flies are fed with sucrose (UC), *Btk*  $10^6$  CFU, *Ecc*  $10^6$  CFU and *Pe*  $10^6$  CFU. (C) Homozygous *hep<sup>1</sup>* females fed with sucrose (UC), *Btk*  $10^6$  CFU, *Ecc*  $10^6$  CFU and *Pe*  $10^6$  CFU.

### Figure 2: Mild-stress induces ISC proliferation and an accumulation of enterocytes

(A) Quantification of *PH3*<sup>+</sup> cells at 4h, 24h, 48h and 72h PI with *Btk*  $10^6$ CFU (red bars) and *Btk*  $10^8$ CFU (grey bars) compared to unchallenged (UC, black bars) guts. (B) Quantification of *PH3*<sup>+</sup> cells 2 day PI of sucrose (UC) or *Btk*  $10^6$ CFU in control midgut (*esg*>*GFP*) or in midgut expressing the dominant negative form of the Upd receptor in progenitor cells (*esg<sup>ts</sup>*>*dome<sup>ACYT</sup>*). (C) Quantification of *esg*<sup>+</sup> cells from day1 to day5 PI with *Btk*  $10^6$ CFU (red curve) and *Btk*  $10^8$ CFU (grey curve) compared to unchallenged flies (UC, black curve). The total number of *esg*<sup>+</sup> cells increases significantly with both  $10^6$ CFU and  $10^8$ CFU compared to unchallenged flies ( $10 < n < 46$ ). (D) Quantification of ECs from day 1 to day 5 PI of *Btk*  $10^6$ CFU (red curve) and *Btk*  $10^8$ CFU (grey curve) compared to UC flies (black curve). There is a significant increase of EC number with  $10^6$ CFU but a decrease with  $10^8$ CFU ( $10 < n < 52$ ). (E-H'') *myo1A*>*GFP*, *esg-lacZ* posterior midguts stained for the  $\beta$ -Gal (red), Pros (blue) and DNA (white) in UC midguts (E-E'') and at days 1 (F-F''), 3 (G-G'') and 5 (H-H'') PI of *Btk*  $10^6$ CFU. Yellow arrows show eEC expressing both the  $\beta$ -Gal and the *myo*>*GFP*

markers. White arrowheads indicate old ECs having bigger nuclei. Scale bar =25µm excepted in E", F", G" and H" =7.8 µm.

### Figure 3: Early absence of cell death is responsible for EC accumulation

(A-C) *myo1A>GFP* posterior midguts stained for Casp3 (red) and Dapi (blue) at day 1 PI. GFP marks the ECs. (A) UC, (B) *Btk* 10<sup>6</sup>CFU and (C) *Btk* 10<sup>8</sup>CFU fed flies. Scale bar =25µm. (D) Scheme of the experimental procedure for the transient expression of the pro-apoptotic gene *grim* in ECs. (E) Quantification of ECs at day 3 PI in UC, *Btk* 10<sup>6</sup>CFU, *Btk* 10<sup>6</sup>CFU overexpressing *grim* and *Btk* 10<sup>8</sup>CFU fed flies. (F-L) Cell lineage in *esg<sup>ts</sup>>GFP >flp*, *act<CD2<lacZ* guts of flies fed with sucrose (UC) (F, I and L), *Btk* 10<sup>6</sup>CFU (G, J and L), *Btk* 10<sup>8</sup>CFU (H, K and L) at day 1 (F-H and L) and day 3 (I-L) PI. Guts are stained for β-Gal (Red) and Dapi (Blue). GFP marks the ISCs and EBs, Scale bar=50µm. (L) Diagram representing the percentage of newborn ECs.

### Figure 4: A late wave of cell death eliminates supernumerary ECs

(A-H) *myo1A>GFP* posterior midguts stained for Casp 3 (red) and Dapi (blue), 2 to 5 days PI of sucrose (UC) (A-D) or *Btk* 10<sup>6</sup>CFU (E-H). (I) EC quantification in the posterior midgut of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU fed flies (blue line) and ratio of apoptosis in UC flies (dark red line) and *Btk* 10<sup>6</sup>CFU fed flies (clear red line) from day1 to day 5 PI. (J and K) *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35* posterior midguts of flies fed with *Btk* 10<sup>6</sup>CFU in which the apoptosis was continuously (from days 2 to 5 PI) (J) or transiently (during day 2 PI) (K) inhibited by p35. Guts are labeled for Casp3 (red) and Dapi (blue). GFP marks the EC. (L) EC quantification 5 days PI in *myo1A<sup>ts</sup>>GFP* and *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35* posterior midguts from flies fed with sucrose (UC) or *Btk* 10<sup>6</sup>CFU. (M) EC quantification 3 days PI in *esg<sup>ts</sup>>GFP>dome<sup>ΔCYT</sup>* (previously transferred at 29°C for 4 days) posterior midguts of flies fed with sucrose (UC) or *Btk* 10<sup>6</sup>CFU. (N)

*esg<sup>ts</sup>>GFP>dome<sup>ΔCYT</sup>* posterior midguts labeled for Casp3 (red) and Dapi (blue) 3 days PI. **(O)** Quantification of *PH3*<sup>+</sup> cells 1 day after the induction (2h at 29°C) of *Ras<sup>85D</sup>* expression in *dl<sup>ts</sup>>Ras<sup>85D</sup>* midguts (grey bars) compared to control midguts (Ctrl - black bars). **(P)** *dl<sup>ts</sup>>Ras<sup>85D</sup>* posterior midguts labeled for Casp3 (red) and Dapi (blue) 3 days post induction of Ras. **(Q-Q'')** *myo1A>GFP, esg-lacZ* posterior midguts of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU fed flies, stained for β-Gal (red), Casp3 (white) and Dapi (blue) at day 3 PI. GFP marks the ECs. eECs are yellow (β-Gal+; GFP+). White arrows point apoptotic ECs (β-Gal-; GFP+). **(R-R'')** *esg<sup>ts</sup>>GFP>flp, act<STOP<lacZ* posterior midguts stained for β-Gal (red), Casp3 (pink) and Dapi (blue) 3days PI of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU. Note that the Casp3 staining never marks the newborn ECs (red nuclei). Scale bar =30μm.

### Figure 5: Hpo is involved in EC apoptosis in response to their excess

**(A)** RT-q PCR at day 3 PI on midguts from flies fed with sucrose (UC) or *Btk* 10<sup>6</sup>CFU, (n=30). **(B)** Scheme of the experimental procedure for the transient expression in the ECs (using the *myo1A<sup>ts</sup>* driver) of *puc* (C), *Diap1* (F), *yki* (G and H), *yki<sup>RNAi</sup>* (I and J), *hpo<sup>RNAi</sup>* (L and M) and the double *hpo<sup>RNAi</sup>, yki<sup>RNAi</sup>* (O and P). **(C)** *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>puc* posterior midgut of flies fed with 10<sup>6</sup>CFU of *Btk* 3 days PI. **(D-E')** *myo1A>GFP, Diap1-lacZ* posterior midguts of flies fed with sucrose (D and D') or 10<sup>6</sup> CFU of *Btk* (E and E') 3 days PI. GFP marks the ECs. Casp3 (red) and β-Gal (blue). **(F-J, L, M, O and P)** *myo1A<sup>ts</sup>>GFP* posterior midguts of flies fed with sucrose (G and I), 10<sup>6</sup>CFU of *Btk* 3 days PI (F, H, J, L and O) or 5 days PI (M and P), **and overexpressing** *Diap1* (F), *yki* (G and H), *yki<sup>RNAi</sup>* (I and J), *hpo<sup>RNAi</sup>* (L and M) and the double *hpo<sup>RNAi</sup>, yki<sup>RNAi</sup>* (O and P). **(K)** Ratio of apoptosis in posterior midguts at 3 days PI in UC flies and 10<sup>6</sup>CFU of *Btk* fed *myo1A>GFP* flies (left) and *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>yki*

<sup>RNAi</sup> flies (right). **(N)** Quantification of ECs at day 5 PI in UC flies and *Btk* fed *myo1A>GFP* flies (left) and *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>hpo<sup>RNAi</sup>* flies (right). Scale bar =30µm.

### **Figure 6: Physiological consequences**

**(A and B)** Posterior midguts of Canton<sup>S</sup> flies stained with Oil Red O at day 2 PI show reduced lipid accumulation in ECs of flies fed with *Btk* 10<sup>6</sup>CFU (n=30). Scale bar =100µm.

**(C and D)** RT-qPCR on midguts from flies fed with sucrose (UC) or 10<sup>6</sup>CFU of *Btk* at day 1 and day 3 PI. **(E)** Measurement of trypsin activity (proportional to FITC intensity) in midguts

from flies fed with sucrose (UC) or with *Btk* 10<sup>6</sup>CFU 2 days PI. There is a reduction of about 42% of trypsin activity. **(F)** Lifespan of Canton<sup>S</sup> flies at 29°C after chronic intoxication with

sucrose (UC, black line) or with *Btk* 10<sup>6</sup>CFU (red line): *Btk* chronic ingestion reduced the lifespan of about 24% (n=100). **(G)** Model of the **physiological control of gut integrity**

**upon ingestion of low amounts of opportunistic bacteria:** the Ingestion of low amounts of opportunistic bacteria along with the food induces a moderate induction of the JNK and JAK/STAT signaling in ECs and ISCs respectively (2). During the first 48h, the mild increase in ISC proliferation generates EBs (3). During days 1 to 3 post ingestion, EB differentiation generates too many ECs, promoting an excess of ECs (4). Hpo signaling activation (Yki off) in old EC leads to their apoptosis, enabling the elimination of the supernumerary EC (5), allowing the gut to recover its cell homeostasis (1).

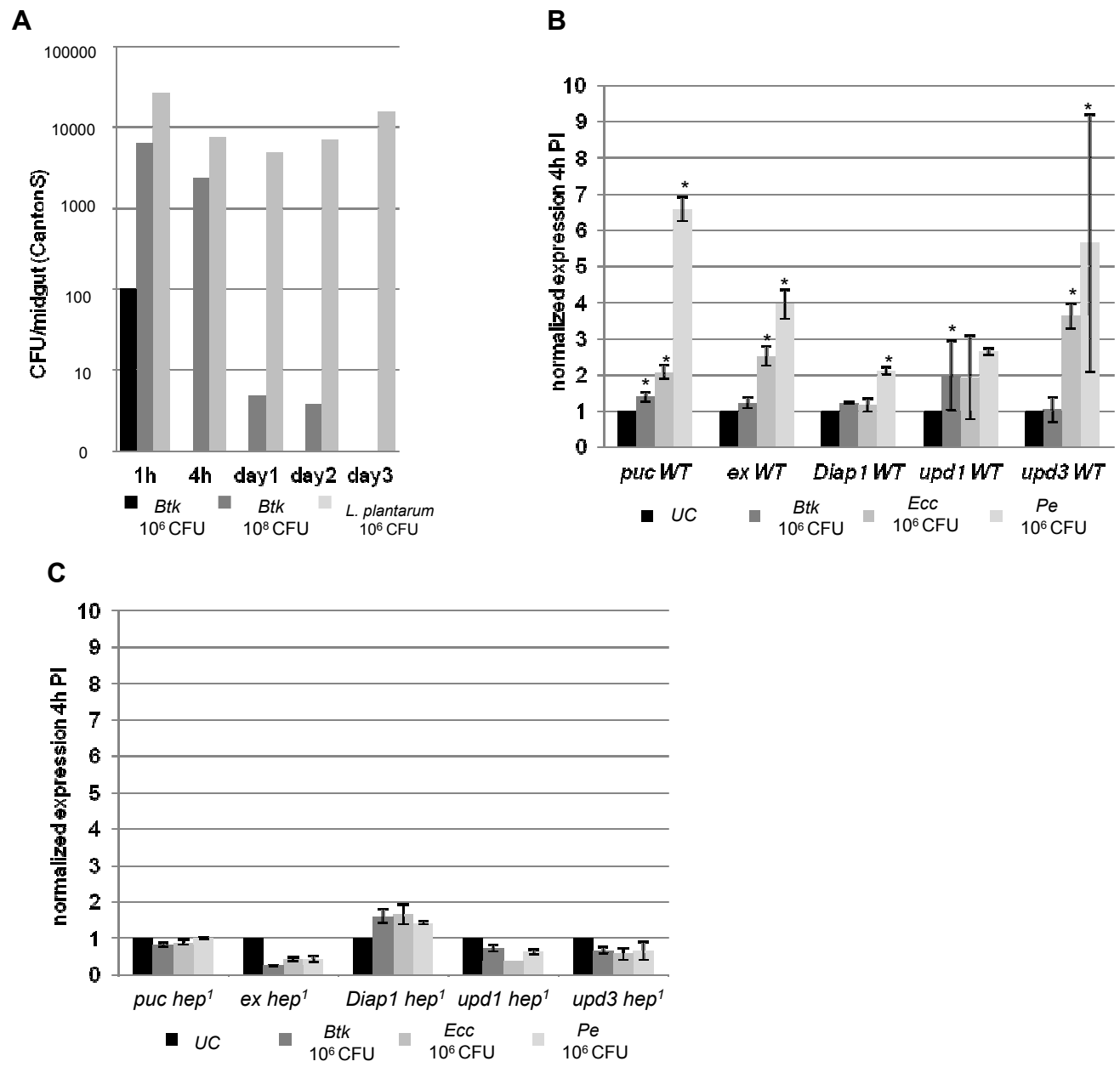


Figure 1



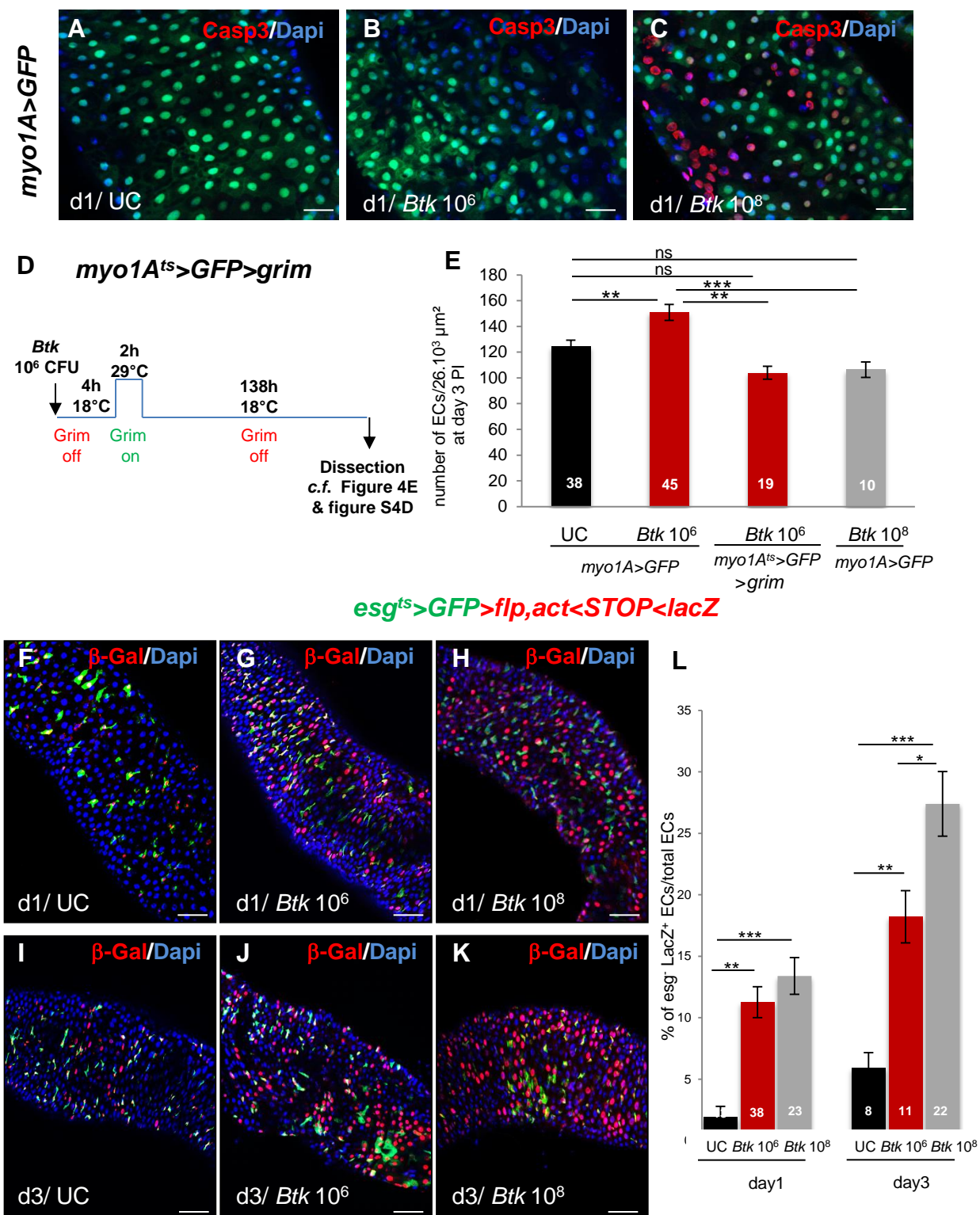
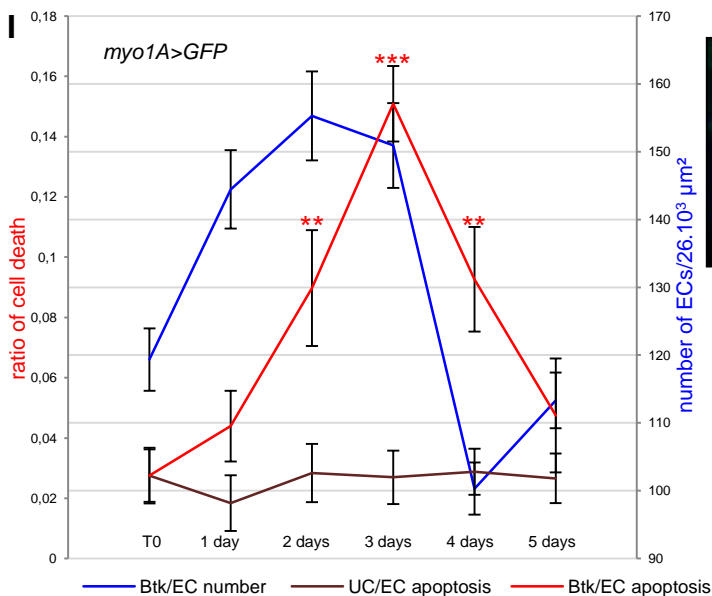
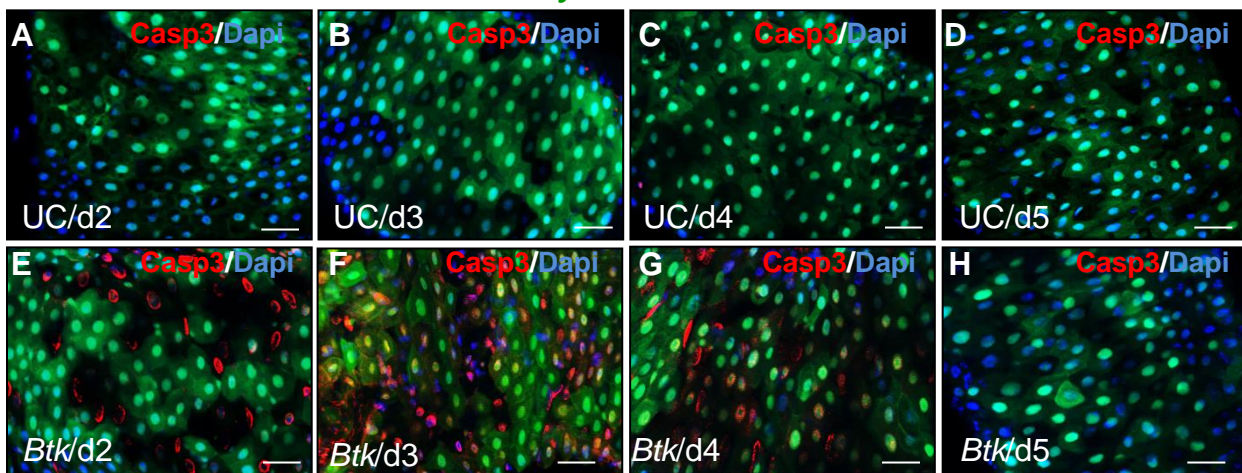
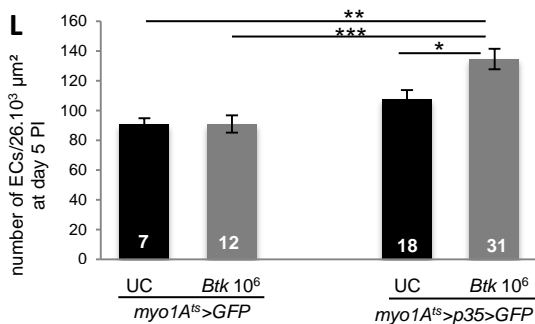
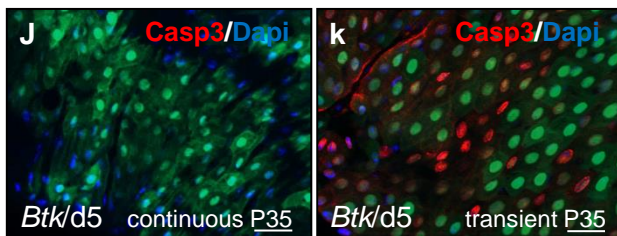


Figure 3

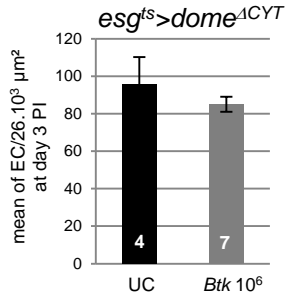
*myo1A>GFP*



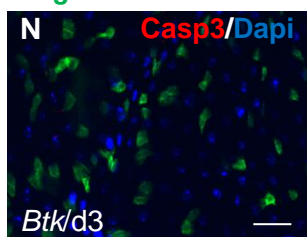
*myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35*



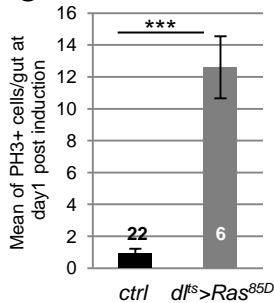
**M** *esg<sup>ts</sup>>dome<sup>ΔCYT</sup>*



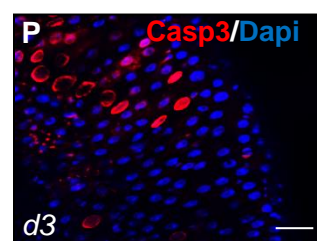
*esg<sup>ts</sup>>GFP>dome<sup>ΔCYT</sup>*



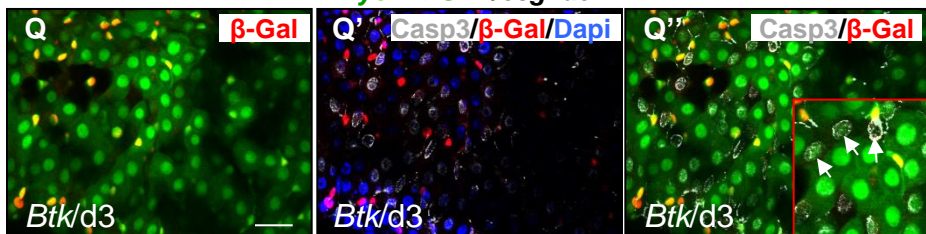
**O** *dl<sup>ts</sup>>Ras<sup>85D</sup>*



*dl<sup>ts</sup>>Ras<sup>85D</sup>*



*myo1A>GFP/esg-lacZ*



*esg<sup>ts</sup>>GFP>flp, act<STOP<lacZ*

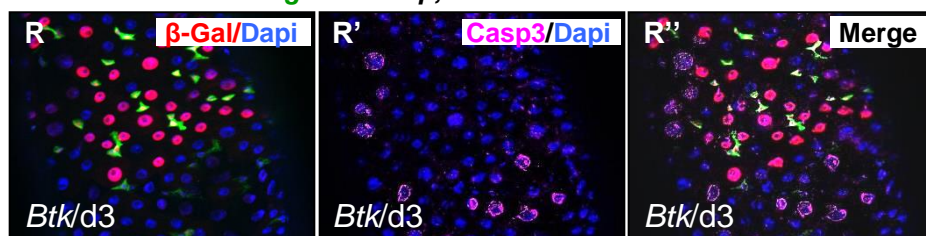


Figure 4

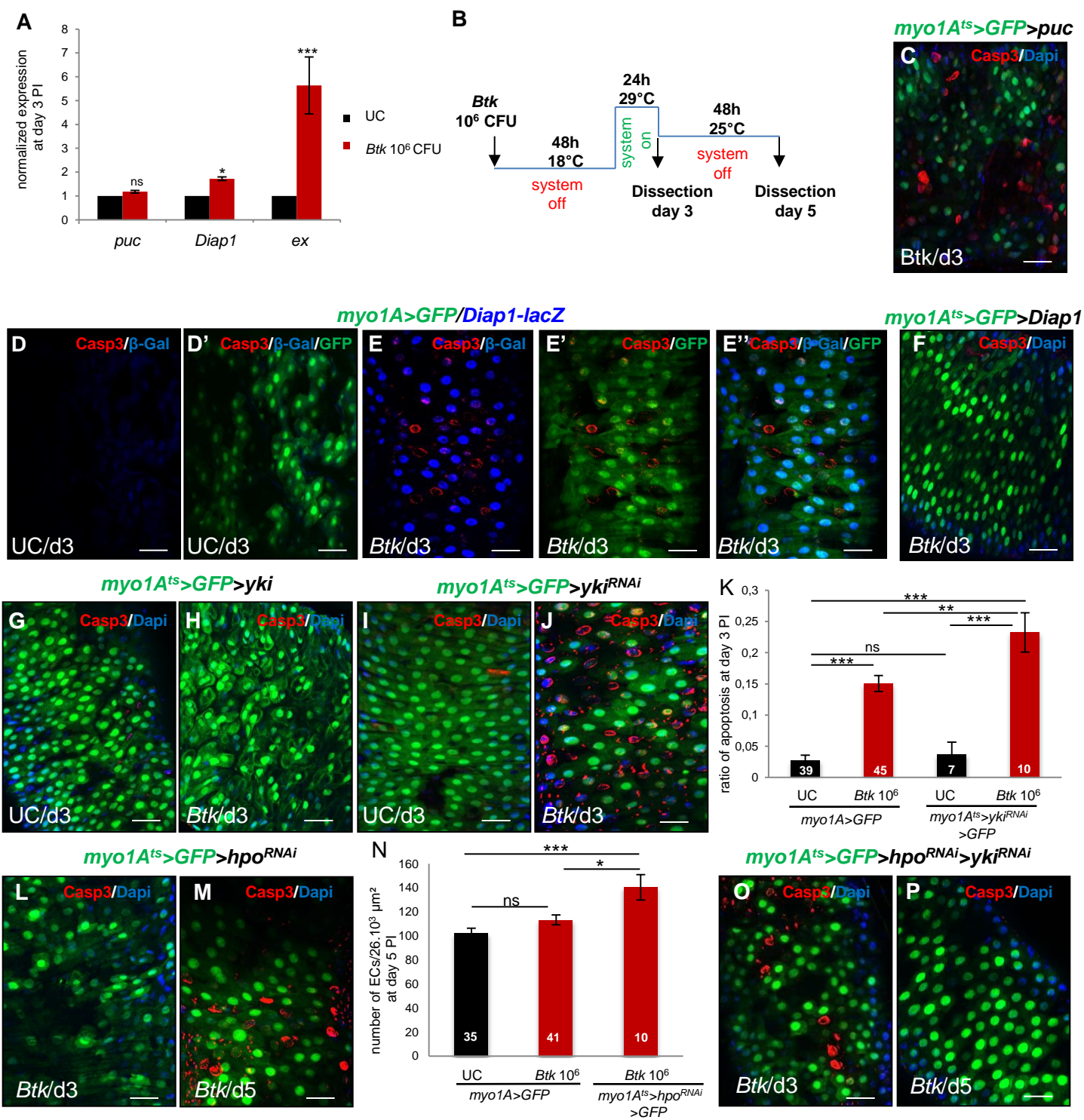


Figure 5

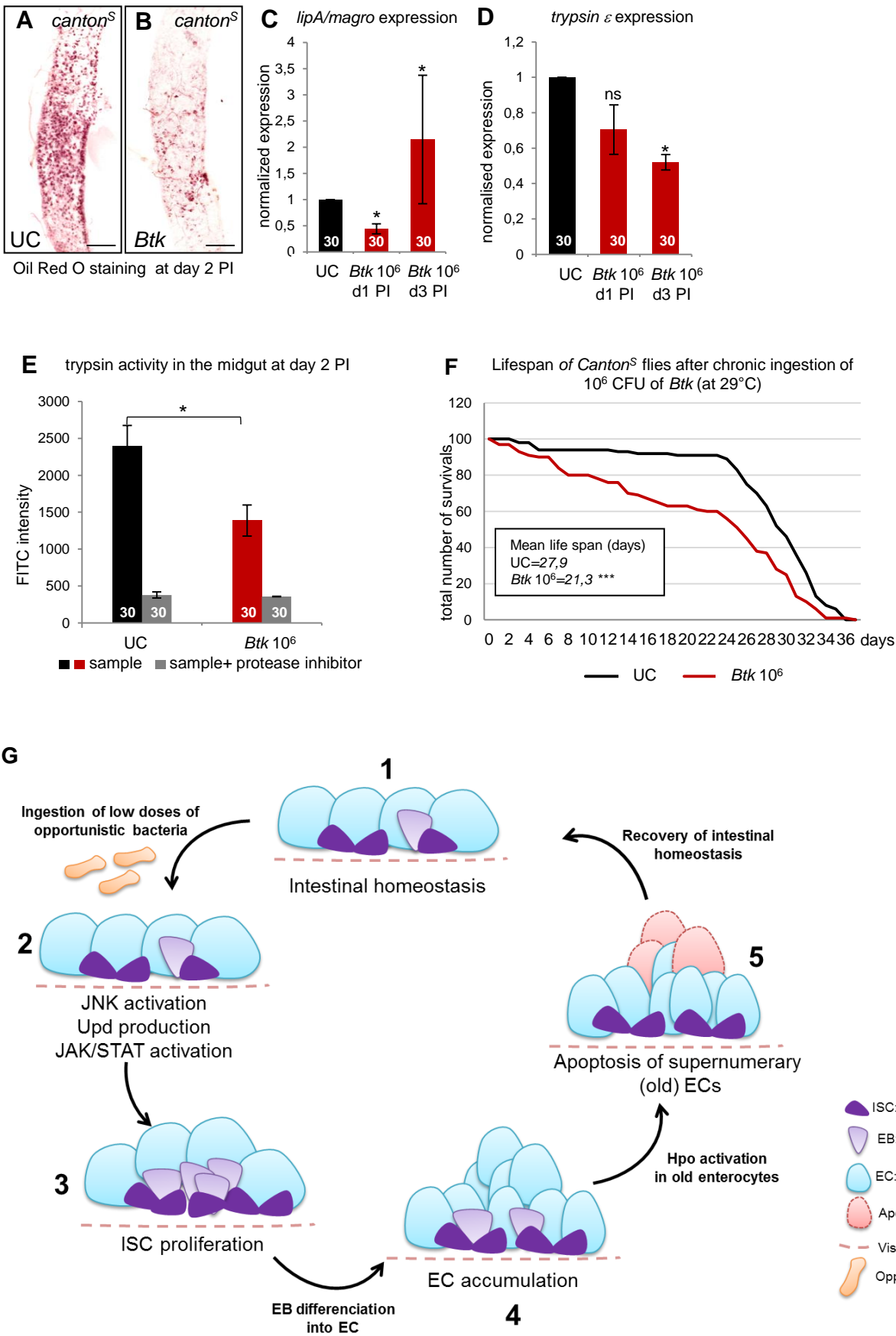


Figure 6

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Fly stocks

- *Canton<sup>S</sup>*
- *w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/CyO* (Y. Apidianakis)
- *y w; esg-Gal4<sup>NP5130</sup> UAS-GFP/CyO* (N. Tapon)
- *y w; esg-lacZ<sup>606</sup>/CyO* (Y. Apidianankis)
- *w; dl-Gal4/TM6b Tb* (S. Hou et X. Zeng)
- *w; myo1A-Gal4; tubGal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/TM6b* (N. Tapon)
- *w; esg-Gal4 UAS-GFP; tubGal80<sup>ts</sup>* (C. Michelli and Y. Apidianakis)
- *w; act<STOP<lacZ; UAS-flp#5/(TM6b)* (C. Micchelli)
- *y w UAS-flp;; act5c<CD2<lacZ/TM6b* (Y. Apidianakis)
- *w;; puc-LacZ/TM3Sb* (J. Colombani)
- *dlg::GFP cc01936* (FlyTrap) (A. Spradling)
- *w;; Diap1-lacZ/TM6B* (J. Colombani)
- *w; ex-lacZ/Cyo* (N. Tapon & J. Colombani)
- *w; ; UAS-Grim* (T. Ip)
- *w; ; UAS-p35* (T. Ip)
- *w; ; UAS-dome<sup>ΔCYT 3-2</sup>/TM3 Sb* (C. Ghiglione)
- *yw hs-flp; UAS-hpo<sup>RNAi</sup>* (VDRC 104169, KK)
- *yv;; UAS-sav<sup>RNAi</sup>* (Bloomington 32965)
- *y v;; UAS-yki<sup>RNAi</sup> (y<sup>+</sup>)/TM3 Sb TRIP* (Bloomington 36965)
- *hs-flp122; UAS-yki::HA/SM6-TM6* (N. Tapon)
- *w; UAS-puc<sup>2A</sup>* (R. Rousset)
- *w, UAS-Diap1<sup>myc</sup>* (T. Adachi-Yamada)
- *y w hs-flp; tub-Gal80<sup>ts</sup>/CyO; Dl-Gal4 UAS-GFP/TM6c* (home made)
- *w; act<CD2<Gal4; UAS-GFP* (V. Van de Bor)
- *yv/yw hs flp; UAS-hpo<sup>RNAi</sup>/CyO; UAS-yki<sup>RNAi</sup>/TM6B or C* (home made)
- *y w hep<sup>I</sup>/FM7<sup>wa</sup>* (R. Rousset)
- *yw; UAS-Ras<sup>85D.V12</sup>* (Bloomington 4847)

More informations on Drosophila genes and stocks are available on FlyBase (<http://flybase.org/>).

### Genotypes of used F1 flies:

- Fig. 2B and Fig. S2C and D: *w/w; esg-Gal4 UAS-GFP/+; tubGal80<sup>t</sup>/UAS-dome<sup>ACYT 3-2</sup>*
- Fig. 2E-H' and Fig. S2 F-H' Fig.: *w/w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/esg-lacZ<sup>606</sup>*
- Fig. 3E (column *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>grim*) and Fig. S4C and D: *w/w; myo1A-Gal4/+; tub Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/UAS-Grim*
- Fig. 3F-L and Fig. S4F-H'.: *w UAS-flp/w; esg-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80<sup>ts</sup>/act5c<CD2<lacZ* or *w/w; esg-Gal4 UAS-GFP/act5c<CD2<lacZ; tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-flp*
- Fig. 4J-L and Fig. S5A and B: *w/w; myo1A-Gal4/+; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/UAS-p35*
- Fig. 4M and N: *w/w; esg-Gal4 UAS-GFP/+; tubGal80<sup>t</sup>/UAS-dome<sup>ACYT 3-2</sup>*
- Fig. 4O and P: *w/w; tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-Ras<sup>85D.V12</sup>; dl-Gal4 UAS-GFP/+*
- Fig. 4Q-Q": *w/w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/esg-lacZ<sup>606</sup>*
- Fig. 4R and R": *w UAS-flp/w; esg-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80<sup>ts</sup>/act5c<CD2<lacZ* or *w/w; esg-Gal4 UAS-GFP/act5c<CD2<lacZ; tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-flp*
- Fig. 5C: *w/w; myo1A-Gal4/UAS-puc<sup>2A</sup>; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/+*
- Fig. 5D- E": *w/w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/+; Diap1-lacZ/+*
- Fig. S6 D-E": *w/w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/ex-lacZ*
- Fig. 5F: *w UAS-Diap1<sup>myc</sup> /w; myo1A-Gal4/+; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/+*
- Fig. 5G and H: *w/w ; myo1A-Gal4/UAS-yki::HA; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS GFP/+*
- Fig. 5I-K: *w/w; myo1A-Gal4/+; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/UAS-yki<sup>RNAi</sup>*
- Fig. 5L-N and Fig. S6F: *w/w; myo1A-Gal4/UAS-hpo<sup>RNAi</sup>; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/+*
- Fig. S6G-G": *y w hs-flp/w; act<CD2<Gal4/UAS-hpo<sup>RNAi</sup>; UAS-GFP/+*
- Fig. S6H and I: *w/w; myo1A-Gal4/+; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP/UAS-sav<sup>RNAi</sup>*
- Fig. 5O and P: *w/w; myo1A-Gal4/ UAS-hpo<sup>RNAi</sup>; tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS GFP/UAS-yki<sup>RNAi</sup>*

### Bacterial strains

The *Btk* strain (identified under the code 4D22) was provided by the Bacillus Genetic Stock Center ([www.bgsc.org](http://www.bgsc.org)) and described in González et al., (1982) (Gonzalez et al., 1982). *Ecc* and *Pe* were kindly provided by Bruno Lemaitre's lab. *L. plantarum* was kindly provided by Bernard Charroux. *Pe*, *Btk* and *Ecc* were grown in LB medium at 30°C for 16h and *L. plantarum* was grown in MRS medium for 16h in anaerobic conditions at 37°C.

### Bacteria counting

Flies were fed with *Btk* and *L. plantarum*, washed with ethanol and distilled water before dissection of the guts in PBS. Guts were crushed in 200 µl of LB or MRS medium at various

times after intoxication using a micropestle, and the homogenate was serially diluted in LB or MRS medium and incubated o/n at 30°C (*Btk*) or 37°C (*L. plantarum*).

### **Drosophila rearing & intoxication**

*Drosophila* was reared on standard medium at 25°C otherwise mentioned. For oral intoxication, after 2 h of starvation, 3 to 5 days old flies (at 25°C) were flipped onto fly medium covered with filter disks soaked in a 1:1 mix of bacterial pellets and 5% sucrose (used concentrations of bacteria: 1.10<sup>6</sup> CFU/cm<sup>2</sup>/fly or 1.10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>2</sup>/fly). Flies were kept to feed on the contaminated media until dissection in all the experiments.

### **Dissection, Immunostaining and microscopy**

Dissection, fixation and immunostaining were performed as described by (Micchelli, 2014). Dilutions of the various antibodies were: mouse anti-Prospero at 1:200 (DSHB), mouse anti-β-Gal at 1:500 (Promega), rabbit anti-β-Gal at 1:1000 (Cappel), rabbit anti-PH3 at 1:1000 (Millipore), rabbit anti-Casp3 at 1:300 (Cell Signalling), mouse anti-Arm at 1:100 (DSHB), Cy3 anti-mouse at 1:1000 (Jackson Immunoresearch), Cy3 anti-rabbit at 1:1000 (Jackson Immunoresearch), Cy5 anti-rabbit at 1:300 (Jackson Immunoresearch) and Alexa<sup>647</sup> anti-mouse at 1:500 (Invitrogen), Phalloidin-Alexa<sup>555</sup> at 1:1000 (Molecular Probes). For microscopy, guts were mounted in Fluoroshield-DAPI medium (Sigma) and immediately observed on a Zeiss Axioplan Z1 with Apotome 2 microscope. Images were analyzed using ZEN (Zeiss), Image J and Photoshop softwares. Image acquisition was performed on the Microscopy Platform of the Institut Sophia Agrobiotech - INRA 1355-UNS-CNRS 7254-Sophia Antipolis.

### **RT-qPCR**

Total RNA was extracted from 10 midguts with Trizol reagent (Invitrogen) and dissolved in 20 μL of RNase-free water. cDNA was then synthesized from 550 ng total RNA and qPCR was carried out using an AriaMX real-Time PCR System (Agilent) and the EvaGreen kit (Euromedex). Each experiment was independently repeated three times. Moreover we performed three technical repeats. Relative expression data were normalized to *Rp49* and *Dp1* genes.

## RT-qPCR Primers

<i>dp1</i>	Forward	ACG-GGC-AGA-ATT-GAG-AAG-TG
	Reverse	GGT-ACG-ATG-GAG-GTC-GAA-AG
<i>rp49</i>	Forward	CGC-ACC-AAG-CAC-TTC-ATC
	Reverse	CAC-TCT-GTT-GTC-GAT-ACC-CTT-G
<i>puc</i>	Forward	GCCACATCAGAACATCAAGC
	Reverse	CCGTTTTCCGTGCATCTT
<i>upd1</i>	Forward	CCT-ACT-CGT-CCT-GCT-CCT-TG
	Reverse	GCC-GTA-CTG-GAG-GTG-GTG
<i>upd3</i>	Forward	ACC-ACC-AAT-GCG-GAC-AAG
	Reverse	ATT-CAG-ACG-GGG-CAG-GAA
<i>Diap1</i>	Forward	GAA-CGC-GAC-CCA-GCT-ATT-C
	Reverse	CGT-TTA-TCC-AGC-CAG-TCC-A
<i>expanded</i>	Forward	TGG-TCT-TCC-TTG-CTG-GAC-TT
	Reverse	AGA-TGC-CGA-TGT-CTC-CTC-TC
<i>trypsin <math>\epsilon</math></i>	Forward	CGT-ATC-GTC-GGT-GGT-TAT-GAG
	Reverse	CAA-TGT-CGT-GGG-AGT-AGA-TGG
<i>lipase A</i>	Forward	CAG-ATA-CAC-TAC-GCC-GGA-CA
	Reverse	TCG-AAG-AAG-GCA-CAT-GGA-G

## Measurement, counting and Statistical analysis

In all the data presented, the pictures and counting were always done in the posterior part of the R4 region ([http://flygut.epfl.ch/histo\\_regions/9](http://flygut.epfl.ch/histo_regions/9)) named R4bc in the flygut site (see also Buchon et al., (2013) and Marianes and Spradling, (2013)). Experiments were independently repeated at least three times. Cells were counted in a fixed area ( $26.10^3 \mu\text{m}^2$ ) within the R4bc region. The numbers within the bars of all the graphs correspond to the number of gut analyzed. Results are presented as means  $\pm$  SEM. Effects of treatments were analyzed using Pair Wise Comparison test (Tukey test). Differences were considered significant when p values  $<0.05$ . \*( $P \leq 0.05$ ), \*\* ( $P \leq 0.01$ ), \*\*\* ( $P \leq 0.001$ ).

## Frozen sections

Posterior midguts were incubated with antibodies as described above, frozen in OCT medium and cut with a Leica M3050-S Microtome into  $10\mu\text{m}$  frozen sections to obtain transversal sections of posterior midguts. Sections were then mounted in Fluoroshield-DAPI medium before observation.

## Flip-Out clones

(Fig.S6G-G")

For flip-out clones *y w hs-flp; UAS-hpo<sup>RNAi</sup>* females were crossed with *w; act<CD2<Gal4; UAS-GFP* males at 18 °C. Progeny was transferred to bacteria supplemented media at 18°C for 48 h, then heat-shocked for 45 min at 37°C before to be transferred to 25°C and dissected after 24h.

## Cell lineage

*w; esg-Gal4 UAS-GFP; tubGal80<sup>ts</sup>* females were crossed with *w; act<STOP<lacZ; UAS-flp* males at 18 °C. Progeny were kept 6-8 days at 18°C. Then, the progeny were transferred to sucrose (Fig. 3F and I and Fig. S4F-H') or bacteria supplemented media (Fig. 3G, H, J, K and L) at 29 °C for 1 day, 3 days and 12 days.

## Oil Red O lipid staining

The protocol was adapted from (Karpac et al., 2013) with minor changes: guts were fixed for 40 min and incubation time with Oil Red O solution was 45 min.

## Protease activity

8 intestines were crushed in 50µl PBS, spun for 5 min at 4°C. The supernatant was kept and diluted at 1/10. Then protease activity was measured using Protease Fluorescent Detection Kit (Sigma): 5, 10 and 20 µl of diluted samples were added to 10µl of 10X PBS, 20 µl of FITC-Casein and 70µl of distilled water (control experiment was performed with trypsin at 10 mg/ml in 1mM HCl). The tubes were gently mixed and incubated at 37°C for 90 min, then 300µl of 10% TCA were added. Mixes were incubated at 37°C for 30 min, then spun for 10 min at 13000rpm at 4°C. 50µl of the resulting supernatant was added to 150 µl of Buffer. The fluorescence of the sample was measured at 535 nm.

## REFERENCES

- Lemaitre, B.** (2013). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* **3**, 1725-38. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.001. Epub 2013 May 2.
- Gonzalez, J. M., Jr., Brown, B. J. and Carlton, B. C.** (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6951-5.

**Karpac, J., Biteau, B. and Jasper, H.** (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell Rep* **4**, 1250-61. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.004. Epub 2013 Sep 12.

**Marianes, A. and Spradling, A. C.** (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife* **2:e00886.**, 10.7554/eLife.00886.

**Micchelli, C. A.** (2014). Whole-mount immunostaining of the adult *Drosophila* gastrointestinal tract. *Methods* **68**, 273-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.03.022. Epub 2014 Mar 27.

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

### **Fig. S1: Low amounts of opportunistic bacteria induces a mild early stress response in the *Drosophila* posterior midgut**

(A-J) *puc-lacZ* posterior midguts stained for  $\beta$ -Gal (red) and DNA (blue) 4h PI of sucrose (A), *Btk*  $10^6$  CFU (B), *Btk*  $10^8$  CFU (C), *Ecc* $10^6$  CFU (D) and *Ecc*  $10^8$  CFU (E), or 1 day PI of sucrose (F), *Btk*  $10^6$  CFU (G), *Btk*  $10^8$  CFU (H), *Ecc* $10^6$  CFU (I) and *Ecc*  $10^8$  CFU (J). Scale bar =25 $\mu$ m. (K) RT-qPCR on posterior midguts 4h PI of WT flies fed with sucrose (UC), *Btk*  $10^6$  CFU, *Btk*  $10^8$  CFU, *Ecc* $10^6$  CFU, *Ecc* $10^8$  CFU and *Pe*  $10^6$  CFU showing normalized expression of *puc*, *ex*, *Diap1*, *upd1* and *upd3* (n=30).

### **Fig. S2: Mild-stress induces ISC proliferation and an accumulation of enterocytes**

(A-B) *esg>GFP* posterior midguts 2 days PI of sucrose (A) and *Btk*  $10^6$ CFU (B) labeled for the PH3 (red, arrows) and Dapi (blue). (C-D) *esg<sup>ts</sup>>dome<sup>ACYT</sup>* posterior midguts 2 days PI of sucrose (C) and *Btk*  $10^6$ CFU (D) labeled for the PH3 (red) and DAPI (blue). (E) Quantification of entero-endocrine cells (Pros+) at day 1, day 3 and day 5 PI of *Btk*  $10^6$  CFU. (F-H') *myo1A>GFP*, *esg-lacZ* posterior midguts stained for  $\beta$ -Gal (red), Pros (blue) and Dapi (white) at days 1, 3 and 5 PI of *Ecc*  $10^6$  CFU. (I) Quantification of *esg+* cells in the posterior midguts of *esg>GFP* flies at days 1, 3 and 5 PI of sucrose (UC) or *Ecc*  $10^6$ CFU. (J) Quantification with ECs in the posterior midguts of *myo1A>GFP* flies at days 1, 3 and 5 PI of sucrose (UC) or *Ecc*  $10^6$ CFU. Scale bar =25 $\mu$ m.

### **Fig. S3: Structural consequences of EC accumulation**

(A-E'') Cryogenic cross-section of *dlg::GFP* posterior midguts. (A-A'') UC, (B-C'') *Btk*  $10^6$  CFU fed flies 1day (B-B'') and 3 days (C-C'') PI. (D-E'') *Ecc*  $10^6$ CFU fed flies 1day (D-D'') and 3 days (E-E'') PI. Guts are labeled with Phalloidin (red, apical pole and visceral mesoderm marker), Dapi (white), Arm (blue, basolateral marker) and *Dlg::GFP* (green, sub-apical marker). White arrows point the progenitor cells, yellow arrows point the eEC and green arrows point the old EC, scale bar=7,14 $\mu$ m.

In control posterior midguts, the big polyploid EC nuclei were well aligned with the smaller diploid progenitor cell (ISC and EB) nuclei located basally (A). At day 1 PI of *Btk* or *Ecc*, ECs became thinner, rounder, more elongated and with an extended apical pole (B-B'' and D-D''). At day 3 PI the alignment of nuclei was perturbed (C-C'' and E-E'') and we often observed three rows of nuclei: an apical row of very large polyploid EC nuclei (green arrows

in C and E), a second row of smaller polyploid nuclei corresponding to eECs (yellow arrows in C and E) and a third basal row of progenitor cells with small diploid nuclei.

**Fig. S4: Early absence of cell death is responsible for EC accumulation**

(A-B) *myo1A>GFP* posterior midguts stained for Casp 3 (red) and Dapi (blue) at day 1 PI of *Ecc* 10<sup>6</sup>CFU (A) and *Ecc* 10<sup>8</sup>CFU (B). Scale bar =25µm. (C-D) *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>grim* posterior midguts stained for Casp 3 (red) and Dapi (blue) at day 1 and day 3 PI of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU (see Figure 4D for the steps of the experiment), scale bar =25µm. (E) Ratio of apoptotic ECs at day 1 PI of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU and *Btk* 10<sup>8</sup>CFU. (F-H') Cell lineage in *esg<sup>ts</sup>>GFP>FLP, act<CD2<lacZ* guts of flies fed with sucrose (UC) at day 1 (F and F'), day 3 (G and G') and day 12 (H and H') at 29°C. Guts are stained for β-Gal (Red) and Dapi (Blue). Scale bar =100µm in F, G and H and =50µm in F', G' and H'.

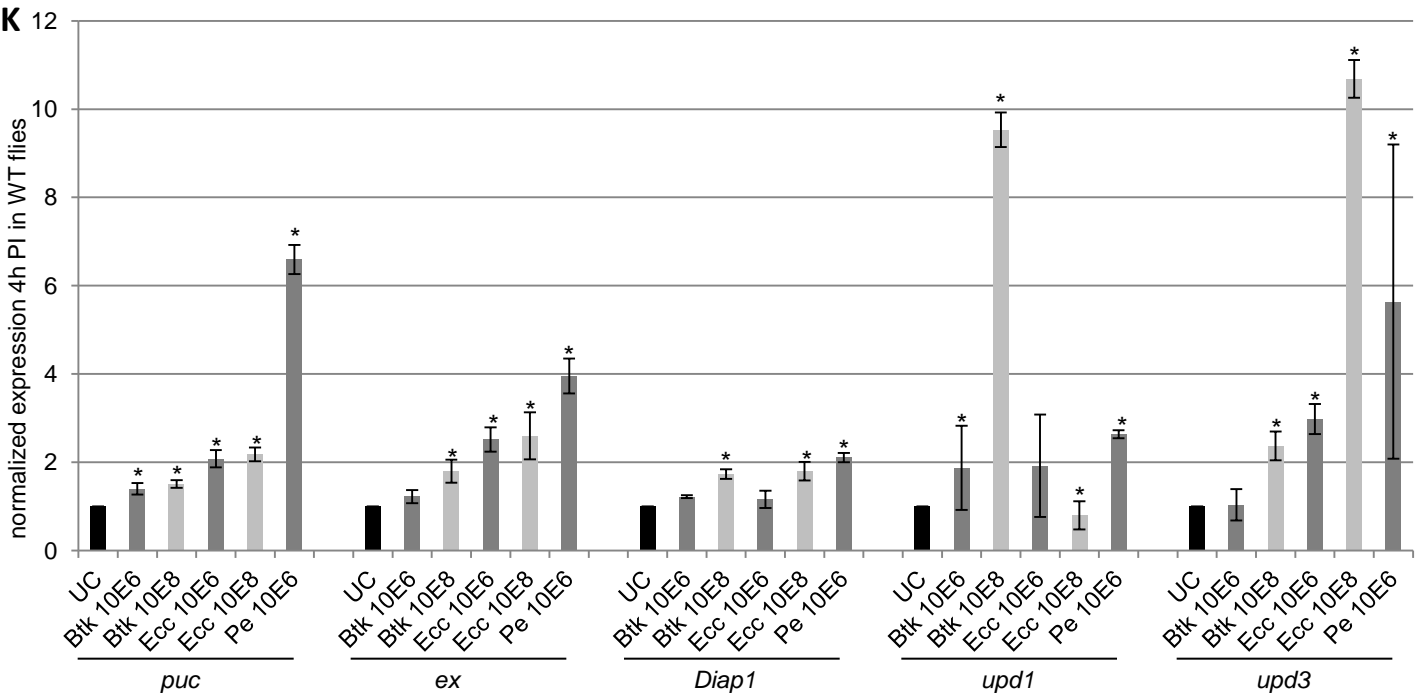
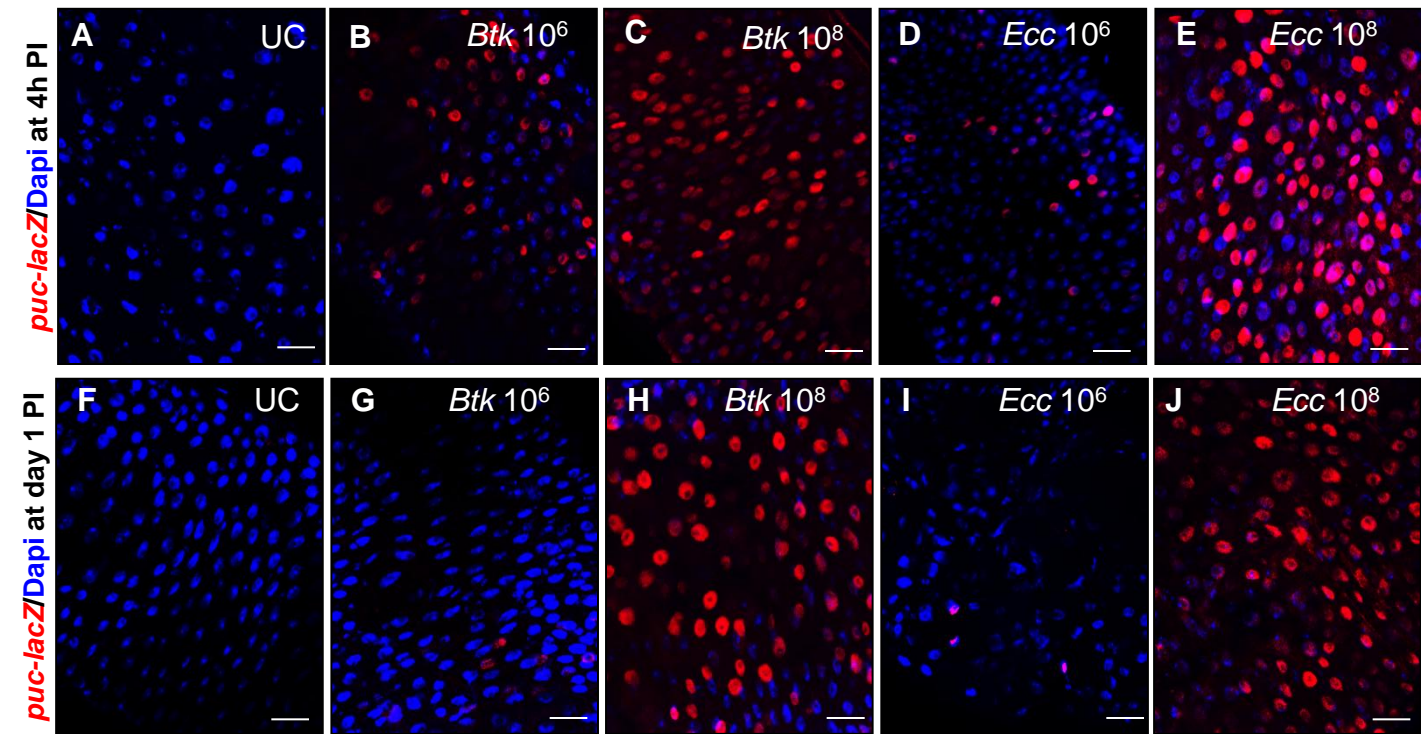
**Fig. S5: A late wave of cell death eliminates supernumerary ECs**

(A) Cryogenic cross-section of *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35* posterior midguts 5 days PI of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU. Guts were labeled with Phalloidin (red). GFP marks the ECs. (B) *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35* posterior midguts stained for Casp3 (red) and Dapi (blue) at day 3 PI of *Btk* 10<sup>6</sup>CFU. Apoptosis were transiently inhibited by p35 according to the protocol described in the main figure 6B. Scale bar =25µm.

**Fig.S6: Hpo is involved in EC apoptosis in response to their excess**

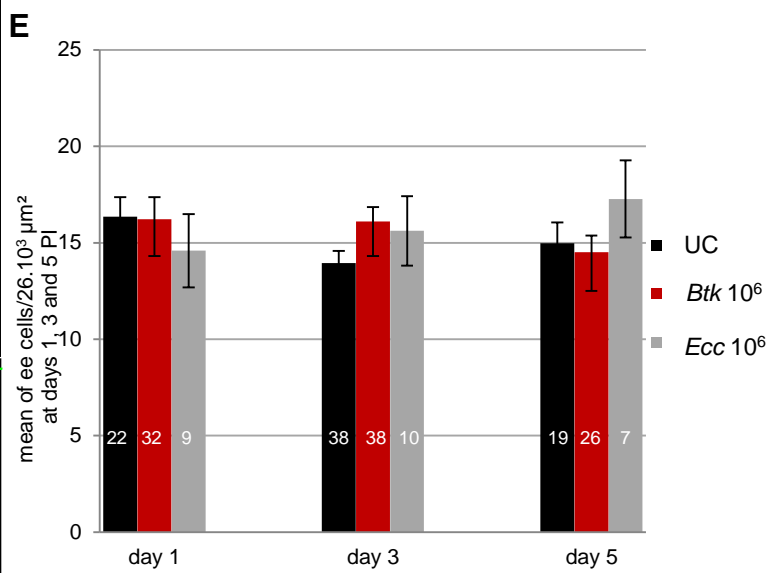
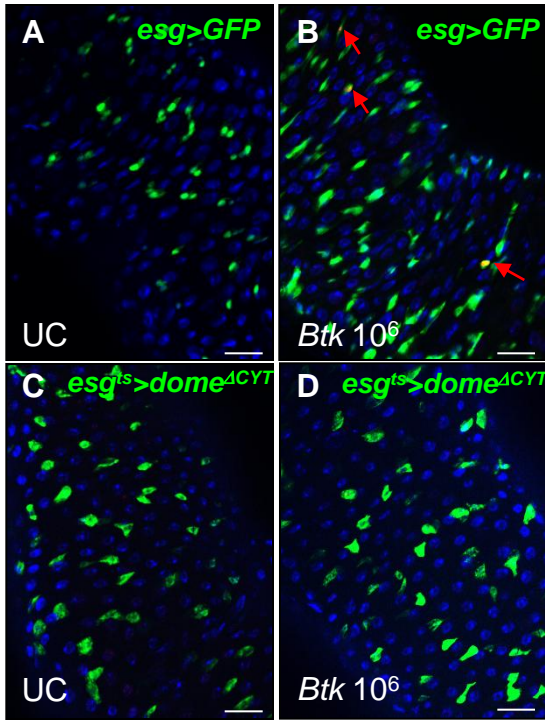
(A) *puc-lacZ* posterior midguts stained for β-Gal (red) and Dapi (blue) 3 days PI of *Btk* 10<sup>6</sup> CFU. Scale bar =25µm. (B-C) *ex-lacZ* posterior midguts of flies fed with sucrose (UC) or *Btk* 10<sup>6</sup> CFU 3 days PI. Guts are labeled for β-Gal (pink) and Dapi (blue). Scale bar =12,5µm. (D-E'') *myo1A>GFP; ex-lacZ* midguts stained for β-Gal (blue) and Casp3 (red) 3 days PI of sucrose (UC), *Btk* 10<sup>6</sup> CFU. (F) *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>hpo<sup>RNAi</sup>* posterior midguts. After continuous induction *hpo<sup>RNAi</sup>*, posterior midguts were stained for Casp3 (red) and Dapi (blue) at day 5 PI of *Btk* 10<sup>6</sup> CFU. (G-G'') *hs-flp, act<STOP<Gal4, UAS-GFP, UAS-hpo<sup>RNAi</sup>* posterior midguts stained for Casp3 (red) and Dapi (blue) 3 days PI of *Btk* 10<sup>6</sup> CFU. No overlaps between *hpo<sup>RNAi</sup>* cells (GFP+) and Casp 3 staining (red) are observed. DNA is marked with Dapi (blue). (H and I) *myo1A<sup>ts</sup>>GFP>sav<sup>RNAi</sup>* posterior midguts at day 3 (H) and day 5 (I) PI of *Btk* 10<sup>6</sup> CFU. Guts are labeled for Casp3 (red) and Dapi (blue). (D-I) scale bar=25µm.

## **SUPPLEMENTAL FIGURES**

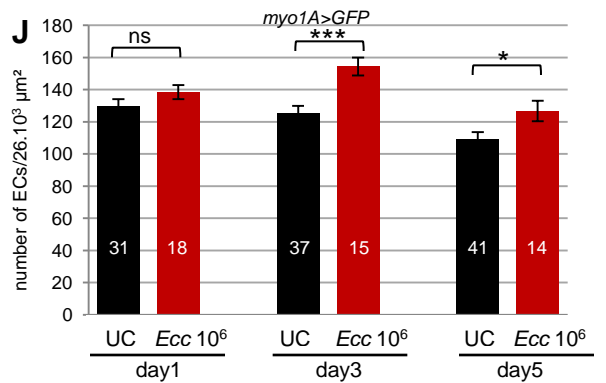
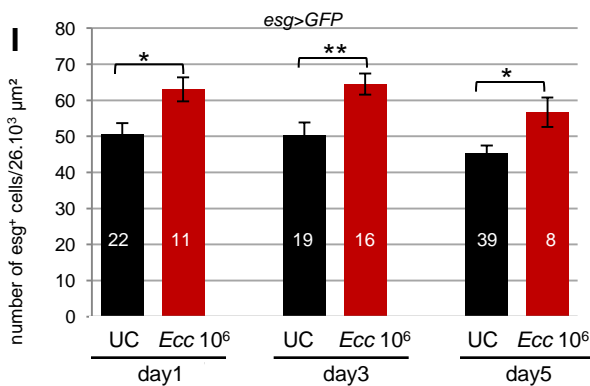
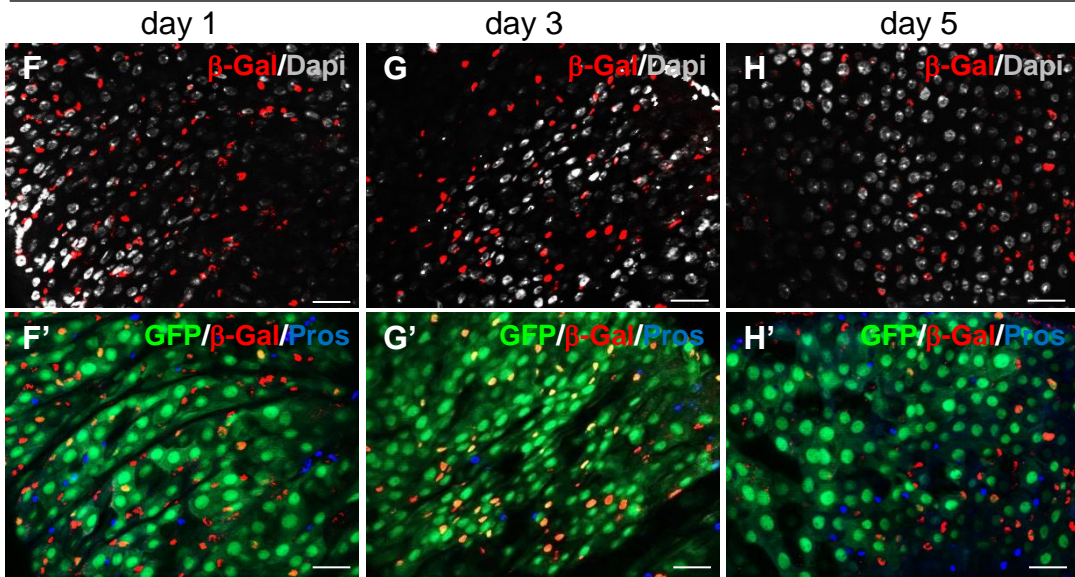


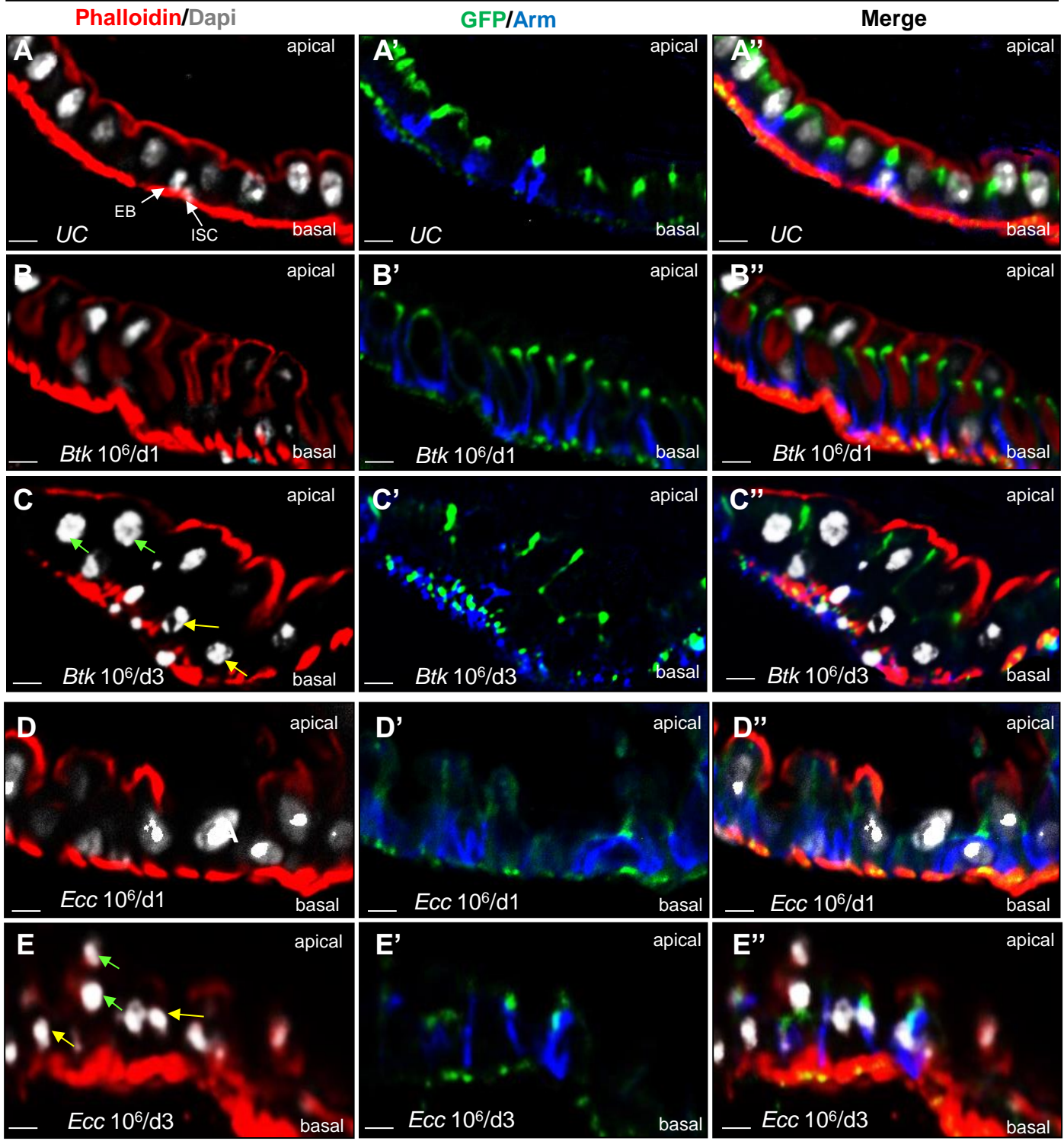
Supplemental figure 1

PH3/Dapi at day 2 PI

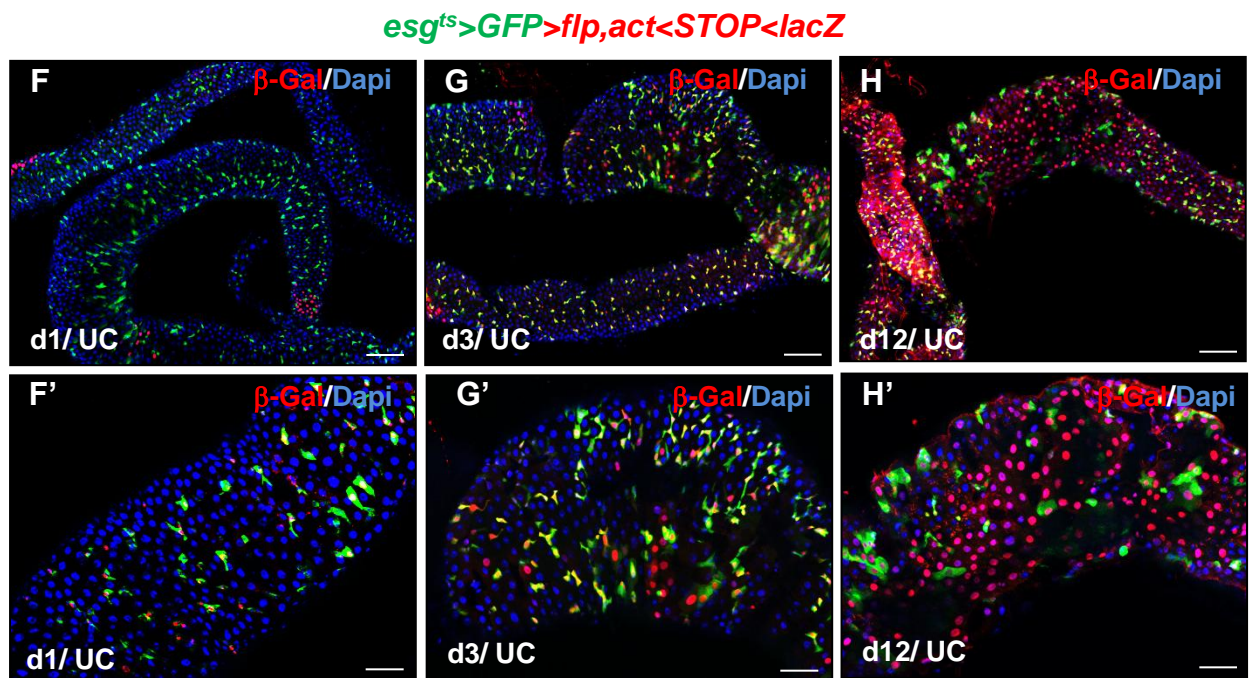
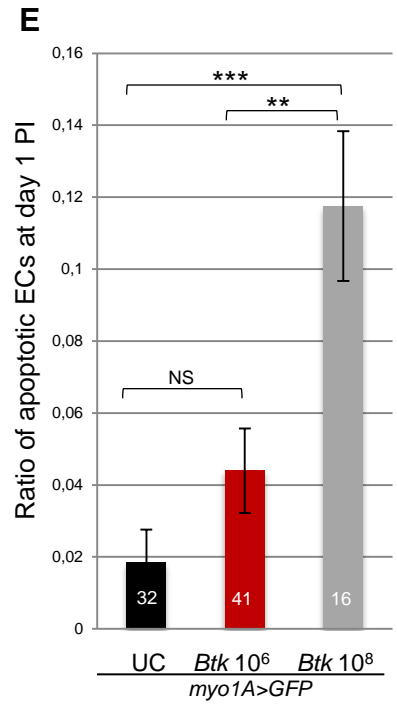
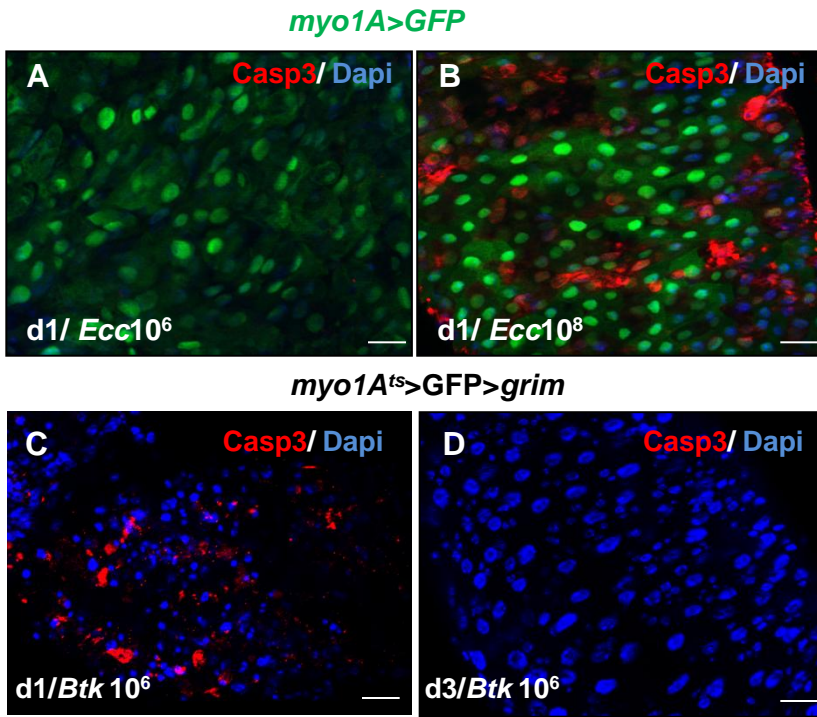


myo1A>GFP/esg-lacZ - Ecc 10<sup>6</sup> CFU



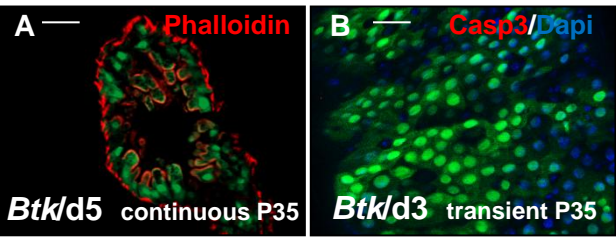


Supplemental figure 3

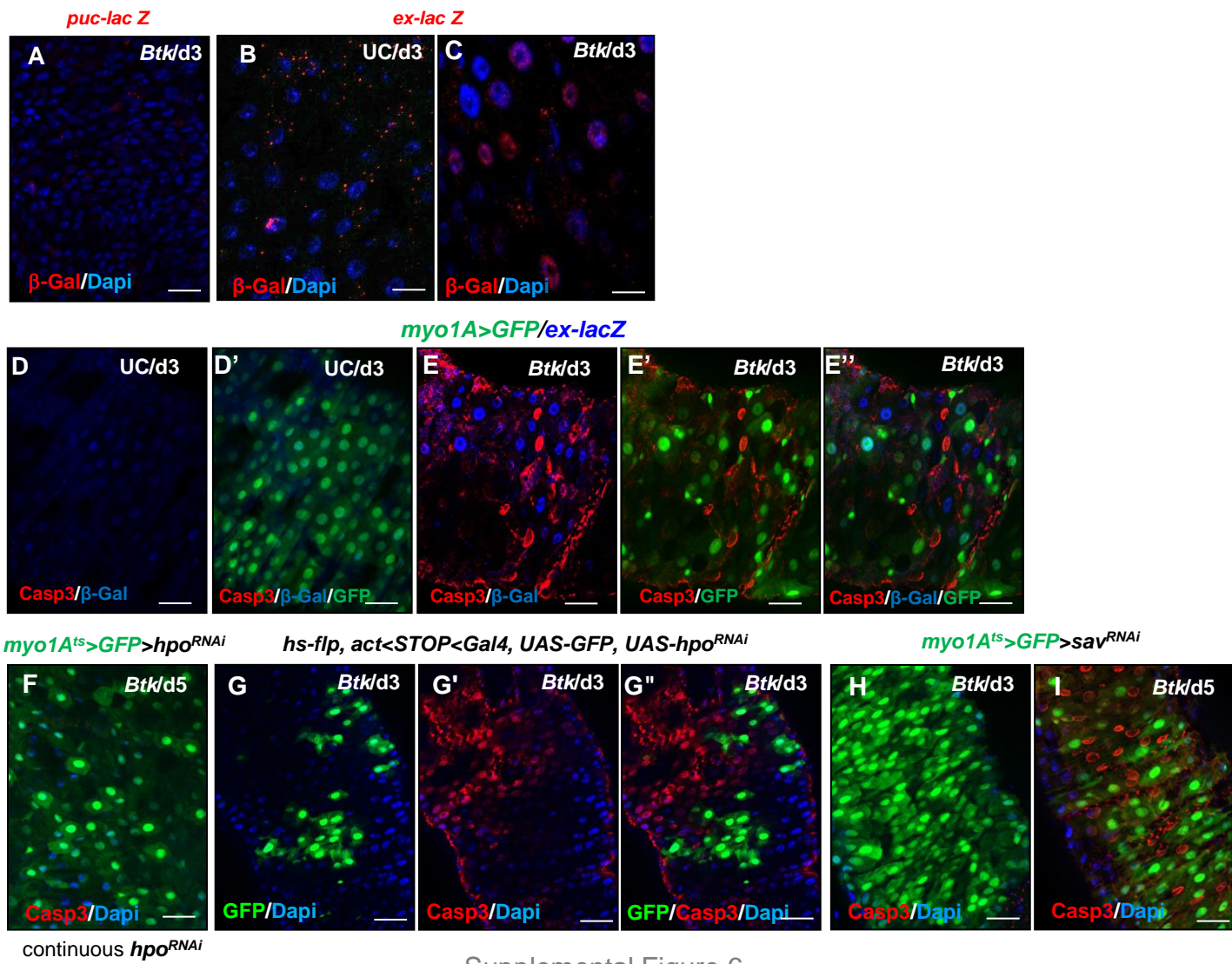


Supplemental Figure 4

*myo1A<sup>ts</sup>>GFP>p35*



supplemental Figure 5



Supplemental Figure 6



### **I-3 Effets des sporanges *Btk* et leurs toxines sur la physiologie intestinale**

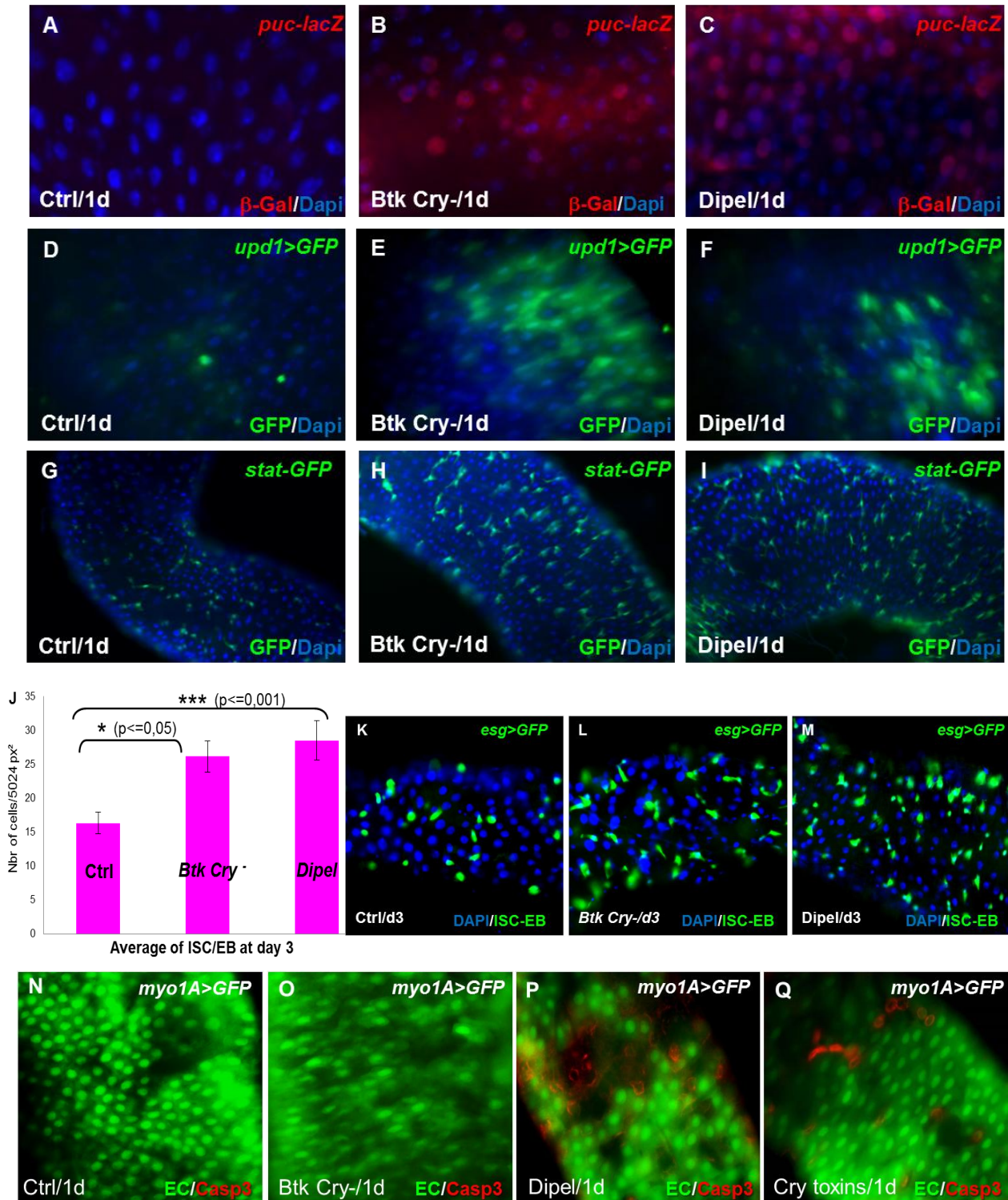
Dans le chapitre I de la partie Résultats, j'ai décrit les effets de l'ingestion de la forme végétative de *Btk* sur la physiologie intestinale de la drosophile et j'ai montré que l'ingestion de doses faibles de ces bactéries est suffisante pour perturber transitoirement l'homéostasie intestinale de la drosophile. Dans ce 2<sup>ème</sup> chapitre, je présente les résultats obtenus suite à l'ingestion des sporanges de *Btk* (ensemble spore + toxines Cry) utilisés comme bioinsecticides. Deux souches de *Btk* sont utilisées : la souche utilisée comme bioinsecticide produisant six toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac) et commercialisée sous le nom de Dipel® et une souche de *Btk* modifiée appelée 4D22 (ne produisant pas de toxines Cry) obtenue du BGSC (Bacillus Genetic Stock Center, <http://www.bgsc.org>). Cette dernière nous a servi de contrôle pour distinguer l'effet spore de l'effet toxines Cry et nous l'avons appelé *Btk* Cry- (pour insister sur le fait qu'elle ne produit pas de toxines Cry). Les doses utilisées correspondent aux doses d'épandage ( $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>). Dans certaines expérimentations, j'ai examiné l'effet de l'ingestion des cristaux des toxines Cry. Les cristaux des toxines Cry représentent 30% de la masse d'un sporange. Dans 50µg de Dipel® (équivalent de  $10^6$  CFU de sporanges *Btk*), on a 15µg de toxines Cry (pour intoxiquer les drosophiles, j'ai déposé sur le milieu 75 µg de cristaux dans des tubes de 5cm<sup>2</sup> de surface). Les résultats obtenus suite à l'ingestion des sporanges de *Btk* et des cristaux sont résumés en deux parties : une première partie décrivant l'effet des sporanges *Btk* sur l'homéostasie cellulaire intestinale et une deuxième partie décrivant les effets des toxines Cry sur la différenciation des cellules intestinales.

### I-3-1 Effets des sporanges *Btk* sur l'homéostasie cellulaire intestinale

Pour évaluer les effets d'une ingestion des sporanges de *Btk* sur l'homéostasie cellulaire intestinale j'ai utilisé trois souches de drosophiles : la souche *esg>GFP* (dont les cellules souches intestinales et les entéroblastes expriment la GFP), la souche *myoIA>GFP* (dont les entérocytes expriment la GFP) et la souche sauvage Canton<sup>S</sup> pour les tests de longévité.

Les drosophiles sont mises dans des tubes de nourriture dans lesquels les sporanges de *Btk* (Dipel® ou *Btk Cry-*) sont déposés sur un papier filtre. Les dissections des drosophiles sont faites entre 1 jour et 3 jours post-ingestion. Dans une première étape, j'ai examiné l'activation des voies de réponses au stress (JNK/ cytokines Upd et JAK/STAT). Nos résultats montrent que les sporanges de *Btk* (contenant ou non des toxines) stimulent la voie JNK (expression du gène rapporteur *puc-lacZ* avec Dipel® et *Btk Cry-* au jour 1 PI, **Figure 13A-C**), la production des cytokines Upd1 (j'ai déjà montré que la bactérie *Btk* à faible dose induit l'expression d'*upd1* et pas *upd3*, [Loudhaief et al., en révision](#)), (**Figure 13D-F**) et la voie JAK/STAT (**Figure 13G-I**). Comme il y a sécrétion de cytokine Upd1 qui active la voie JAK/STAT dans les ISC, j'ai regardé s'il y avait prolifération cellulaire. Comme attendu, j'ai observé une augmentation significative du nombre des cellules Esg+ entre le jour 1 et le jour 3 post-ingestion de *Btk-Cry-* ou de Dipel et le maximum de prolifération a été observé 3 jours PI (**Figure 13J-M**).

Il est intéressant de constater qu'avec *Btk Cry-*, il n'y a pas d'induction d'apoptose (**Figure 13O**). La prolifération des ISC observée fait donc appel au modèle que j'ai décrit précédemment (**voir pages 94 à 96**), ([Loudhaief et al., en révision](#)). L'ingestion de Dipel® (*Btk* produisant les toxines Cry) induit une apoptose des entérocytes (**Figure 13N-Q**). Cette apoptose semble être induite par les toxines Cry produites par Dipel® car l'ingestion des toxines Cry purifiées est suffisante pour induire la mort des entérocytes (**Figure 13N-Q**). La prolifération des ISC observée suite à l'ingestion de Dipel® est plus forte que la prolifération induite par *Btk Cry-* (**Figure 13M**). Ce résultat peut être expliqué par la mort cellulaire régénératrice qui induit une forte prolifération des ISC.

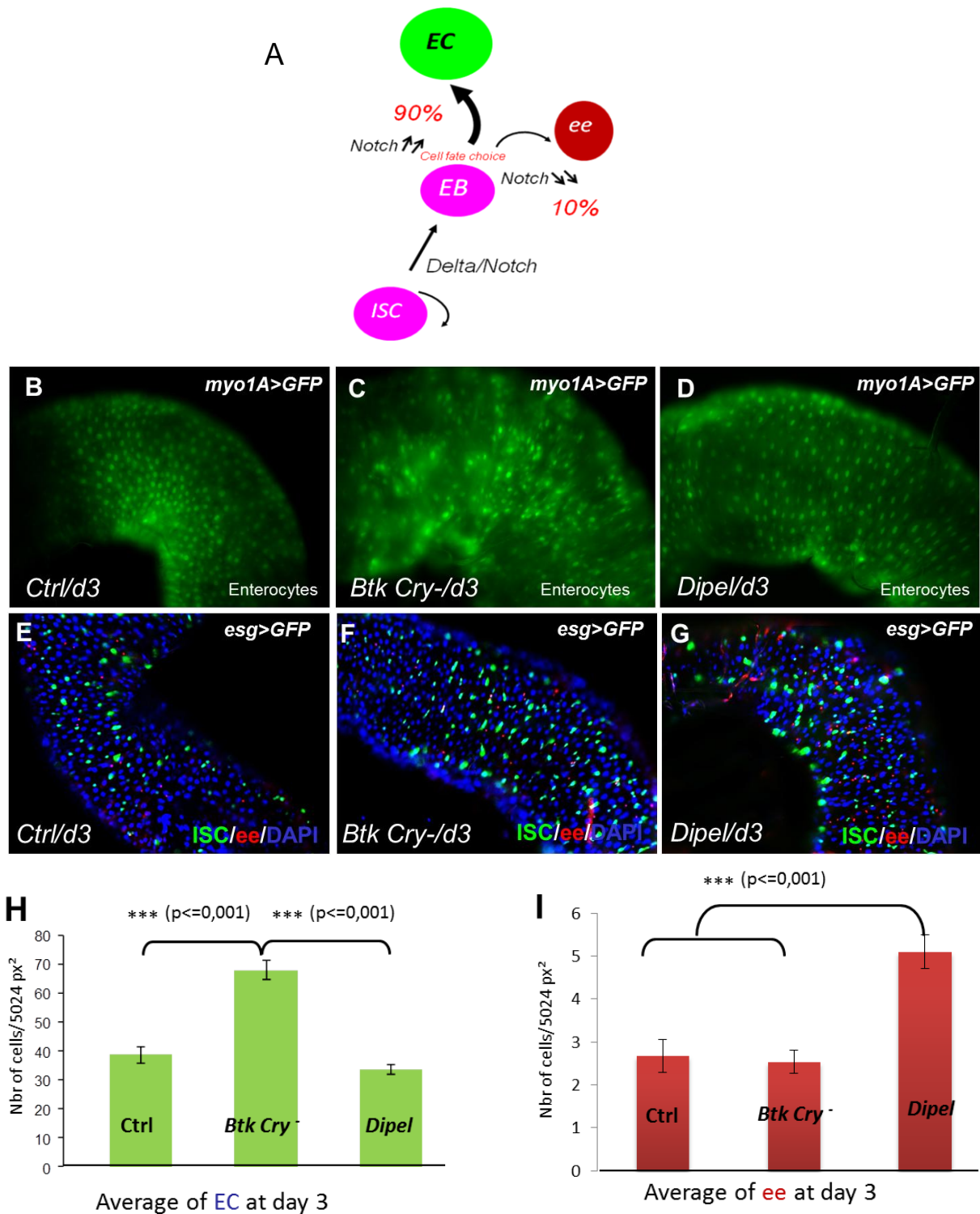


**Figure 13** : Effets des sporanges de *Btk* sur l'homeostasie cellulaire intestinale. **A-C-** expression de *puc* (1 jour PI) dans l'intestin moyen des drosophiles contrôle (A) et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry*- (B) soit par Dipel® (C), marquages  $\beta$ -Gal en rouge et Dapi en bleu. **D-F-** expression de *upd1* (1 jour PI) dans l'intestin des drosophiles ctrl (D) et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry*- (E) soit par Dipel® (F), marquages GFP en vert et Dapi en bleu. **G-I-** expression de *stat* (1 jour PI) dans l'intestin des drosophiles ctrl (G), et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry*- (H) soit par Dipel® (I), marquages GFP en vert et Dapi en bleu. **J-** Quantification du nombre des cellules souches (ISC) et entéroblastes (EB) dans l'intestin moyen des drosophiles contrôle et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry*- soit par Dipel® (surface arbitraire de 5024px<sup>2</sup>). **K-L-** photos d'intestins de drosophiles *esg>GFP* traitées soit avec *Btk Cry*- (L) soit avec Dipel® (M) au jour 3 PI, Ctrl (K). **N-Q-** Marquage anti- Casp3 (en rouge) sur intestins de drosophiles *myo1A>GFP* traitées soit avec *Btk Cry*- (O) soit avec Dipel® (P) soit avec les toxines Cry (Q) au jour 1 PI, Ctrl (N).

A l'instar de l'impact de l'ingestion de faibles doses de *Btk* sous forme végétative, l'ingestion de sporanges de *Btk* vides induit aussi un surnombre d'EC (lié à l'absence d'apoptose). (**Figure 14B, C et H**). De même le nombre des cellules entéro-endocrines n'est pas affecté après ingestion de *Btk* Cry- (**Figure 14E, F et I**). ([Loudhaief et al., en révision](#)).

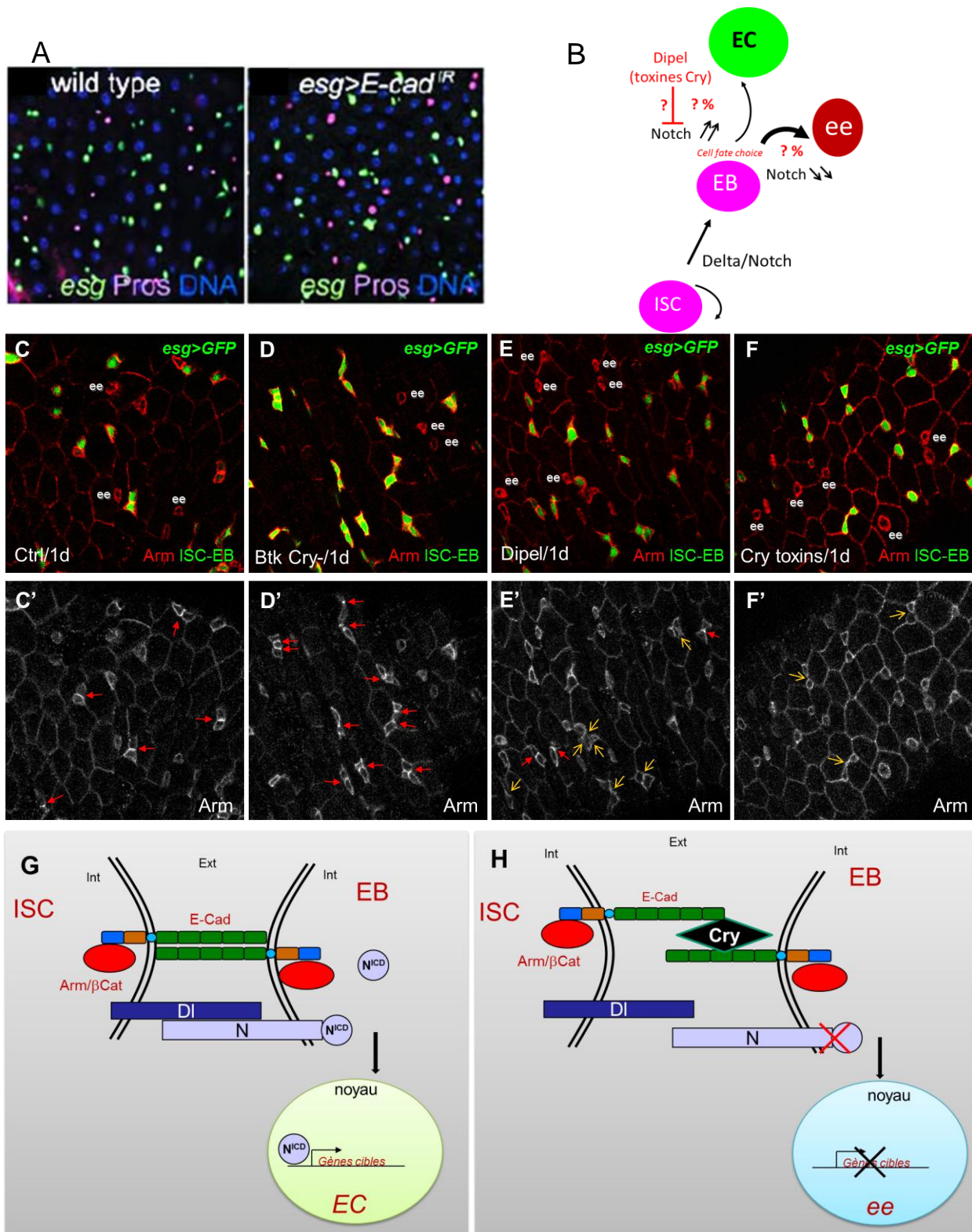
Dans le cas des drosophiles intoxiquées par Dipel®, on n'a pas observé une modification du nombre des entérocytes, (**Figure 14D et H**). La mort cellulaire régénératrice a permis donc de remplacer les entérocytes endommagés par les toxines Cry. Résultat surprenant, l'ingestion de Dipel® ou de toxines Cry purifiées induit une augmentation du nombre des cellules entéro-endocrines (**Figure 14G et I**). Ces résultats suggèrent que les toxines produites par Dipel® impactent la différenciation des entéroblastes en favorisant la différenciation vers les ee plutôt que les ECs (**Figure 14J**). Dans la partie précédente, j'ai montré que la présence des toxines Cry produites par *Btk* est suffisante pour basculer la différenciation des entéroblastes vers les cellules entéroendocrines.

Par ailleurs, il est connu que le choix de différenciation des entéroblastes est gouverné principalement par la voie de signalisation Notch ([Micchelli and Perrimon, 2006](#); [Ohlstein and Spradling, 2006, 2007](#); [Pasco et al., 2015](#)). En effet, le ligand transmembranaire Delta (DI) exprimé dans les ISC se lie à son récepteur Notch (N) présent à la surface des entéroblastes. Ceci induit le clivage du domaine intracellulaire de N et sa relocalisation dans le noyau pour activer ses gènes cibles ([Perdigoto and Bardin, 2013](#)). Selon le niveau de DI exprimé, les entéroblastes se différencient soit en entérocytes (en réponse à une forte activation de Notch) soit en cellules entéro-endocrines (en réponse à une activation faible de Notch), ([Beebe et al., 2010](#); [Micchelli and Perrimon, 2006](#); [Ohlstein and Spradling, 2006, 2007](#); [Perdigoto and Bardin, 2013](#)). Le contact prolongé entre les ISC et les EB semble être nécessaire pour permettre à la signalisation Notch d'atteindre le niveau nécessaire pour une différenciation vers des entérocytes ([Maeda et al., 2008](#)). Les jonctions adhérentes formées par les E-cadhérines et Armadillo/ $\beta$ -catenine interviennent pour prolonger le contact entre DI et N ([Choi et al., 2011](#); [Maeda et al., 2008](#); [Micchelli and Perrimon, 2006](#); [Ohlstein and Spradling, 2006, 2007](#)). Maeda et ses collègues ont montré que l'interface liant les ISC et les EB est enrichie en E-cadhérines et Armadillo/ $\beta$ -catenin. La réduction de l'adhésion entre les ISC et les EB (par RNAi E-Cad) induit soit une accumulation de cellules non différenciées soit une différenciation vers des cellules entéroendocrines, (**Figure 15A**), ([Maeda et al., 2008](#)). Par ailleurs, il est connu que les toxines Cry insecticides se fixent sur les E-cadhérines



**Figure 14** : Effets des sporanges de *Btk* sur l'homeostasie cellulaire intestinale. **A-** schéma décrivant le choix de différenciation des entéroblastes : quand le niveau de Notch est élevé, les entéroblastes se différencient en entérocytes (90% des EB deviennent des EC) et quand le niveau de Notch est faible, les EB se différencient en cellules entéro-endocrines (10% des EB se différencient en ee). **B-D-** photos d'intestins de drosophiles *myo1A>GFP* traitées soit avec *Btk Cry-* (C) soit avec *Dipel*® (D) au jour 3 PI, Ctrl (B). **E-G-** Marquage anti-Prospero (en rouge) sur intestins de drosophiles *esg>GFP* traitées soit avec *Btk Cry-* (F) soit avec *Dipel*® (G) au jour 3 PI, Contrôle (E). **H-** Quantification du nombre des entérocytes (EC) dans l'intestin moyen des drosophiles contrôle et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry-* soit par *Dipel*® (surface arbitraire de 5024px²) au jour 3 PI. **I-** Quantification du nombre des cellules entéro-endocrines (ee) dans l'intestin moyen des drosophiles contrôle et des drosophiles nourries soit par *Btk Cry-* soit par *Dipel*® (surface arbitraire de 5024px²) au jour 3 PI.

des espèces cibles (**voir page 27, Figure 3**). En tenant compte de toutes ces données, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation du nombre des cellules entéro-endocrines suite à une ingestion de Dipel peut être causée par une fixation des toxines Cry libérées par Dipel® sur les cadhérines intestinales. Une telle fixation réduirait donc la signalisation Delta-Notch. Par conséquent, les entéroblastes vont préférentiellement se différencier en cellules entéro-endocrines (**Figure 15B**). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai marqué les intestins des drosophiles nourries par du Dipel® ou du *Btk Cry-* par l'anticorps anti-Armadillo/ $\beta$ -catenine (ce marquage est enrichi dans les jonctions adhérentes, voir page 28). Cette expérience m'a permis de voir un marquage intense au niveau de la jonction ISC-EB dans les drosophiles contrôles ou suite à une intoxication par *Btk Cry-* (ne produisant pas de toxines Cry), (indiqué par les flèches rouges **Figure 15C-C' et D-D'**). Par contre, ce marquage devient moins intense suite à l'ingestion de Dipel® ou des toxines Cry (indiqué par les flèches jaunes, **Figure 15E-E' et F-F'**). Mes résultats suggèrent donc que les toxines contenues dans Dipel® sont responsables de l'augmentation du nombre de ee. Cet effet pourrait donc passer par une diminution de l'interaction entre ISC et EB comme le montrent les marquages Armadillo. Cette diminution de l'interaction ISC/EB pourrait être due à l'interaction des toxines Cry avec les cadhérines (**Figure 15G et H**). Pour confirmer ces résultats, il est nécessaire de vérifier si les toxines Cry produites par Dipel se fixent sur les E-cadhérines de la drosophile et si la signalisation Notch est affectée (utilisation d'anticorps anti-domaine intracellulaire de Notch, surexpression de Notch ou des cadhérines...).



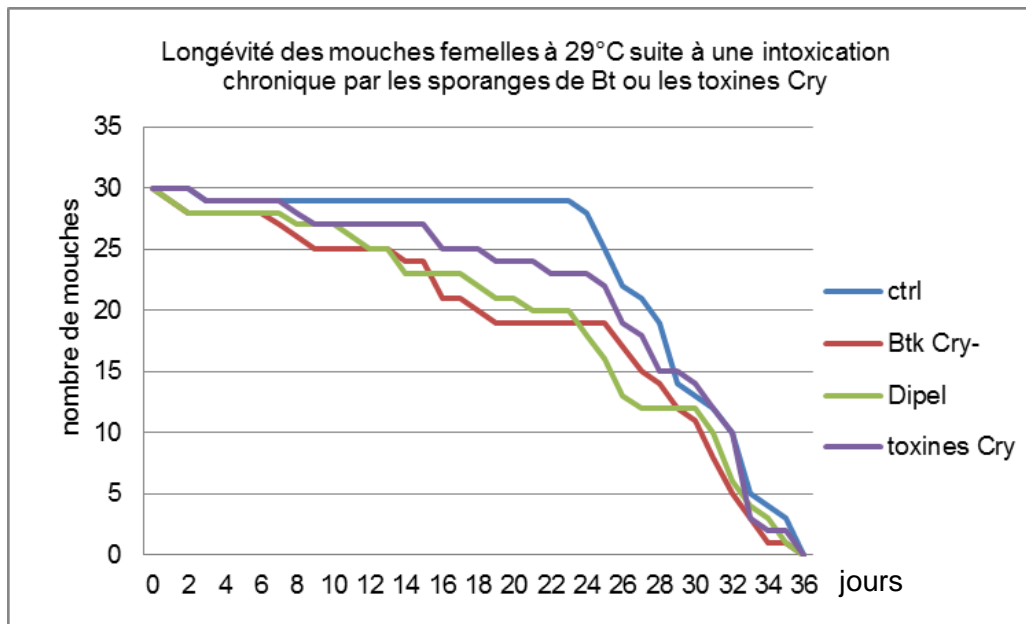
**Figure 15:** Effets des sporanges de *Btk* sur la différenciation des cellules intestinales. **A-** photos montrant l'augmentation du nombre des cellules entéro-endocrines (marquage rose) dans les drosophiles *esg>E-cad<sup>IR</sup>* comparé aux drosophiles contrôles (wild type), en GFP cellules souches intestinales et entéroblastes et en bleu Dapi, (Maeda et al., 2008). **B-** schéma suggérant l'effet de ces toxines Cry produites par Dipel® sur le choix de différenciation des entéroblastes : l'interaction de ces toxines avec la voie Notch favoriserait une différenciation vers les cellules entéro-endocrines. **C-F'-** Marquage anti- Armadillo (en rouge ou gris) sur intestins de drosophiles *esg>GFP* traitées soit avec *Btk* Cry- (D et D'), soit avec Dipel® (E et E') soit avec les toxines Cry (F et F') au jour 1 PI, Ctrl (C et C'). **G et H-** Modèle proposant le mode d'interaction des toxines Cry avec la signalisation Notch (N)-Delta (DI). Ce modèle propose une fixation des toxines Cry sur les E-cadhérines intestinales (E-cad). Une telle fixation empêcherait le ligand DI de se fixer à son récepteur N. et par conséquent pas de clivage du domaine intracellulaire de N (N<sup>ICD</sup>). Quand le niveau de N<sup>ICD</sup> est faible, il n'y a pas de transcription de ses gènes dans les EB par conséquent les EB se différencient en cellules entéro-endocrines.

### **I-3-2 Effets d'une intoxication chronique par les sporanges de *Btk* sur la longévité**

Dans le premier chapitre des résultats, j'ai montré qu'une intoxication chronique par de faibles doses de bactéries *Btk* ( $10^6$ CFU/mouche) réduit la longévité des drosophiles de 18%. J'ai voulu vérifier si on peut avoir les mêmes effets avec les sporanges de *Btk* (*Btk* Cry- et Dipel) et les toxines Cry. Les résultats montrent une réduction de la longévité d'environ 19% que ce soit avec *Btk* Cry- ou avec Dipel® ce qui suggère que l'effet est probablement lié à la bactérie *Btk* sous sa forme végétative (**Figure 16**). En effet, les résultats du laboratoire montrent que les spores commencent à germer dans l'intestin des drosophiles 4 heures post-ingestion. La germination des spores se fait principalement dans la partie postérieure de l'intestin moyen (données du laboratoire non publiées). Les bactéries issues des spores germées affecteraient l'homéostasie cellulaire intestinale suite à une activation chronique de la voie JNK et par conséquent une accumulation d'entérocytes immatures et d'entéroblastes indifférenciés. Cette situation est observée dans les intestins des drosophiles âgées (**voir introduction pages 85 et 86**). En effet, chez les drosophiles âgées, la dérégulation de la prolifération des ISC (suite à une activation chronique de certaines voies de signalisation régulant la prolifération comme JNK) résulte en une accumulation de cellules indifférenciées et par conséquent l'apparition de la dysplasie. Cette dysplasie est accompagnée d'un déclin des fonctions métaboliques de l'intestin et d'une rupture de la barrière intestinale des drosophiles (Biteau et al., 2008, 2010; Jasper, 2015; Karpac et al., 2013; Rera et al., 2011). Ce déclin structurel et fonctionnel de l'épithélium intestinal affecte la santé des drosophiles (Jasper, 2015; Guo et al., 2015). On peut imaginer donc qu'une ingestion répétée de *Btk* induit une inflammation chronique de l'intestin accompagnée d'une réduction des fonctions digestives d'où la fragilisation des drosophiles intoxiquées et la réduction de leur longévité. Il a été déjà montré aussi que la perturbation de l'homéostasie intestinale chez les mouches âgées semble être liée à la dérégulation de l'interaction entre la flore commensale et l'épithélium intestinal suite à une forte production de ROS et l'activation chronique de la voie IMD, ce qui résulte en une dysbiose (déséquilibre de la flore commensale) induisant une inflammation. Cette inflammation est responsable de la stimulation chronique de la prolifération des cellules souches intestinales et de la dégradation structurelle et fonctionnelle de l'épithélium intestinal (Guo et al., 2015). En l'état actuel des données dont nous disposons au laboratoire, l'éventuelle inflammation chronique qui peut apparaître suite à une ingestion répétée de *Btk* ne peut pas être liée à une dysbiose intestinale car nous n'arrivons pas à

détecter de la flore commensale dans les drosophiles traitées ou pas par Btk (données du laboratoire). Le protocole que nous avons utilisé pour détecter la flore commensale nécessite probablement plus de mise au point pour arriver à détecter les bactéries commensales. L'examen de l'état inflammatoire et l'intégrité des intestins suite à une ingestion chronique de Btk et la vérification d'une éventuelle dysbiose (si nous arrivons à voir la flore commensale intestinale) pourront donc nous donner des éléments de réponse sur l'origine de la réduction de la longévité des drosophiles ayant ingéré Btk d'une manière chronique.

La production des toxines Cry n'est pas non plus neutre car on a observé aussi une réduction de la longévité d'environ 9% avec les toxines Cry mais cet effet est moins fort que l'effet bactérie (**Figure 16 et Figure 6 de Loudhaief et al, en révision**). Cela est probablement dû à une induction moins importante de l'inflammation intestinale et/ou une récupération beaucoup plus rapide de l'état d'homéostasie cellulaire. Une dégradation rapide des toxines Cry dans l'intestin permettrait un rétablissement rapide de l'homéostasie, mais cela reste à vérifier.



**Figure 16** : Effets des sporanges de *Btk* et des toxines Cry sur la longévité des drosophiles Wild type (WT). L'ingestion d'une faible dose de *Btk* Cry- ou de Dipel® induit une réduction de la longévité des drosophiles d'environ 19% comparé aux drosophiles contrôles. L'espérance de vie moyenne est de 28,84 chez les drosophiles contrôle, 23,16 chez les drosophiles traitées par *Btk* Cry-, 23,53 chez les drosophiles traitées par Dipel® et 26,50 chez les drosophiles traitées par les toxines Cry.

## I-4 Discussion

L'approche physiologique et mécanistique que j'ai utilisée pour étudier les effets non intentionnels des bioinsecticides à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis var kurstaki* a abouti à plusieurs conclusions. Dans un premier temps, j'ai montré que *Btk* est capable de perturber la physiologie intestinale de la drosophile. Cette perturbation se résume en une altération de l'homéostasie cellulaire intestinale (augmentation de la prolifération des cellules souches et une augmentation du nombre des entérocytes en absence des toxines Cry, et une augmentation du nombre des cellules entéro-endocrines en présence des toxines Cry). Ces effets sur l'homéostasie cellulaire intestinale entraînent une réduction des capacités digestives intestinales (réduction des activités de certaines lipases et protéases intestinales). Nous supposons que cet effet est lié à la présence des nombreux EC immatures lors du renouvellement cellulaire et à l'apoptose des vieux entérocytes pendant la phase de récupération (Loudhaief et al., en révision). De plus, j'ai pu montrer qu'une seule exposition à *Btk* (sous forme végétative et sous forme de sporanges) à la dose d'épandage perturbe transitoirement la physiologie intestinale (Loudhaief et al., en révision et résultats du laboratoire) et qu'une exposition chronique à ce bioinsecticide est capable de réduire la longévité des drosophiles (Figure 6 de Loudhaief et al., en révision et Figure 16). Ces résultats montrent bien que *Btk* peut avoir des effets non intentionnels sur un organisme non cible tel que la drosophile.

Fait intéressant, il est clair dans les résultats que j'ai présentés que l'effet bactérie végétative *Btk* diffère de l'effet sporange (bactérie + toxines Cry) et les résultats préliminaires obtenus avec les toxines Cry suggèrent un effet sur les jonctions cellulaires intestinales probablement suite à la fixation aux cadhérines épithéliales. Par ailleurs, il est à noter que les cadhérines sont très conservées chez les métazoaires et que chez les espèces cibles, les toxines Cry se fixent sur des cadhérines épithéliales (Figure 3 et page 27). Une analyse de l'alignement de séquences des sites de fixation de la toxine Cry1Ab chez deux espèces cibles (*Manduca sexta* et *Chrysomela tremula*) avec les séquences de cadhérines de deux espèces non cibles (la drosophile et l'homme) faites au laboratoire montrent une identité de séquence de 30% et 31 % avec les Cadhérines FAT et Cad88C de la drosophile et de 25% et 26 % avec les cadhérines humaines FAT, (voir annexe pages 193 et 194). Ces résultats renforcent

l'hypothèse de la fixation des toxines Cry sur les cadhérines intestinales de la drosophile et donc l'affaiblissement observé des jonctions intestinales.

Mes travaux de thèse m'ont permis aussi d'apporter un nouveau modèle de réponse intestinale suite à l'ingestion de faibles doses de bactéries opportunistes. Ce modèle diffère de celui de mort cellulaire régénératrice qui lie l'induction de la prolifération des cellules souches à la mort des entérocytes. Au contraire, notre modèle propose une induction de la prolifération de cellules souches intestinales en absence d'apoptose d'entérocytes. Cette réponse semble être systématique et généralisée à différents types de bactéries (certaines expérimentations faites avec *Escherichia coli* donnent les mêmes résultats). De plus, cette induction du renouvellement cellulaire en absence d'apoptose pourrait permettre une sorte de réponse « préventive » pour anticiper un stress intestinal plus important (l'inhibition de la voie JNK dans les entérocytes par exemple les rend plus susceptibles à une faible agression bactérienne). Cette réponse physiologique résulte en une accumulation d'entérocytes et une perturbation transitoire des fonctions digestives. Une ingestion chronique de faibles doses de bactéries opportunistes peut avoir des conséquences drastiques pour les drosophiles (réduction significative de leur longévité). L'originalité de notre étude qui consiste à utiliser des doses faibles de bactéries opportunistes est à l'origine de la découverte de cette réponse intestinale, qui en fin de compte, doit arriver plus souvent au cours de la vie d'un individu par rapport au processus de la mort cellulaire régénératrice. Il est important de souligner que les nombreux travaux précédents utilisant de fortes doses de bactéries ont permis de mettre en évidence les voies de signalisation cellulaire régissant l'homéostasie cellulaire intestinale. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les voies de signalisations cellulaires impliquées semblent être les mêmes quel que soit le modèle (mort cellulaire régénératrice ou renouvellement en absence d'apoptose).

En outre, j'ai observé que les bactéries *Btk* sont éliminées au bout de 4 heures de l'intestin (Loudhaief et al., en révision). Cette élimination rapide des bactéries peut être expliquée par la production des ROS dirigés contre ces bactéries par les entérocytes (production des ROS de type HOCl 1h après ingestion de Btk, résultats non publiés du laboratoire) et probablement par une induction de la réponse immunitaire (production de peptides antimicrobiens), (voir introduction page 69 et Figure 7). L'élimination des bactéries Btk peut être aussi expliquée par leur expulsion rapide de l'intestin. En effet, j'ai obtenu des résultats préliminaires très intéressants (qui sont maintenant confirmés par mes collègues au laboratoire) montrant une augmentation très significative de la contraction intestinale suite à l'ingestion de *Btk* (pic à 2h post ingestion, résultats non publiés du

laboratoire). Par ailleurs, il est connu que, chez la drosophile comme chez les mammifères, l'épithélium intestinal est entouré par du muscle lisse. La contraction péristaltique de ce muscle se déclenche lors de la prise alimentaire et permet la progression du bol alimentaire dans l'intestin (Farré and Tack, 2013). Une étude menée chez la souris a montré une induction d'une contraction intestinale différente de la contraction péristaltique après ingestion de nématodes (Khan and Collins, 2006). Cette contraction pathologique a été aussi observée chez la drosophile après ingestion de fortes doses d'*Ecc* (Buchon et al., 2010). Il est possible donc que la contraction que nous avons observée suite à l'ingestion de Btk fasse partie des mécanismes physiologiques de défense (production de ROS et réponse immunitaire) pour permettre de se débarrasser des agents pathogènes avec un minimum de dégâts.

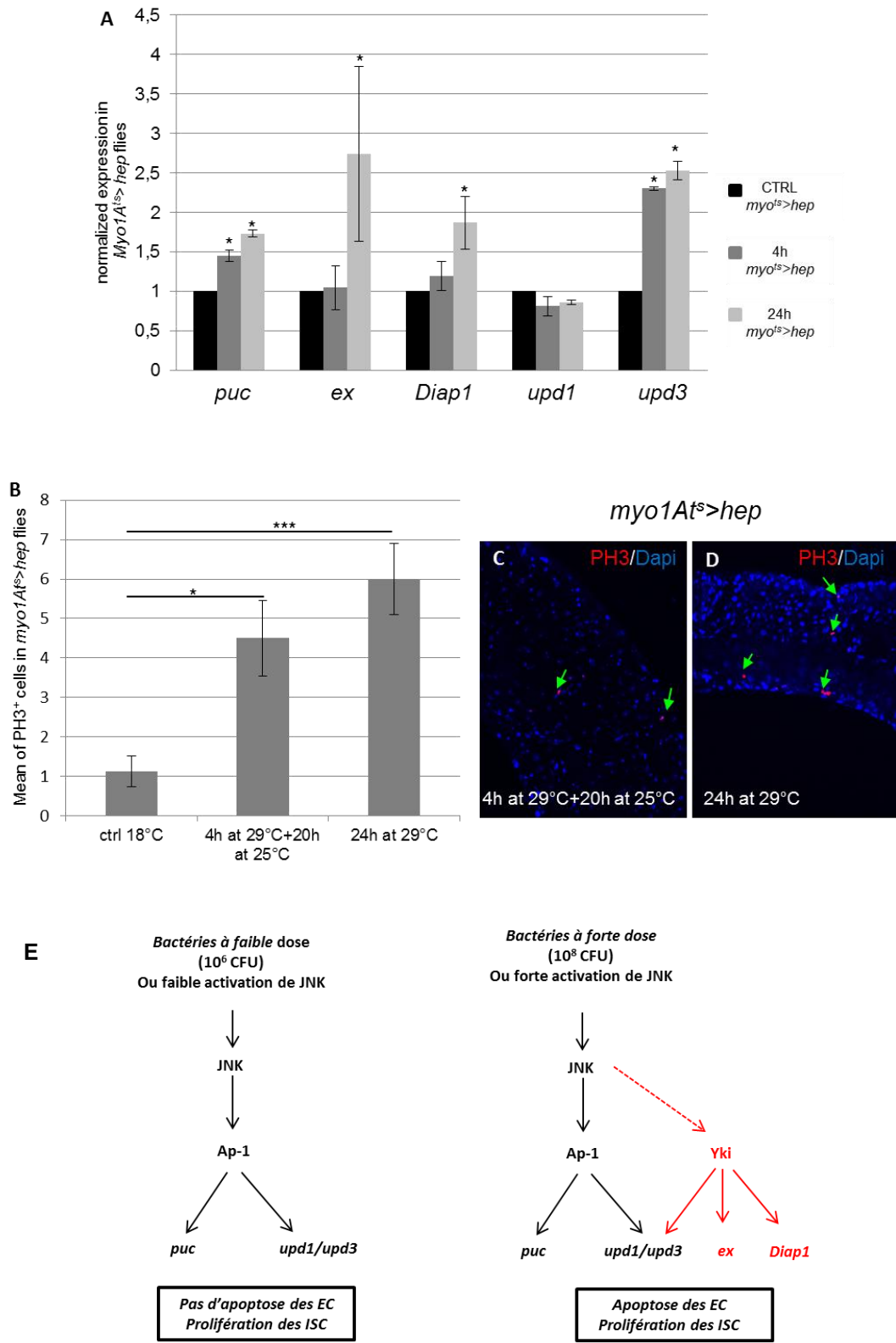
## **Chapitre II**

### **Rôles de la voie de signalisation JNK dans les entérocytes**

## II-1 JNK : apoptose versus cytoprotection

L'activation de la voie de signalisation JNK est primordiale pour la stimulation de la prolifération des cellules souches intestinales en réponse aux stress subis par l'épithélium intestinal (stress oxydatif, dommages de l'épithélium intestinal, infections). Le rôle de la voie JNK dans l'intestin et la chronologie des événements suite au stress intestinal reste un sujet de débat. En effet, certaines études montrent que c'est l'activation de la voie JNK dans les entérocytes qui induit la mort cellulaire par apoptose et c'est cette apoptose qui stimule la prolifération des cellules souches intestinales (Apidianakis et al., 2009). D'autres études montrent que la suractivation de la voie JNK induit l'apoptose des entérocytes, mais la prolifération des cellules souches intestinales ne résulte pas seulement de la mort des entérocytes mais aussi d'une voie de signalisation JNK apoptose-indépendante (Jiang et al., 2009, 2011).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai montré que la voie de signalisation JNK est induite dans l'épithélium intestinal suite à une intoxication par de faibles doses de *Bacillus thuringiensis*, mais nous n'avons pas observé d'apoptose d'entérocytes suite à cette activation de JNK (Figures 1 et 3 Loudhaief et al, en révision). Le niveau d'activation de JNK dans ce cas n'est probablement pas suffisant pour induire de l'apoptose, mais suffisant pour stimuler la prolifération des cellules souches intestinales (Figure 2 Loudhaief et al, en révision). Cela nous a permis de distinguer un nouveau mécanisme de régénération intestinale différent de la mort cellulaire régénératrice. Par contre, l'ingestion de fortes doses de *Btk* ou de faibles doses du pathogène *Pseudomonas entomophila* (*Pe*) induit plus fortement la voie JNK et dans ce cas j'ai observé de l'apoptose des entérocytes et une augmentation de la prolifération des cellules souches intestinales (Figures 1, 2 et 3 Loudhaief et al, en révision). Ces résultats suggèrent que les réponses intestinales aux bactéries ingérées dépendent de la dose et de la pathogénicité de ces bactéries. Ces réponses intestinales pourraient dépendre du niveau d'activation de la voie JNK par ces bactéries. J'ai vérifié cette hypothèse en sur-exprimant la kinase JNKK/Hemipterous (Hep) activatrice de la voie JNK grâce au système UAS/GAL4 thermo-inductible (voir page 41 et Figure 4). J'ai pu observer une induction graduelle de l'expression des cibles de la voie JNK (*puc* et *upd3*) et des cibles de Yki (*ex* et *Diap1*) selon le niveau de surexpression de Hep. Une faible activation de Hep induit uniquement

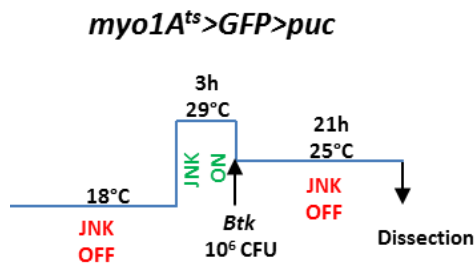


**Figure 17** : Conséquences de l'activation de la voie de signalisation JNK. **A-** expression normalisée des gènes cibles de la voie JNK 24h après activation en utilisant les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>hep* (barres noires, drosophiles contrôles maintenues à 18°C ; barres gris foncé, JNK est activé pendant 4h ; barres gris clair, JNK est activé pendant 24h). **B-** moyenne des cellules PH3+ dans l'intestin moyen des drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>hep* dans 3 conditions d'induction : drosophiles contrôles maintenues à 18°C, JNK activé pendant 4h à 29°C et JNK activé pendant 24h à 29°C. **C** et **D-** photos montrant des cellules en division (marquage anti-PH3 en rouge pointé par les flèches vertes) 24h après l'activation de JNK ; **C** : JNK activé pendant 4h à 29°C et **D** : JNK activé pendant 24h à 29°C. **E-** Schéma résumant les réponses cellulaires suite à l'activation de JNK (génétiquement ou suite à une ingestion de bactéries allochtones).

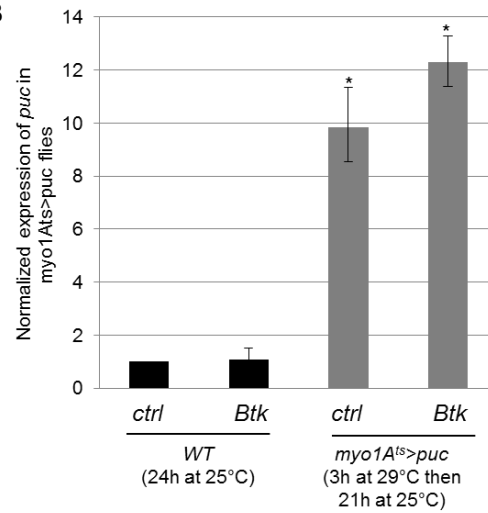
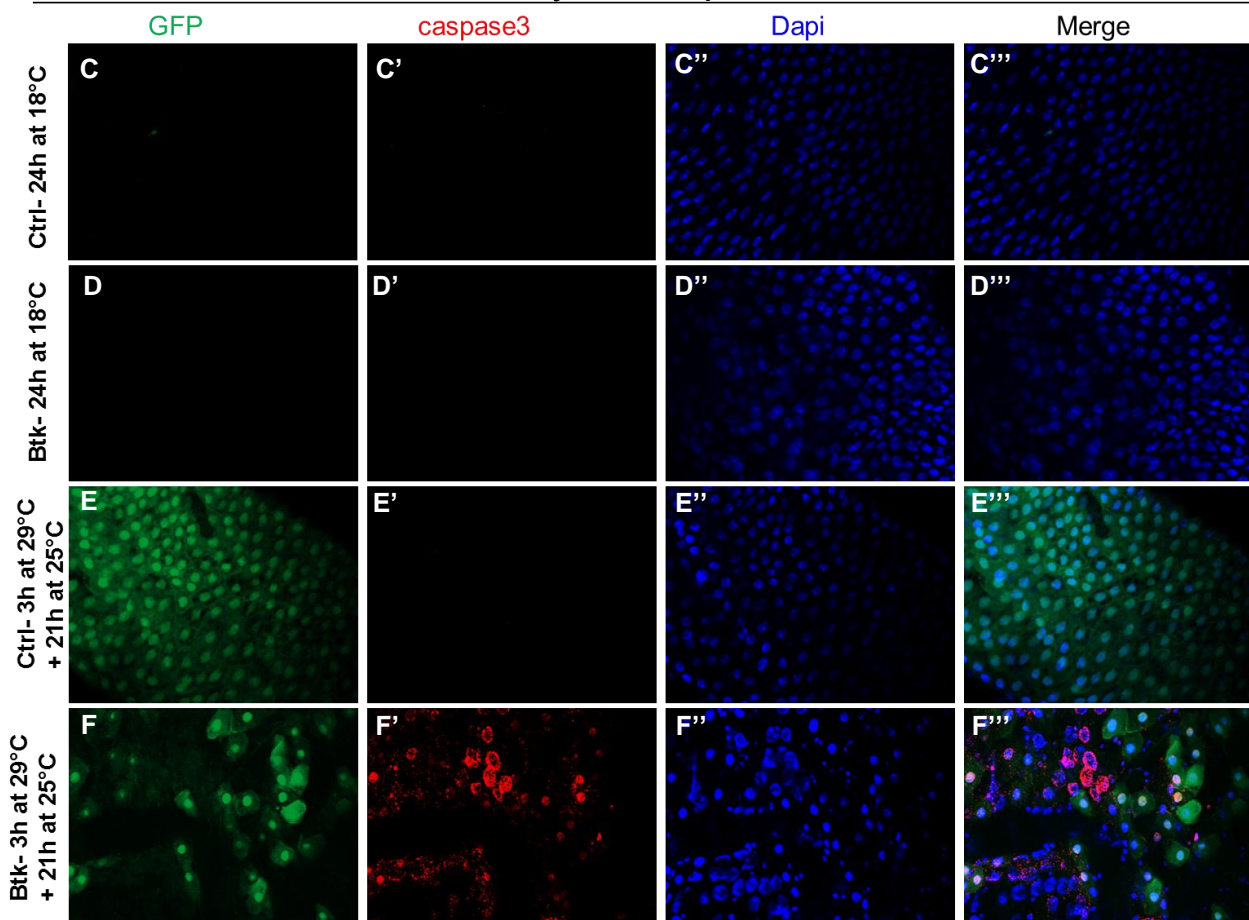
*puc* et *upd3* et par conséquent une stimulation de la prolifération des ISC (**Figure 17**). Un fort niveau d'activation de Hep induit en plus les gènes cibles de Yki *ex* et *Diap1* et une forte induction de la prolifération des ISC (**Figure 17**). Ces résultats suggèrent qu'une faible induction de JNK est suffisante pour stimuler la prolifération des ISC et qu'une forte activation de la voie induit l'activation des cibles de la voie Hippo *ex* et *Diap1* probablement pour assurer une production plus importante de cytokines Upd et donc une induction plus importante de la prolifération des ISC (**Figure 17E**). Cette dernière situation rappelle le modèle de la mort cellulaire régénératrice dans lequel l'ingestion de fortes doses de bactéries opportunistes ou de pathogènes induit fortement la voie JNK, les cibles de la voie Hippo, la production de cytokines, l'apoptose et une forte prolifération des ISC (Apidianakis et al., 2009; Buchon et al., 2009b; Chatterjee and Ip, 2009; Codelia et al., 2014; Cordero et al., 2012; Jiang et al., 2009, 2016; Karpowicz et al., 2010; Staley and Irvine, 2010; Vriza et al., 2014).

Pour examiner plus en détail l'importance de la voie JNK dans la réponse à un stress bactérien, j'ai inhibé cette voie en utilisant le système UAS/GAL4 (j'ai utilisé les souches *UAS-puc* et *UAS-bsk<sup>DN</sup>*) en suivant le protocole décrit dans la **Figure 18A**. Pour s'assurer qu'on a bien une surexpression du gène *puc* et donc une inhibition de la voie JNK (Puc joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la voie) suite au passage des drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>puc* placées pendant 2h à 29°C, j'ai examiné par q-PCR l'expression du gène *puc*. Les résultats obtenus montrent bien une forte induction de *puc* comparé aux drosophiles sauvages (**Figure 18B**). Les expérimentations que j'ai effectuées m'ont permis d'identifier un nouveau rôle de la voie JNK dans l'épithélium intestinal. En effet, en plus de ses rôles dans le contrôle de la prolifération des ISC et l'induction de l'apoptose des entérocytes, j'ai trouvé des résultats très intéressants suggérant un rôle cytoprotecteur de JNK dans les entérocytes. En effet, en inhibant cette voie de signalisation dans les entérocytes (en utilisant des drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>puc* **Figure 18A et B**) j'ai constaté l'apparition de l'apoptose des entérocytes quand les drosophiles sont intoxiquées par de faibles doses de *Btk* (**Figure 18C-F**). Sachant que les faibles doses de *Btk* n'induisent pas d'apoptose (**Figure 3, Loudhaief et al, en révision**), l'apparition de la mort cellulaire dans les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>puc* placées pendant 3 heures à 29°C puis intoxiquées par *Btk* (**Figure 18A**) suggère que JNK confère aux entérocytes une cytoprotection contre ces bactéries opportunistes ingérées. Dans les expérimentations contrôles (drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>puc* gardées à 18°C (système UAS/GAL4 inhibé)) je n'ai pas

A



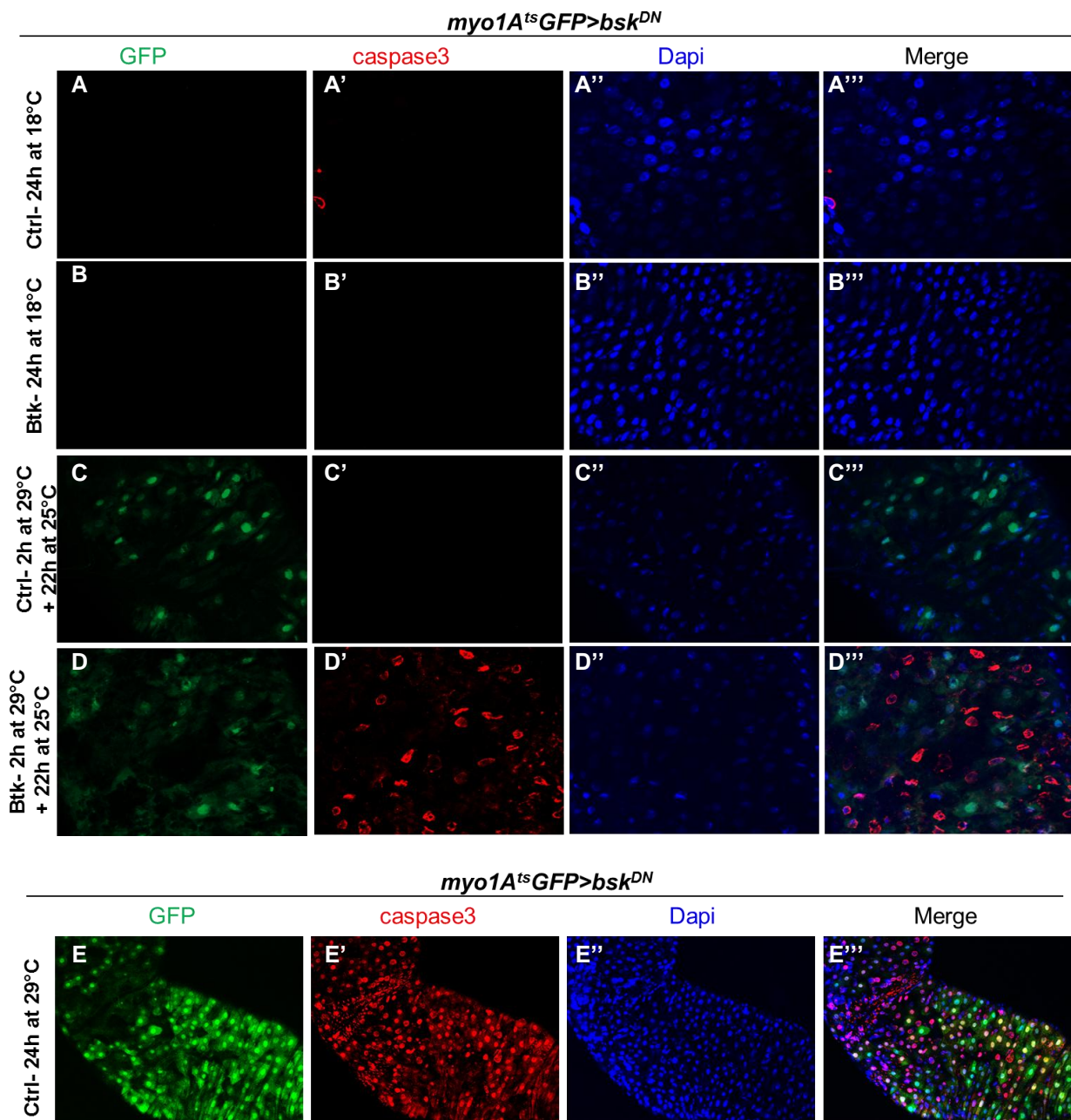
B

*myo1A<sup>ts</sup>GFP>puc*

**Figure 18** : Conséquences de l'inhibition de la voie de signalisation JNK en utilisant les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>puc*. **A**- Schéma décrivant les temps d'inhibition de la voie JNK suite à la surexpression de *puc* (Puc assure le rétrocontrôle négatif de la voie). **B**- Expérience contrôle montrant l'expression normalisée du gène *puc* dans les drosophiles WT et dans les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>puc* intoxiquées ou non par la bactérie *Btk*. L'expression de *puc* est très élevée dans les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>puc* ce qui montre qu'on a bien une inhibition de la voie JNK. **C-F'''** L'inhibition de la voie JNK dans les entérocytes (en utilisant les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>puc*) résulte en une apoptose des entérocytes (marquée par l'anti-caspase3, marquage rouge) dans les drosophiles intoxiquées par *Btk*. **C à C'''** : drosophiles contrôles maintenues à 18°C, **D à D'''** : drosophiles intoxiquées par *Btk* et maintenues à 18°C, **E à E'''** : drosophiles contrôles dont la voie JNK est inhibée (surexpression de *puc* pendant 3h), **F à F'''** : drosophiles intoxiquées par *Btk* dont la voie JNK est inhibée (surexpression de *puc* pendant 3h).

vu d'apoptose d'entérocytes suite à l'ingestion de *Btk*. (**Figure 18C-D''**), ce qui confirme que l'effet observé est bien dû à une inhibition de la voie JNK dans les entérocytes. Pour confirmer ces résultats, j'ai inhibé la voie JNK dans les entérocytes en utilisant cette fois-ci un dominant négatif de la kinase JNK (drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>>bsk<sup>DN</sup>*) (**Figure 19**). En sur-exprimant *bsk<sup>DN</sup>* (induction pendant 2h à 29°C), les bactéries ingérées sont capables d'induire l'apoptose des entérocytes, résultats confirmant le rôle cytoprotecteur de cette voie de signalisation lors d'une agression bactérienne (**Figure 19A-D'''**). Résultat plus étonnant, une inhibition prolongée de JNK (induction de *bsk<sup>DN</sup>* pendant 24h à 29°C) est capable d'induire l'apoptose des entérocytes même en absence de stress intestinal (**Figure 19E-E'''**).

Il semble donc que la voie JNK dans les entérocytes ait différents rôles selon son niveau d'activation. Une faible activation de la voie semble être nécessaire pour assurer la cytoprotection des entérocytes contre une agression bactérienne et pour stimuler la prolifération des ISC alors qu'une forte activation de JNK peut induire la mort des entérocytes et par conséquent une forte prolifération des ISC pour remplacer les cellules mortes modèle de mort cellulaire régénératrice.



**Figure 19** : Conséquences de l'inhibition de la voie de signalisation JNK en utilisant les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>bsk<sup>DN</sup>*. **A-D'''** : L'inhibition de la voie JNK dans les entérocytes (en utilisant les drosophiles *myo1A<sup>ts</sup>GFP>bsk<sup>DN</sup>*) résulte en une apoptose des entérocytes (marquée par l'anti-caspase3, marquage rouge) dans les drosophiles intoxiquées par *Btk* : **A à A'''** : drosophiles contrôles maintenues à 18°C, **B à B'''** : drosophiles intoxiquées par *Btk* et maintenues à 18°C, **C à C'''** : drosophiles contrôles dont la voie JNK est inhibée (surexpression de *bsk<sup>DN</sup>* pendant 2h), **D à D'''** : drosophiles intoxiquées par *Btk* dont la voie JNK est inhibée (surexpression de *bsk<sup>DN</sup>* pendant 2h). **E à E'''** : L'inhibition prolongée de la voie JNK (surexpression de *bsk<sup>DN</sup>* pendant 24h) dans les drosophiles contrôles induit une forte apoptose des entérocytes (marquage rouge anti-caspase3) ce qui suggère un rôle cytoprotecteur de la voie de signalisation JNK même en conditions homéostatiques.

## II-2 Discussion

Les données bibliographiques (Apidianakis et al., 2009; Jiang et al., 2009, 2010, 2016; Panayidou and Apidianakis, 2013) et les résultats que j'ai obtenus au laboratoire confirment la complexité de la régulation de la voie de signalisation JNK et la diversité des rôles assurés par cette voie. Apidianakis et ses collaborateurs ont montré qu'une suractivation de JNK dans les entérocytes induit une forte apoptose des entérocytes et une augmentation du nombre de cellules progénitrices, alors que l'inhibition de cette voie en surexprimant JNK<sup>DN</sup> induit une diminution du nombre des cellules esg<sup>+</sup> et une absence d'apoptose. De plus, l'inhibition de la voie JNK inhibe la mort cellulaire dépendante de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Pa14). (Apidianakis et al., 2009). Cette étude montre que l'une des conséquences de l'activation de la voie JNK dans l'épithélium intestinal est d'induire l'apoptose des entérocytes ce qui conduit à l'activation du renouvellement intestinal (modèle de mort cellulaire régénératrice). Une autre étude menée par Jiang et ses collègues a montré des résultats différents de ceux obtenus par Apidianakis. En effet, la suractivation prolongée de la voie JNK dans les entérocytes induit bien une apoptose de ces cellules mais l'augmentation de la prolifération des cellules souches intestinales apparaît avant l'apparition de l'apoptose des entérocytes. De plus, la co-expression de l'inhibiteur de l'apoptose P35 et de la forme activée de JNK (Hep<sup>Act</sup>) ne supprime pas la mitose des ISC JNK-dépendante. En outre, l'inhibition de la voie JNK par Bsk<sup>DN</sup> ne supprime pas la mitose induite par l'apoptose (induite par le gène proapoptotique *reaper*). Cela montre que la division des cellules souches intestinales peut être induite par au moins deux voies de signalisation différentes : une voie caspase-indépendante faisant intervenir la voie de signalisation JNK et une voie caspase-dépendante mais indépendante de JNK (Jiang et al., 2009). Les différences entre les résultats obtenus par Apidianakis et Jiang dépendraient peut être des durées d'induction et d'inhibition de la voie JNK et mes résultats confirment l'hypothèse de l'induction de la prolifération des ISC par deux voies de signalisation différentes, une voie JNK-dépendante caspase-dépendante (dans le cas d'une induction prolongée de la voie JNK ou une intoxication par des pathogènes ou de fortes doses de bactéries opportunistes) et une voie JNK-dépendante caspase-indépendante (dans le cas d'une induction modérée de la voie JNK ou une intoxication par de faibles doses de bactéries opportunistes).

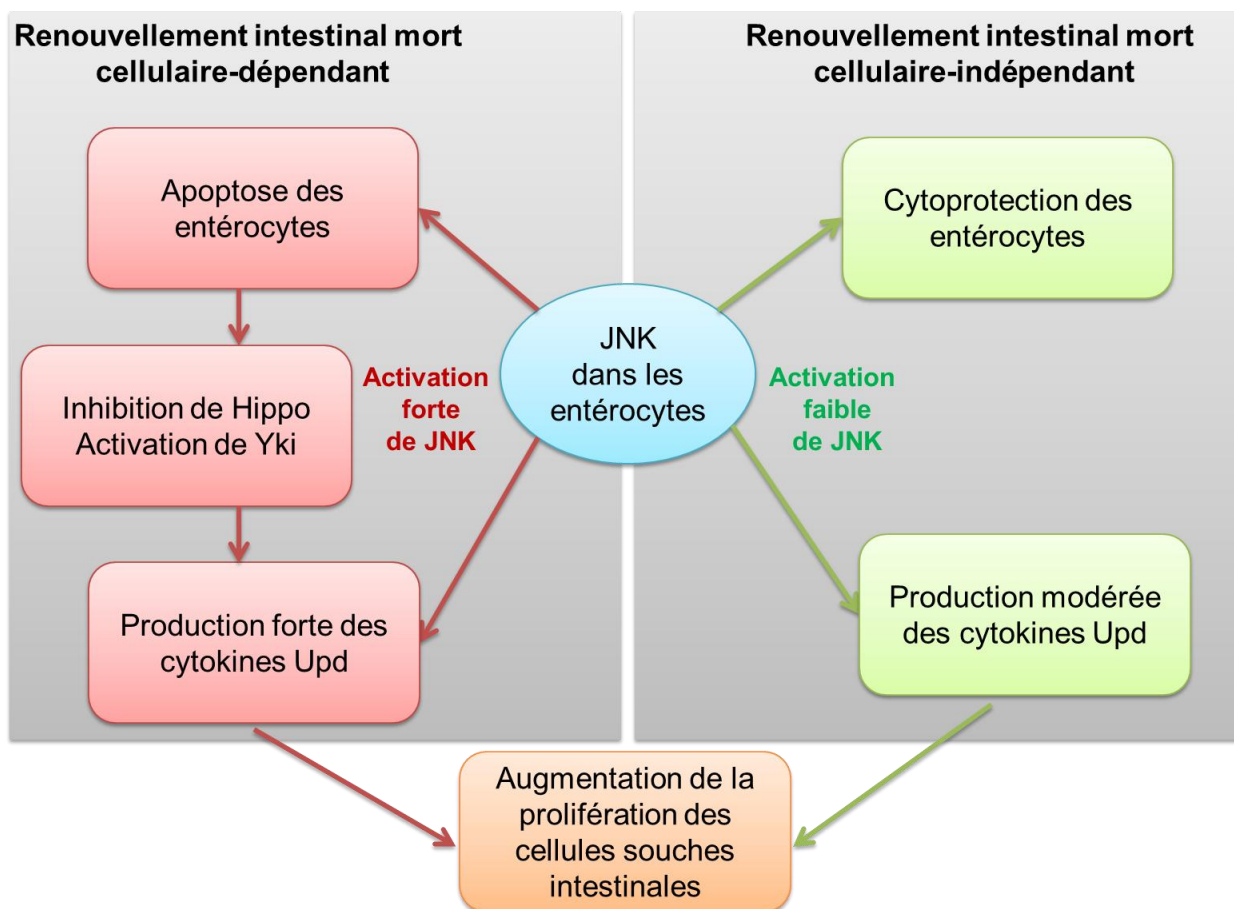
L'activation de la division des cellules souches intestinales JNK-dépendante apoptose-dépendante passe probablement par Yki. En effet, Shaw et ses collègues ont montré que l'activation de JNK dans les entérocytes induit l'expression des gènes cibles de Yki (Shaw et al., 2010). Par ailleurs, il a aussi été observé qu'une forte activation de la voie JNK augmente la localisation nucléaire de Yki (Staley and Irvine, 2010). Yki est activé dans les entérocytes et dans les cellules *esg+* suite à une infection par *Pseudomonas entomophila*. En accord avec ce qu'ont montré Shaw et ses collègues et Staley et Irvine, mes résultats montrent une induction des cibles de Yki (*ex* et *Diap1*) suite à une forte activation de la voie JNK dans les entérocytes (**Figure 18**). Cette forte activation de JNK induit Yki et donc ces cibles. Parmi ces cibles il y a les cytokines Upd qui sont doublement activées par JNK et Yki (**Figure 17E**). Les Upd sont donc très fortement sécrétés pour accélérer la prolifération des ISC et remplacer rapidement les cellules mourantes.

L'activation des cibles de Yki suite à une forte activation de JNK dans les entérocytes peut s'expliquer par une induction de l'apoptose de ces cellules. En effet, Apidianakis et ses collègues et Jiang et ses collègues ont montré que l'apoptose des entérocytes peut être induite par une activation prolongée de la voie JNK (Apidianakis et al., 2009; Jiang et al., 2009). De plus, il a été montré que les cellules destinées à mourir changent leurs propriétés adhésives avec les cellules voisines et que la voie de signalisation Hippo/Yki est sensible au contact cellule-cellule (Boggiano and Fehon, 2012). Il est possible donc que dans le cas de mort cellulaire régénératrice, la forte activation de la voie JNK dans les EC induit un engagement de ces cellules dans l'apoptose et par conséquent la perte de l'adhésion avec les cellules voisines résulte en une activation de Yki. L'absence d'induction des cibles de Yki suite à une faible induction de JNK peut s'expliquer par l'absence d'induction d'apoptose. Nos résultats et les données bibliographiques (Apidianakis et al., 2009; Jiang et al., 2009, 2010, 2016; Panayidou and Apidianakis, 2013) suggèrent fortement que le niveau d'activation de la voie de signalisation JNK dépend de l'intensité du stress subit. Le résultat de l'activation de cette voie est l'accélération de la prolifération des cellules souches intestinales. La mort cellulaire régénératrice apparaît quand la voie est fortement activée.

Mes résultats montrent aussi un rôle cytoprotecteur de la voie de signalisation JNK. En effet, une inhibition de cette voie dans les entérocytes résulte en une apoptose de ces cellules en présence de faibles doses de bactéries opportunistes et si cette inhibition est prolongée la mort des entérocytes peut apparaître même en absence d'intoxication bactérienne. Ce rôle cytoprotecteur de la voie JNK a déjà été observé par Biteau et ses collègues (Biteau et al.,

2008). Les résultats de cette étude montrent une augmentation de l'apoptose des entérocytes mutants pour la voie JNK comparés aux clones sauvages suite à une intoxication par du Paraquat (herbicide de la famille des pyridines) des drosophiles portant des clones mutants pour la voie JNK dans l'intestin (Biteau et al., 2008). Cette étude et cette expérimentation est la seule qui suggère le rôle cytoprotecteur de JNK dans les entérocytes suite à une agression intestinale et depuis aucune étude n'a été faite pour confirmer ce rôle et comprendre sa mécanistique. Pourtant parmi les cibles de la voie JNK on trouve *jafrac1* et *hsp68* qui jouent un rôle dans la cytoprotection des cellules. Le basculement du rôle apoptotique (en cas de forte activation de JNK) au rôle cytoprotecteur des agressions intestinales (en cas de faible activation de JNK) montre l'importance du rôle de la voie JNK dans l'interprétation des signaux reçus dans les entérocytes et adapter les réponses pour préserver l'homéostasie intestinale.

En tenant compte de toutes ces données, j'ai émis l'hypothèse que les niveaux d'activation de JNK contrôleraient les réponses cellulaires adéquates: survie des entérocytes et induction de la prolifération des ISC ou apoptose des entérocytes et induction de la prolifération des ISC. Ce dernier cas fait intervenir la voie de signalisation Hippo pour amplifier les signaux impliqués dans la stimulation de la prolifération des ISC (notamment les cytokines Upd). Cela permettra un remplacement rapide des entérocytes endommagés. Cette hypothèse est schématisée dans la **Figure 20**. Plus d'investigations sont donc nécessaires pour comprendre la fine régulation de cette voie de signalisation et surtout bien caractériser son rôle cytoprotecteur. Cela pourra même apporter des éléments de réponses aux résultats qui parfois semblent être contradictoires d'une étude à l'autre quant aux rôles de la voie de signalisation JNK. La génération de clones d'entérocytes où la voie JNK est inhibée nous permettra de voir si, suite à une ingestion de faibles doses de bactéries opportunistes, l'apoptose ne se déclenche que dans les clones où JNK est inhibé (comme le suggère mes résultats). Cette expérimentation nous permettra de confirmer le rôle cytoprotecteur de JNK. Nous pouvons aussi induire génétiquement et graduellement l'activation de JNK puis déterminer la durée d'activation nécessaire pour l'apparition de l'apoptose. Cela permettra par la suite de déterminer par RT-qPCR le seuil critique d'activation de JNK requis pour basculer de la fonction cytoprotectrice à la fonction pro-apoptotique.



**Figure 20:** Modèle proposé décrivant les différents rôles pouvant être assurés par la voie de signalisation JNK dans les entérocytes : à un niveau faible d'activation, JNK assure la cytoprotection des entérocytes suite à l'ingestion de faibles doses de bactéries opportunistes. Au même temps, ce niveau d'activation est suffisant pour induire une production modérée des cytokines Upd et par conséquent une stimulation de la prolifération des cellules souches intestinales d'une manière apoptose-indépendante. Une activation forte de JNK (induite par des pathogènes ou de fortes doses de bactéries opportunistes) résulte en une forte apoptose des entérocytes et en une forte production des cytokines Upd. Les changements d'adhésion des cellules mourantes avec les cellules voisines permettraient l'inhibition de la voie Hpo et donc l'activation de Yki. Parmi les cibles de Yki on trouve les cytokines Upd. Suite à cette forte production de cytokines, il y a une forte stimulation de la prolifération des cellules souches intestinales (modèle de mort cellulaire régénératrice).

## **Chapitre III**

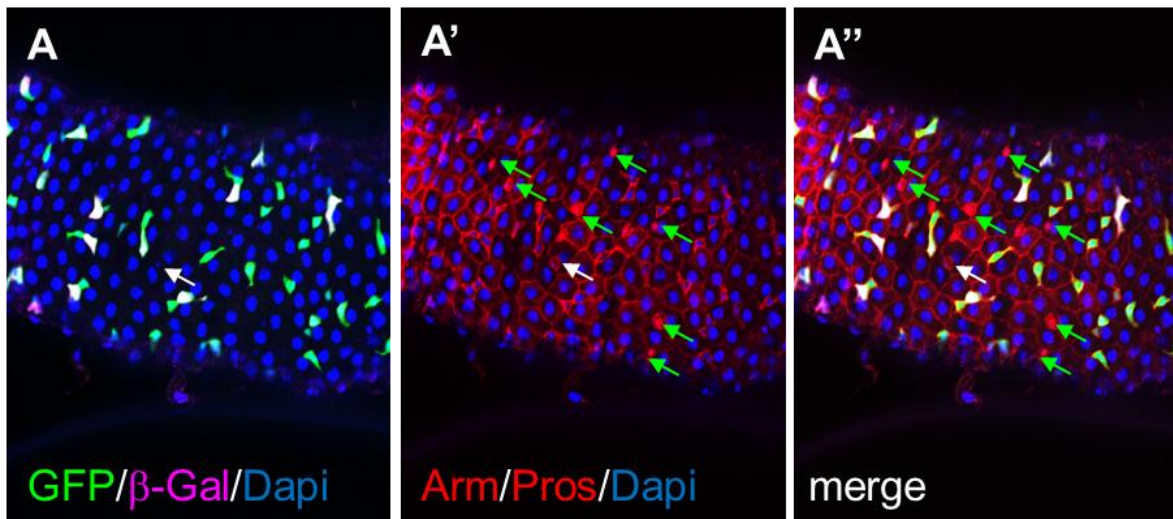
### **Une nouvelle population de cellules intestinales chez la drosophile ?**

### III-1 Des ISC, des EB, des ECs, des ee, mais pas que

Dans l'épithélium intestinal de la drosophile, il existe 4 types cellulaires connus: les cellules souches intestinales (ISC) dont le marqueur est appelé Delta (DI), les entéroblastes (EB) dont le marqueur est Su(H), les cellules entéro-endocrines (ee) dont le marqueur est Prospero (Pros) et les entérocytes (EC) dont le marqueur est Myo1A, (**voir introduction page 47 et Figure 6a**). Les ISC, les EB et les ee possèdent de petits noyaux (entre 3µm et 5 µm de diamètre) alors que les EC possèdent de gros noyaux (entre 7µm et 8 µm de diamètre). En marquant les différents types cellulaires dans l'intestin moyen, j'ai observé un petit nombre de petits noyaux non marqués ni avec Esg (qui marque les ISC et les EB), ni avec Su(H) (qui marque les EB), ni avec Prospero (qui marque les ee), (**Figure 21**). Ces petits noyaux (visualisés par le Dapi) sont bien entourés par une membrane cytoplasmique (marquée par l'anticorps anti-Armadillo, flèche blanche sur la **Figure 21A-A''**) et ils représentent environ 2% des cellules intestinales. En cherchant dans les données de la littérature, j'ai trouvé que Michelli et Perrimon dans leur premier papier d'identification des ISC ont signalé la présence de 1% de petites cellules non marquées par Esg et par Prospero ([Micchelli and Perrimon, 2006](#)), (**Figure 21B**). Suite à cette observation, j'ai décidé de caractériser ces cellules et de savoir si elles représentent un type cellulaire différent (ou pas) des cellules intestinales déjà identifiées.

La première étape était de chercher un marqueur spécifique de ces cellules. Je me suis basée sur ce qui était connus dans l'intestin des mammifères où il existe deux types de cellules souches intestinales: les ISC Lgr5+ qui se divisent activement pour assurer le renouvellement intestinal, et les ISC +4 où cellules souches de Potten (identifiées par Potten en 1977) qui sont quiescentes et se divisent en cas d'agression intestinale (par irradiation des cryptes intestinales ou ablation des ISC Lgr5+) pour redonner les ISC Lgr5+ (**Figure 6b et Figure 22A**), ([Barker et al., 2012, 2012](#); [Buczacki et al., 2013](#); [Tian et al., 2011](#)). Le rôle de ces cellules de Potten n'est pas encore bien caractérisé, mais il est admis que ces cellules souches sont plus résistantes aux irradiations que les cellules souches Lgr5+ ([Barker et al., 2012](#)). Elles constituent donc une réserve pour remplacer les ISC Lgr5+ qui sont sensibles aux radiations (elles cumulent plus les mutations). Les cellules de Potten possèdent plusieurs marqueurs (Bmi1, mTERT, HopX et Lrig1) et chaque marqueur est présent dans une sous population de ces cellules (**Figure 22B**). J'ai donc entrepris une recherche *in silico* de ces marqueurs de vertébrés chez la drosophile et j'ai ainsi trouvé que PSC (pour Posterior Sex Combs) est l'homologue de Bmi1 chez les mammifères. Chez la drosophile, PSC semble être impliqué

*esg-Gal4>GFP/Su(H)-lacZ*



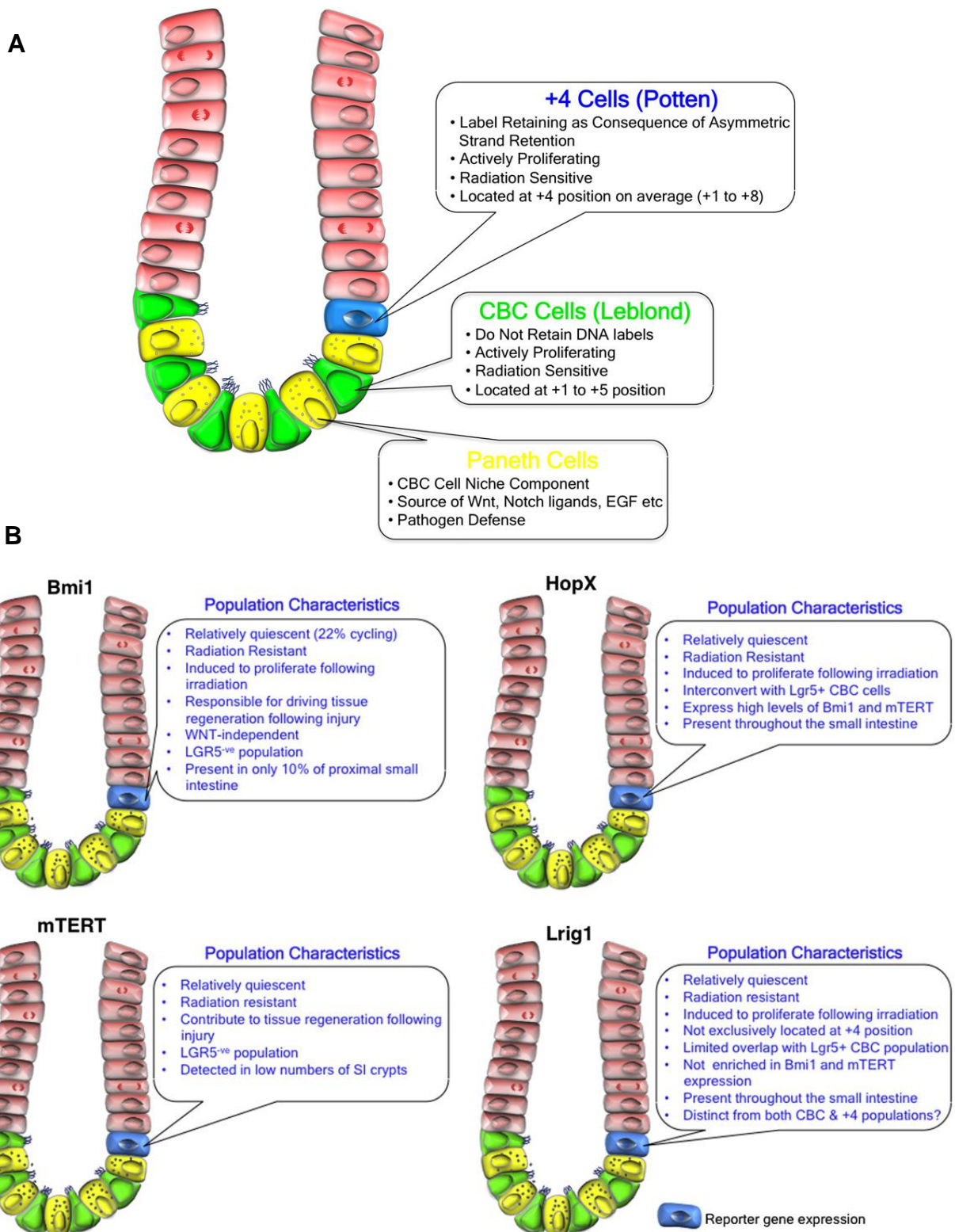
**B**

**Table 1 | Distribution of small cell types in the adult *Drosophila* midgut**

Cell type	Percentage of total in wild type*
<i>esg</i> <sup>+</sup>	36
<i>pros</i> <sup>+</sup>	5
<i>esg</i> <sup>-</sup> <i>pros</i> <sup>-</sup>	1
<i>esg</i> <sup>+</sup> <i>Su(H)GBE-lacZ</i> <sup>+</sup>	18
<i>esg</i> <sup>+</sup> <i>Su(H)GBE-lacZ</i> <sup>-</sup>	18

\* *n* = 242.

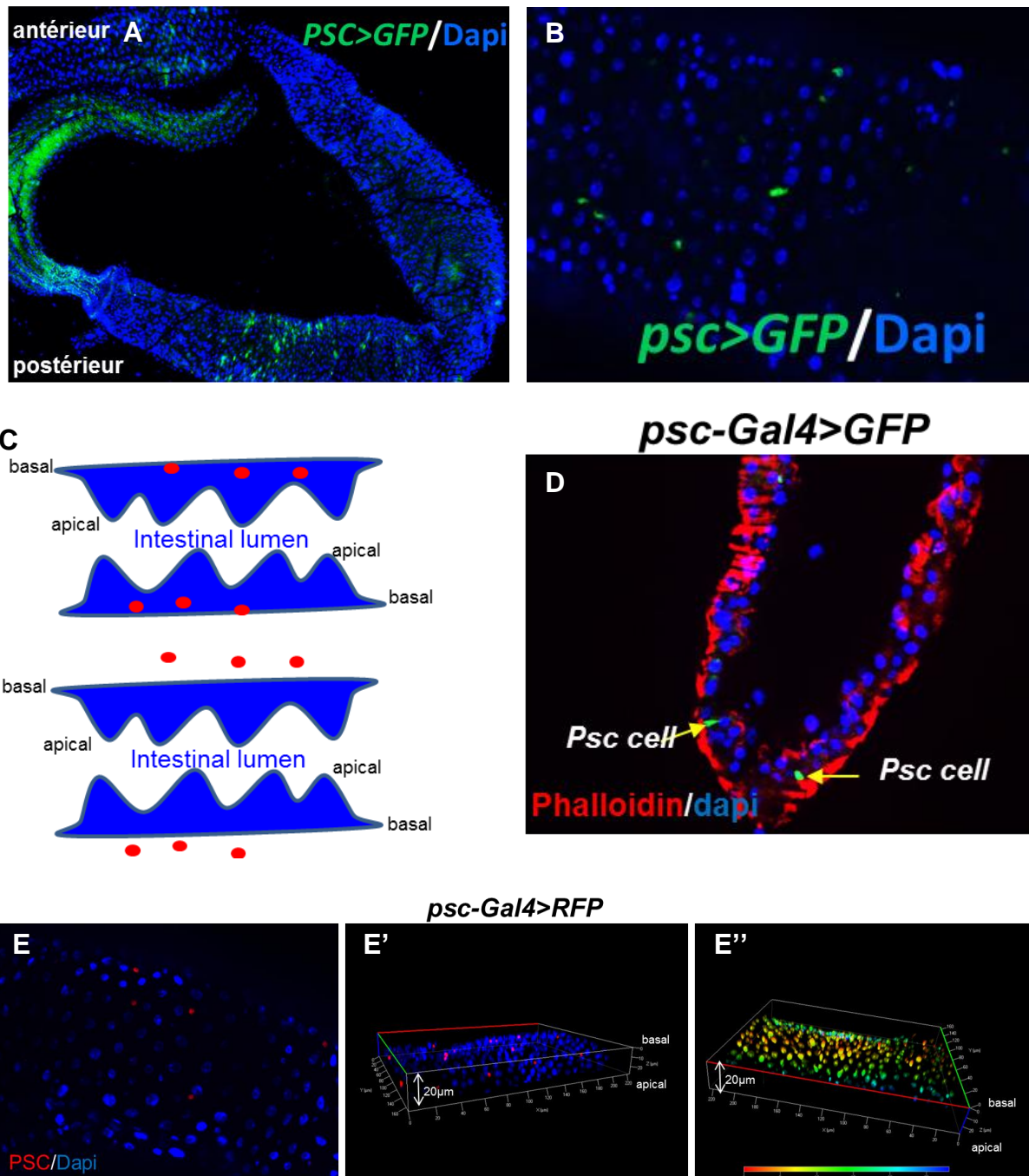
**Figure 21:** Identification de petites cellules intestinales *esg*<sup>-</sup> *pros*<sup>+</sup>: **A-A'**- photos d'intestin de drosophile *esg-GAL4>GFP/Su(H)-lacZ* marqué par de l'anti-Prospero (marque les ee (en rouge) indiquées par des flèches vertes) et l'anti-Armadillo (marque l'Armadillo/β-caténines, en rouge) et l'anti-β-Gal (marque les EB, rose). La GFP marque les cellules Esg+ (ISC et EB). La cellule Esg-Su(H)- Pros- et entourée par de l'Armadillo est indiquée par une flèche blanche. **B-** Tableau indiquant les pourcentages des petites cellules dans l'intestin moyen de la drosophile : il y a 36 % de cellules *esg*<sup>+</sup> (18% ISC et 18% EB), 5% de cellules entéro-endocrines (Pros+) et 1% de cellules Esg- Pros-, étude faite par (Micchelli and Perrimon, 2006).



**Figure 22:** A- schéma décrivant les différents types cellulaires de la crypte intestinale chez les mammifères, leurs positions, leurs fonctions et leurs propriétés. Les cellules Potten +4 sont situées dans la position 4 en comptant à partir du centre de la crypte et elles sont capables de proliférer. B- schéma décrivant les différents types de marqueurs et les caractéristiques des cellules Potten +4 : les cellules Bmi1+ sont localisées dans la partie proximale de l'intestin grêle. Les cellules HopX+ et Lrig+ sont détectées dans tout l'intestin grêle. Les cellules mTERT sont détectées dans l'intestin grêle mais leur nombre est très faible. Toutes ces cellules sont relativement quiescentes et résistantes aux radiations (Barker et al., 2012).

dans le maintien de l'état « cellule souche » des cellules du cyste (le cyste est un ensemble de cellules de la lignée germinale de l'appareil reproducteur mâle de la drosophile) en empêchant la prolifération de ces cellules (Morillo Prado et al., 2012). En effet, en utilisant une souche de drosophile mutante pour le gène *psc* dans les cellules du cyste, Morillo Prado et ses collègues ont vu une augmentation de la division de ces cellules. J'ai donc criblé différentes lignées rapportrices (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) de drosophile pour l'expression de *psc*. J'ai ainsi identifiée une lignée de drosophiles *psc>GFP* exprimant spécifiquement le gène rapporteur dans des cellules de la partie postérieure de l'intestin moyen des drosophiles (**Figure 23A**). Ces cellules possèdent de petits noyaux d'environ 3µm de diamètre (**Figure 23B**). Pour s'assurer que ces cellules sont bien localisées dans l'épithélium intestinal et pas dans le muscle viscéral qui entoure l'intestin basalement (**Figure 23C**), j'ai effectuée des coupes transversales de l'épithélium intestinal des drosophiles *psc>GFP* et j'ai utilisé un marquage phalloïdine (la phalloïdine marque les filaments d'actine qui entourent les cellules intestinales), (**Figure 23D**). Cette expérimentation montre que les cellules PSC+ sont bien situées dans l'épithélium intestinal. De plus, j'ai fait des assemblages en Z sur toute l'épaisseur de l'épithélium intestinal (environ 20µm d'épaisseur) et j'ai pu voir que ces cellules (cette fois-ci marquées par la RFP en utilisant des drosophiles *psc>H2B::RFP*) sont au même niveau que les ISC "classiques" et elles se situent entre 0 et 10 µm de distance en allant de la base de l'épithélium vers la partie apicale, (**Figure 23 E-E''**). Ces expérimentations confirment que les cellules PSC+ sont bien localisées dans l'épithélium intestinal et occupent une position très basale à l'instar des ISC classiques DI+/Esg+.

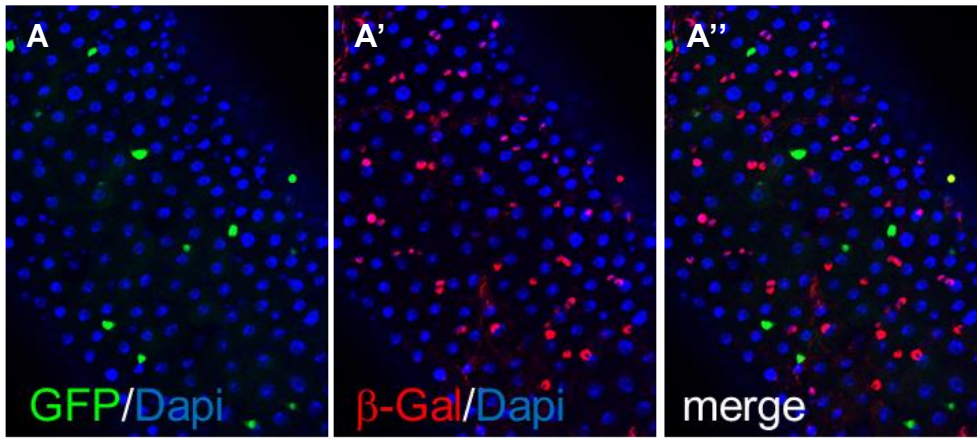
L'étape suivante était de vérifier si ces cellules sont soit une nouvelle population non identifiée ou soit des cellules déjà caractérisées (ee, ISC ou EB) mais exprimant aussi le marqueur PSC. Pour vérifier ces hypothèses, j'ai effectué des croisements entre la souche *psc>GFP* et chacune des souches suivantes: *esg-LacZ* et *su(H)-LacZ*. En utilisant les drosophiles *psc>GFP/esg-LacZ*, j'ai pu montrer que les cellules PSC+ ne sont pas des ISC classiques ni des EB car le marquage PSC (GFP) ne colocalise pas avec les cellules Esg+ (marquage β-Gal en rouge), (**Figure 24A-A''**). Les drosophiles *psc>GFP/Su(H)-LacZ* m'ont permis de confirmer que les cellules PSC+ ne sont pas des EB car elles ne colocalisent pas avec les cellules Su(H)+ (marquage β-Gal en rouge), (**Figure 24B-B''**). En effectuant un marquage anti-Prospero (en rouge) sur des intestins de drosophiles *psc>GFP*, j'ai enfin montré que les ee et les cellules PSC+ sont bien deux populations distinctes (**Figure 24C-C''**).



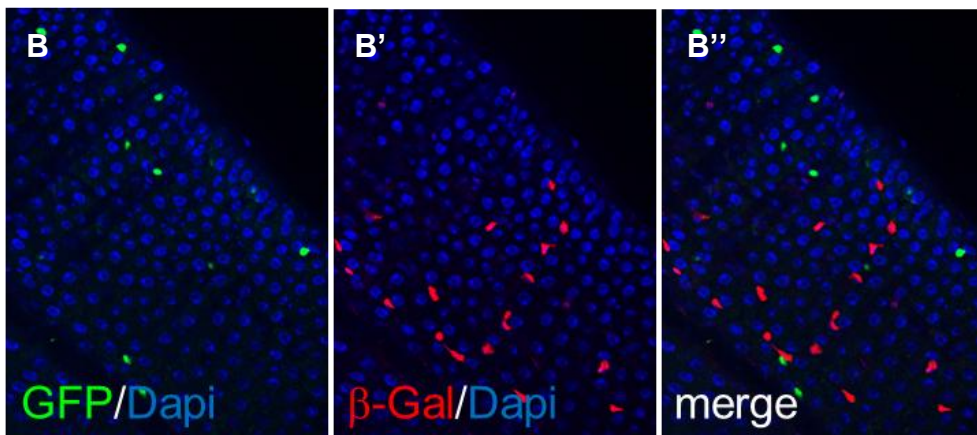
**Figure 23 :** *psc* : un marqueur pour de petites cellules intestinales: **A-** Photo de l'intestin d'une drosophile *psc>GFP* montrant une localisation spécifique des cellules PSC+ dans la partie postérieure de l'intestin moyen. **B-** photo montrant des cellules PSC+, ces cellules avec de petits noyaux. **C-** schéma proposant les deux possibilités de localisation des cellules PSC+ (ronds rouges), soit dans l'épithélium intestinal, soit dans le muscle viscéral qui l'entoure. **D-** photo d'une coupe transversale au niveau de l'intestin d'une drosophile *psc>GFP* montrant la localisation des cellules PSC+ (cellules en GFP indiquées par des flèches vertes). Ces cellules ont une position très basale au niveau de l'épithélium intestinal. Le marquage phalloïdine (en rouge) qui marque les filaments d'actine entourant les cellules a servi à délimiter l'épithélium intestinal. **E-E''**- photos montrant une compilation en Z sur 20µm d'épaisseur (F') d'une zone de l'épithélium intestinal (F) de drosophiles *psc>H2B RFP*. Les cellules PSC+ (en rouge) sont bien localisées dans la partie basale de l'épithélium et elles sont situées dans le même plan que les cellules basales de l'épithélium (F''). Code couleur dans la photo F'' : du rouge au jaune se sont les cellules qui sont de 0 à 10 µm et du vert au bleu se sont les cellules distantes de 10 à 25µm). Les cellules PSC+ sont situées entre 0 et 10µm de la base de l'épithélium.

Sachant que les cellules PSC ont de petits noyaux (d'environ 3µm de diamètre) et sont situées basalement, elles ne peuvent pas donc être des EC (taille de noyaux entre 7 et 8 µm de diamètre). De plus, mes résultats ne peuvent pas être un problème d'efficacité des systèmes utilisés pour marquer les cellules (soit système UAS/GAL4 soit des anticorps dirigés contre un marqueur cellulaire donné) car dans 100% des intestins, je n'ai vu aucune cellule PSC+ qui colocalise avec un des marqueurs intestinaux connus (observations faites sur plus de 50 intestins en total). Toutes ces observations suggèrent fortement l'existence d'un nouveau type cellulaire non caractérisé dans l'épithélium intestinal de la drosophile. La question qui se pose donc maintenant est quel est le rôle de ces cellules ? Sont-elles des cellules prolifératives, des cellules sécrétrices... ?

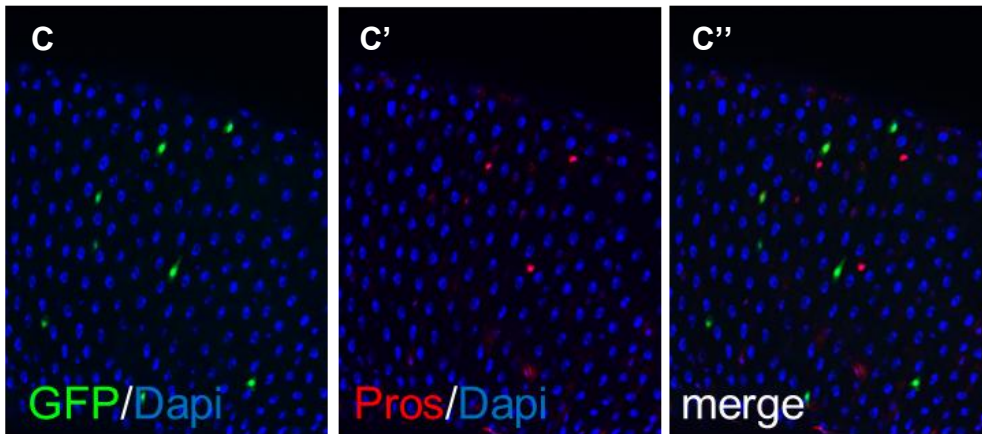
***psc-Gal4>GFP/esg-lacZ***



***psc-Gal4>GFP/Su(H)-lacZ***



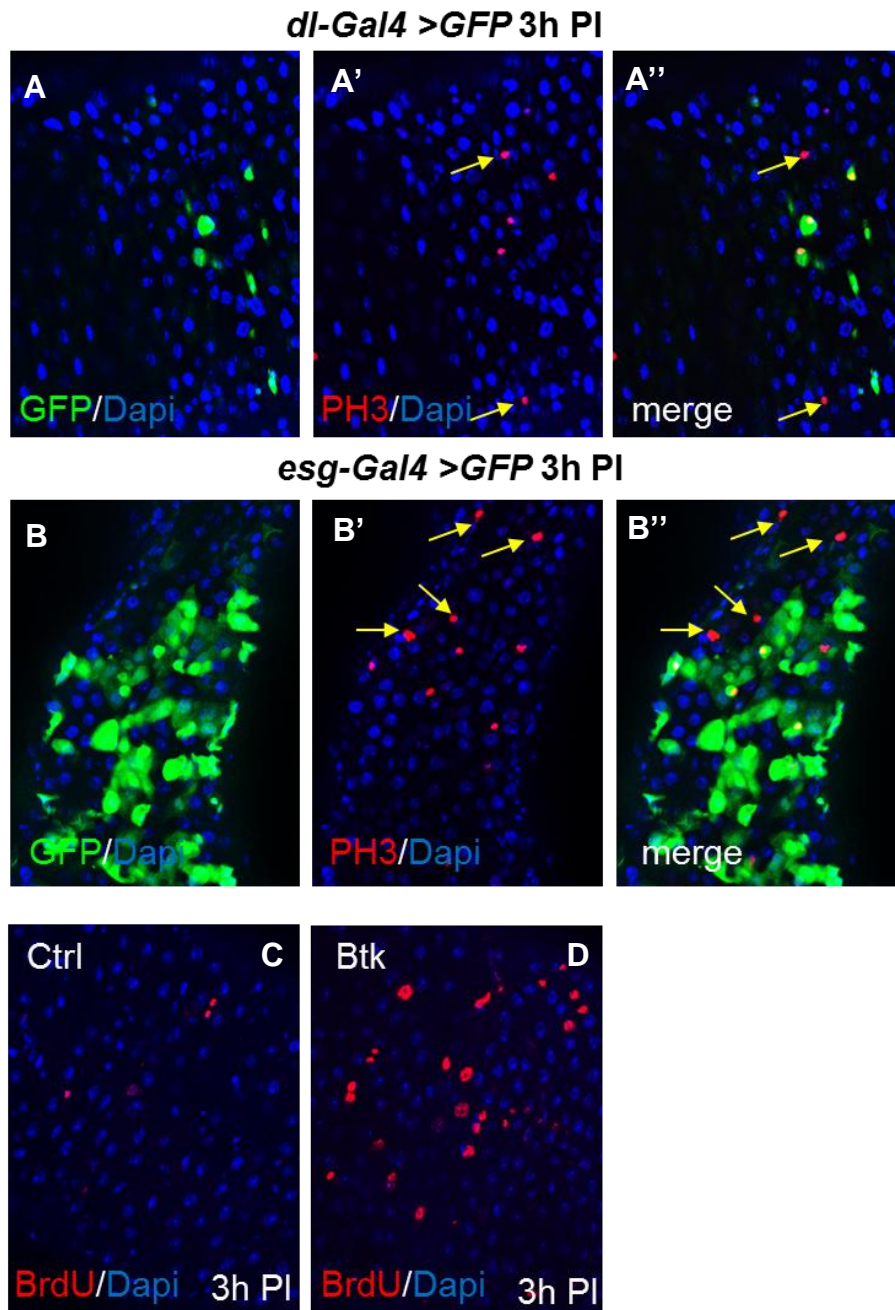
***psc-Gal4>GFP***



**Figure 24** : *psc*, un marqueur pour de petites cellules *esg<sup>-</sup> pros<sup>-</sup>* : A-A''- marquage anti  $\beta$ -Gal (rouge) sur des intestins de drosophiles *psc>GFP/esg-lacZ*. Psc (GFP) ne colocalise pas avec Esg (rouge), (A''). Marquage Dapi en bleu. B-B''- marquage anti  $\beta$ -Gal (rouge) sur des intestins de drosophiles *psc>GFP/Su(H)-lacZ*. Psc (GFP) ne colocalise pas avec Su(H) (rouge), (B''). Marquage Dapi en bleu. C-C''- marquage anti-Prospero (rouge) sur des intestins de drosophiles *psc>GFP*. Psc (GFP) ne colocalise pas avec Prospero, (C''). Marquage Dapi en bleu.

### III-2 Nouvelle population de cellules souches intestinales?

Dans le but d'analyser l'effet d'une ingestion de *Btk* sur l'homéostasie cellulaire intestinale (Loudhaief et al, en révision), j'ai choisi le temps 4h post-ingestion pour commencer les cinétiques de comptage des différentes cellules intestinales (ISC, EB, EC et ee), (données du laboratoire). Fait intéressant, à 4h PI, je n'ai pas vu une augmentation du nombre des ISC, des EB et des ee. Par contre, j'ai observé une augmentation du nombre des EC. Par ailleurs, les différentes études étudiant la cinétique des cellules intestinales suite à une ingestion de fortes doses de bactéries opportunistes ou de pathogènes montrent que l'accélération de la division des ISC commence après 4h PI (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2009). Par contre, étonnamment, Buchon et ses collègues ont observé une augmentation du nombre des EB à 4h PI de fortes doses d'*Ecc* sans pour autant qu'il y ait augmentation préalable de la division des ISC (Buchon et al., 2010). Ils ont expliqué ce résultat par la possibilité d'existence d'un pool caché d'EB qui se mobilise directement suite à un stress intestinal pour remplacer les EC endommagés. Pour expliquer l'augmentation du nombre des EC 4h PI de *Btk*, j'ai décidé de regarder la division des ISC en utilisant le marquage anti-PH3 (le marquage PH3 marque les cellules se divisant pendant la métaphase) avant 4h PI. Deux résultats surprenants ont été observés : le premier résultat est que dans l'épithélium intestinal des drosophiles *dl>GFP* (qui marque les ISC) intoxiquées par *Btk*, j'ai observé quelques cellules  $DI^+$  qui se divisent. Le deuxième résultat, très surprenant, j'ai observé quelques cellules  $DI^- PH3^+$  (**Figure 25A-A''**). En l'état actuel des données, aucune étude n'a signalé la présence de marquage PH3 dans des cellules intestinales autres que les ISC  $DI^+ Esg^+$ . Pour confirmer cette observation, j'ai effectué du marquage anti-PH3 sur des intestins de drosophiles *esg>GFP* 3h PI de *Btk*. Cette expérimentation a donné les mêmes résultats : j'ai observé des cellules  $Esg^+ PH3^+$ , mais aussi quelques cellules  $Esg^- PH3^+$  (**Figure 25B-B''**). De plus, en effectuant un marquage anti-BrdU (le BrdU (5-bromodeoxyuridine) permet de marquer la réplication et l'endoréplication de l'ADN), j'ai observé une rapide incorporation de BrdU par de petites cellules intestinales (au bout de 3h post ingestion de *Btk*), (**Figure 25C et D**). Tous ces résultats suggèrent qu'il existe une première vague de division des cellules souches intestinales qui consiste en une réponse rapide à un stress intestinal. Cette vague de division ne concernerait pas que les ISC classiques qui sont les seules cellules intestinales prolifératives connues dans l'intestin de la Drosophile actuellement, mais à d'autres cellules



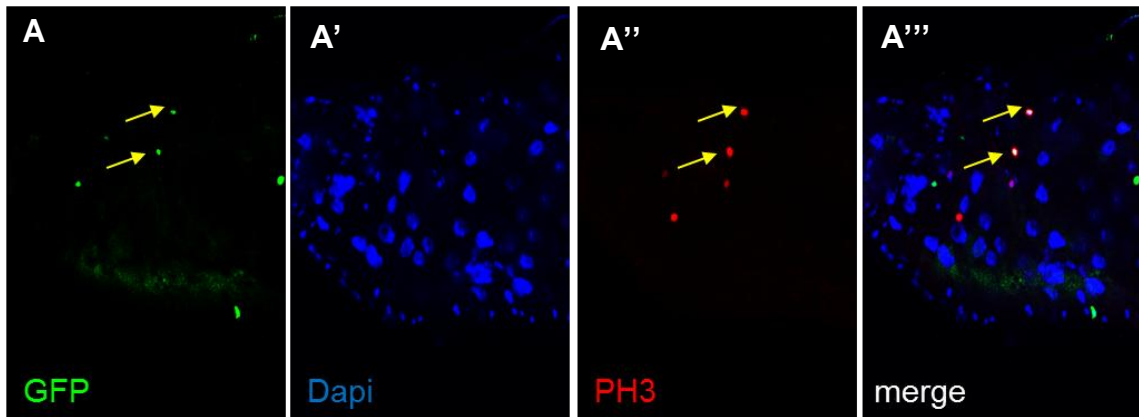
**Figure 25:** division cellulaire à 3h post-ingestion des bactéries: **A-A''**- marquage anti-PH3 (rouge) sur des intestins de drosophiles *dl>GFP* 3h post ingestion de *Btk* ( $10^8$  CFU). Les photos montrent bien deux cellules *DL- PH3+* (indiquées par des flèches jaunes). **B-B''**- marquage anti-PH3 (rouge) sur des intestins de drosophiles *esg>GFP* 3h post ingestion de *Btk* ( $10^8$  CFU). Les photos montrent plusieurs cellules *Esg<sup>-</sup> PH3+* (indiquées par des flèches jaunes). **C et D**- marquage anti-BrdU (rouge) sur des intestins de drosophiles 3h post ingestion de *Btk* ( $10^8$  CFU). Les photos montrent une augmentation de l'incorporation du BrdU par les cellules intestinales des drosophiles qui ont ingéré du *Btk*.

non marquées par DI et par Esg.

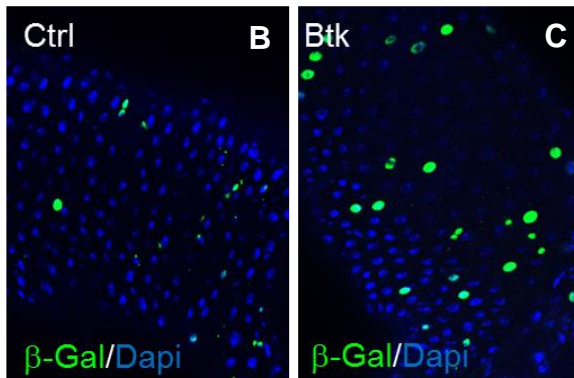
La question qui se pose maintenant est de savoir si ces cellules  $DI^- Esg^- PH3^+$  correspondent aux cellules  $PSC^+$  que j'ai identifiées. Sachant que  $PSC$  est un homologue de  $Bmi1$  chez les mammifères et que  $Bmi1$  est un marqueur de cellules souches intestinales (ISC de Potten), l'étape suivante a été d'examiner la capacité des cellules  $PSC^+$  à proliférer. Chez les mammifères, les cellules souches  $Bmi1^+$  sont quiescentes dans les conditions homéostatiques. Par contre, suite à une agression de la crypte intestinale, ces cellules se divisent activement pour redonner les cellules souches classiques  $Lgr5^+$  (Barker et al., 2012; Tian et al., 2011). J'ai tout d'abord regardé dans des conditions normales si les cellules  $PSC^+$  se divisaient. Malheureusement; je n'ai détecté aucun marquage  $PH3$  dans ces cellules. Que soit chez les mammifères ou chez la drosophile, la prolifération des cellules souches intestinales s'accélère quand l'épithélium est agressé (suite à une ingestion de bactéries par exemple). Pour examiner la capacité des cellules  $PSC^+$  à proliférer, j'ai donc intoxiqué des drosophiles  $psc > GFP$  par du *Btk* et j'ai visualisé la division cellulaire en utilisant le marquage anti- $PH3$ . Pour augmenter la probabilité de voir des cellules en division, j'ai ajouté de la colchicine à la nourriture des drosophiles (la colchicine permet de bloquer la division en métaphase). Résultat très intéressant, bien que cette observation fût rare, j'ai pu voir quelques cellules  $PSC^+$  qui se divisaient (**Figure 26A-A''**). Comment expliquer cette rareté? Si  $PSC$  joue le même rôle dans l'intestin et dans les cystes pour le maintien de l'identité cellule souche (Morillo Prado et al., 2012), la perte du marquage au moment de la division peut expliquer la difficulté de voir des cellules  $PSC^+/PH3^+$ . Il est donc possible à l'instar des cellules souches du cyste, que *psc* soit aussi nécessaire pour garder l'identité « cellule souche » dans l'intestin d'où la perte du marqueur  $PSC$  quand les cellules s'engagent dans la division.

Ce projet de caractérisation des cellules  $PSC^+$  et leurs rôle dans l'épithélium intestinal est en cours mais j'ai obtenu un autre résultat préliminaire qui plaide en faveur de mon hypothèse, c'est-à-dire la capacité proliférative des cellules  $PSC^+$  suite à un stress. En effet, en effectuant une expérimentation de lignage cellulaire (en utilisant des drosophiles  $UAS flp; tubGAL80^{ts}; psc-GAL4/ACT < CD2 < lac-Z$ ), j'ai pu tracer la descendance des cellules  $PSC^+$  (voir méthodologie **Figure 4** et introduction page 43).

*psc-Gal4>GFP* 3h PI with Btk (+colchicine)



*UAS flp;tubGAL80<sup>ts</sup>;psc-GAL4/  
ACT<CD2<lac-Z* 24 PI (29°C)



**Figure 26:** Cellules intestinales *psc*+ et division cellulaire : **A-A'''**- marquage anti-PH3 (rouge) sur des intestins de drosophiles *psc>GFP* 3h post ingestion de *Btk* ( $10^8$  CFU) et de la Colchicine. Les photos montrent bien deux cellules *PSC*+ PH3+ (indiquées par des flèches jaunes). **B et C**- marquage anti- $\beta$ -Gal (vert) sur des intestins de drosophiles *UAS flp;tubGAL80<sup>ts</sup>;psc-GAL4/ACT<CD2<lac-Z* 24h post ingestion de *Btk* ( $10^8$  CFU) (C). (D) Drosophiles contrôles non intoxiquées. Marquage Dapi en bleu. Ces photos montrent une augmentation du nombre des cellules  $\beta$ -GAL+ issues des cellules *PSC*+ suite à l'ingestion de *Btk*.

Le résultat de cette expérimentation montre un marquage  $\beta$ -Gal (en vert) dans de petites et de grandes cellules dans les intestins des drosophiles intoxiquées par *Btk* (**Figure 26C**) alors que dans les drosophiles contrôles (drosophiles sans intoxication) je n'ai vu que de petites cellules marquées à la  $\beta$ -Gal et très rarement de grosses cellules (**Figure 26B**). Cela suggère que les cellules  $PSC^+$  se sont divisées suite à un stress intestinal pour générer les autres types cellulaires de l'intestin. Il faut maintenant vérifier à quels types cellulaires correspond la descendance des cellules  $PSC$ . Pour cela, une batterie de marqueurs et de d'anticorps sont à notre disposition tels anti *Pdm-1* pour marquer les EC, anti-*Dl* pour marquer les ISC et anti-*Prospero* pour marquer les ee.

### III-3 Discussion

Mes résultats suggèrent fortement l'existence d'une nouvelle population de cellules de nature proliférative différente des cellules Esg<sup>+</sup> DI<sup>+</sup>. Ces cellules n'ont pas été identifiées dans les études précédentes probablement à cause de leur rareté (entre 1% et 2% des cellules intestinales), de leur engagement rapide vers la division après la perception du stress (au bout de 3 heures) et de leur probable quiescence. La présence des cellules intestinales Esg<sup>-</sup> DI<sup>-</sup> Prospero<sup>-</sup> a déjà été signalée dans la première étude de Micchelli et Perrimon qui était à l'origine de la découverte des cellules souches intestinales Esg<sup>+</sup> DI<sup>+</sup> (Micchelli and Perrimon, 2006). Toutes les études de prolifération des cellules souches intestinales qui ont suivi la découverte des marqueurs DI et Esg sont basées sur ces deux marqueurs. La détection de marquage PH3 en dehors de ces cellules n'a jamais été signalée. Cela peut être expliqué par le fait que les cellules souches de type PSC<sup>+</sup> ne se divisent qu'en cas de stress et très tôt après sa perception (non détectables 3h après induction du stress). Il est à noter que la plupart des cinétiques de division des cellules souches intestinales commencent au plus tôt 4 heures post stress ce qui expliquerait l'absence de détection de marquage PH3<sup>+</sup> dans des cellules autres que les Esg<sup>+</sup> DI<sup>+</sup> (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2009). En outre, il a déjà été montré que *psc* est requis pour la conservation de l'état « cellule souche » dans les cystes et son expression disparaît au moment de la division (Morillo Prado et al., 2012). De plus, l'analyse *in silico* de l'étude du transcriptome d'intestins de drosophiles intoxiquées ou non par *Ecc* (résultats du laboratoire de Buchon mis en ligne sur le site <http://flygut.epfl.ch/expressions>), révèle une disparition de l'expression de *psc* à 4h PI d'*Ecc*. Ceci vient étayer notre hypothèse sur la disparition de l'expression de *psc* lorsque que ces cellules rentrent en division. De plus, *psc* ne s'exprimant que dans une population minoritaire de cellules souches intestinales localisée dans la partie postérieure de l'intestin moyen, cela augmente la difficulté pour le détecter lors d'un crible de marqueur comme l'a fait initialement Micchelli et Perrimon (2006). Nous avons aussi eu des difficultés à trouver un bon gène rapporteur pour ces cellules. En effet, j'ai criblé plusieurs lignées de drosophiles *psc>GFP* pour arriver à trouver une lignée où l'expression de la GFP est assez forte pour pouvoir visualiser ces cellules. J'ai testé aussi l'anticorps anti-PSC (6E8 du Developmental Studies Hybridoma Bank) mais je n'ai détecté aucun marquage. Fait intéressant, chez les mammifères, les ISC Bmi1<sup>+</sup> représentent aussi une

sous population des cellules ISC de Potten et elles sont localisées spécifiquement dans la partie proximale de l'intestin (Barker et al., 2012).

L'étape suivante est d'identifier le type cellulaire correspondant à la descendance de ces cellules après division. Chez les mammifères, les cellules Bmi1+ sont relativement quiescentes et sont connues par leur capacité à redonner les cellules souches Lgr5+ en cas de stress (Barker et al., 2012; Buczacki et al., 2013). Une étude très intéressante faite par Tian et ses collègues (Tian et al., 2011) a mis en évidence la capacité des cellules ISC Bmi1+ à redonner directement les différents types cellulaires intestinaux (suite à une ablation des cellules Lgr5+) sans passer par l'étape ISC Lgr5+. Par analogie avec les cellules Bmi1+ des mammifères, plusieurs possibilités sont donc envisageables pour les cellules intestinales PSC+ de la drosophile: ces cellules peuvent ainsi donner naissance à d'autres cellules souches de type DI+ mais peuvent aussi donner naissance à des EB qui se différencieront en EE ou EC. Pour vérifier cette hypothèse, il est possible de tuer spécifiquement les ISC DI+ et voir si elles sont capables de réapparaître au moins dans la partie postérieure de l'intestin moyen. J'ai aussi débuté une étude de lignage cellulaire des cellules PSC+ après induction d'un stress. Mes résultats préliminaires suggèrent qu'elles sont capables de redonner des EC (**Figure 26**). Mais ceci n'exclut pas le fait que les cellules PSC+ puissent aussi redonner des cellules DI+. Plus d'expérimentations seront nécessaires pour répondre à cette question. Un moyen pour connaître précisément la fonction des cellules PSC+ dans l'intestin est de les tuer et d'en étudier les conséquences en absence et en présence d'un stress intestinal. Nous avons déjà construits plusieurs outils génétiques pour mettre en place ces expérimentations. Il est à noter qu'une étude chinoise (Lu and Li, 2015) a montré que suite à une ablation totale des cellules Esg+, ces cellules ne sont pas capables de réapparaître même après l'ingestion du DSS (Dextran Sulfate Sodium, un fort agresseur des cellules intestinales induisant une forte apoptose). De plus, les drosophiles sont capables de vivre jusqu'à 60 jours sans prolifération cellulaire même suite à un fort stress intestinal (Lu and Li, 2015). Les résultats de cette étude sont un peu surprenants car la prolifération cellulaire intestinale est primordiale pour maintenir l'intégrité de l'épithélium suite à un stress (Apidianakis et al., 2009; Buchon et al., 2009b; Chatterjee and Ip, 2009; Codelia et al., 2014; Cordero et al., 2012; Jiang et al., 2009, 2016; Karpowicz et al., 2010; Staley and Irvine, 2010; Vriza et al., 2014). En effet, en absence de prolifération des cellules souches et donc de remplacement cellulaires, les drosophiles meurent rapidement. Les résultats étonnants de Lu and Li pourraient être expliqués par la capacité des cellules PSC+ à compenser l'absence des ISC DI+ et ainsi permettre à l'épithélium intestinal d'être renouvelé.

Dans une étude très intéressante, Buchon et ses collègues (Buchon et al., 2010), ont montré une augmentation du nombre d'EB 4h post ingestion de la bactérie *Ecc* sans qu'il y ait pour autant augmentation préalable du nombre des ISC. Les auteurs ont invoqués l'existence d'un « pool caché d'EB » qui se mobilise suite à la perception du stress par l'intestin (Buchon et al., 2010). Une hypothèse possible pour ce résultat serait en fait que ce pool caché d'EB provienne de la division préalable des cellules PSC+. La difficulté et la rareté des cellules souches PSC+, ont fait qu'ils ne les ont sans doute pas détectées dans leur étude.

La découverte des cellules intestinales PSC+ qui sont probablement dotées d'une capacité proliférative suggère l'existence d'une nouvelle population de cellules souches intestinales différente des cellules souches classiques (les ISC). Pour bien caractériser ces cellules et confirmer leur rôle dans l'épithélium intestinal, plusieurs expérimentations sont à faire: confirmer la capacité des cellules PSC+ à se diviser, traçage et caractérisation de la descendance de ces cellules si on confirme qu'elles se divisent, tuer les ISC classiques et examiner la possibilité de leur réapparition....



## Partie III: Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier l'impact de l'ingestion des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (*Btk*) sur la physiologie intestinale de la drosophile. Mes résultats montrent qu'une seule ingestion de *Btk* (que ce soit sous forme de sporanges ou de bactéries) aux doses d'épandage est suffisante pour perturber transitoirement l'homéostasie intestinale de la drosophile. Dans un premier temps, j'ai montré que les bactéries *Btk* ingérées à des faibles doses stimulent le renouvellement cellulaire intestinal (suite à l'activation des voies de signalisation JNK et JAK/STAT) malgré qu'elles soient incapables d'induire la mort des entérocytes. Ce renouvellement a conduit à une accumulation excessive des entérocytes accompagnée d'une réduction de certaines fonctions digestives (réduction de l'activité protéasique et réduction de l'absorption des lipides par les entérocytes). Cette perturbation de l'homéostasie cellulaire intestinale reste transitoire. En effet, le surplus des entérocytes est éliminé par une vague d'apoptose qui s'étale entre le deuxième jour et le quatrième jour post-ingestion de *Btk*. Ce déclenchement d'apoptose semble être lié à une activation de la voie de signalisation Hippo dans les cellules destinées à mourir, plus spécifiquement, dans les vieux entérocytes. L'intestin rétablit complètement son homéostasie au bout de cinq jours.

Bien que l'impact d'une seule ingestion de la bactérie *Btk* à la dose d'épandage puisse être surmonté par la capacité de défense et de régénération de l'épithélium intestinal, j'ai pu montrer qu'une ingestion répétée de *Btk* est capable de compromettre la santé des drosophiles conduisant à la réduction de leur longévité probablement suite au déclenchement d'une inflammation intestinale chronique. La drosophile est un excellent modèle pour étudier les infections intestinales et les pathologies intestinales humaines (Apidianakis and Rahme, 2011). En effet, les processus de l'inflammation intestinale qui se déclenchent suite à l'ingestion de bactéries allochtones chez la drosophile, font appel aux mêmes voies de signalisations cellulaires impliquées dans l'inflammation intestinale chez les mammifères (Apidianakis and Rahme, 2011). Il est à noter que les voies de signalisation (JNK, JAK/SAT et Hippo), impliquées dans l'inflammation de l'intestin de la drosophile suite à l'ingestion de *Btk*, sont conservées chez les mammifères et sont malheureusement toutes impliquées dans les maladies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn et dans l'apparition, le développement ou la propagation de nombreux cancers intestinaux (Garrett et al., 2010). De

plus, il est de plus en plus admis que la présence de pathogènes dans le tube digestif des mammifères peut soit provoquer l'apparition de tumeurs soit exacerber leur développement (Garrett et al., 2010). En tenant compte de toutes ces données, il sera nécessaire d'examiner chez des modèles de mammifères la possibilité d'induction d'une inflammation intestinale suite à l'ingestion de bactéries *Btk*.

Les bioinsecticides *Btk* sont commercialisés sous forme d'un mélange de sporanges. J'ai pu montrer que l'ingestion des sporanges *Btk* aux doses d'épandage est aussi capable d'induire une inflammation intestinale. Les sporanges *Btk* ne produisant pas de toxines Cry utilisés comme contrôle induisent les effets similaires à ceux observés suite à l'ingestion des bactéries *Btk* (induction de la prolifération des ISC et accumulation transitoire des entérocytes et une réduction de la longévité suite à une ingestion répétée des sporanges). Sachant que les sporanges *Btk* sont capables de germer dans l'intestin pour redonner la forme végétative, il est possible donc que ces effets observés soient dus aux bactéries *Btk*. Une fois ingérés, les sporanges *Btk* produisant les toxines Cry (produit commercial Dipel®) induisent une forte apoptose des entérocytes et stimulent la prolifération des cellules souches intestinales. De plus, j'ai observé une augmentation très significative du nombre des cellules entéro-endocrines. La mort des entérocytes et l'accumulation des cellules entéro-endocrines semblent être liés à la présence des toxines Cry car l'ingestion des toxines Cry purifiées est suffisante pour induire ces effets. Le choix de différenciation des entéroblastes est gouverné principalement par la voie Notch, quand le niveau d'activation de Notch est faible, les entéroblastes se différencient principalement en cellules entéro-endocrines (Beebe et al., 2010; Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007; Perdigoto and Bardin, 2013). Une forte activation de Notch nécessite un contact prolongé du récepteur Notch avec son Ligand transmembranaire Delta (Maeda et al., 2008). Les cadhérines épithéliales sont requises pour le prolongement du contact Notch/Delta. Sachant que chez les espèces cibles, les toxines Cry se fixent sur les cadhérines épithéliales intestinales et que ces cadhérines sont conservées chez les métazoaires, il est possible que la fixation des toxines Cry sur les cadhérines intestinales de la drosophile perturbe la signalisation Notch/Delta d'où l'augmentation du nombre des cellules entéro-endocrines. Il est à noter que chez des drosophiles produisant constitutivement la toxine Cry1Ab (une des six toxines Cry produites par Dipel®) dans le disque imaginal de l'aile (drosophiles *sd-GAL4/UAS-cry1Ab*), un phénotype associé à des effets sur la voie de signalisation Notch a été observé dans les ailes (résultats du laboratoire). Ce résultat renforce l'hypothèse d'un effet des toxines Cry produites par *Btk* sur la signalisation Notch/Delta.

En plus de ses effets sur les drosophiles adultes, les résultats du laboratoire montrent un effet du bioinsecticide Dipel® sur les larves de *Drosophila melanogaster* en induisant une forte mortalité des larves L1 à une dose 10 fois plus importante que la dose d'épandage et un retard du développement des larves aux doses d'épandage (Données du laboratoire en collaboration avec l'équipe ESIM (Evolution et Spécificité des Interactions Multitrophiques), ISA Sophia Antipolis, article en préparation). Ces impacts de Dipel® ne concernent pas que l'espèce *Drosophila melanogaster*, mais il est reproduit sur plusieurs autres espèces du genre *Drosophila* entre autre le ravageur des cultures fruitières *Drosophila suzukii* (Données du laboratoire en collaboration avec l'équipe ESIM, article en préparation et (Cossentine et al., 2016). De plus, une observation intrigante chez des souris nourries par des sporanges *Btk*, a montré une inflammation au niveau de l'épithélium intestinal des animaux traités (observation signalée au cours d'une collaboration faite avec l'équipe de Valérie Julia à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire à Sophia Antipolis)). Par contre, une autre collaboration avec l'équipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines à Toulouse utilisant le porc comme modèle, n'a pas montré des effets sur les voies de signalisation inflammatoires des explants intestinaux de porc incubés avec le bioinsecticide Dipel®. Les difficultés techniques comme le temps d'incubation qui ne peut pas dépasser 8h limitent les possibilités d'examiner l'effet d'une exposition prolongée subchronique ou chronique) à ce bioinsecticide.

Sachant que les bioinsecticides vont être de plus en plus répandus dans la nature, et en se basant sur tous les résultats résumés ci-dessus, il est nécessaire d'examiner les effets des bioinsecticides *Btk* sur l'environnement et sur la santé humaine en approfondissant les recherches avec le modèle *Drosophila melanogaster*, en utilisant d'autres modèles de laboratoire comme la souris, le poisson zèbre, des cultures cellulaires humaines...Cela permettra par la suite d'aller directement chercher les effets observés chez les modèles, chez différentes espèces au moins des zones traitées par les bioinsecticides *Btk*. Ces analyses permettront aussi de prendre des mesures préventives sur l'utilisation des ces bioinsecticides vis à vis des utilisateurs ainsi que des mesures d'information pour les consommateurs.

En plus de l'étude des effets des bioinsecticides *Btk* sur la physiologie intestinale de la drosophile, mes travaux de thèse m'ont aussi permis d'apporter de nouvelles connaissances fondamentales sur la régulation de la réponse intestinale à un stress bactérien. J'ai pu montrer que l'épithélium intestinal réagit différemment selon le niveau de stress perçu par les cellules. Une faible dose de bactéries opportunistes peut stimuler le renouvellement cellulaire sans qu'il y ait apoptose d'entérocytes. Cette prolifération est JNK-dépendante mais apoptose-indépendante. Cette observation diffère du modèle de "mort cellulaire régénératrice"

préalablement caractérisée par de nombreux travaux et qui lie la prolifération cellulaire (JNK-dépendante) à l'apoptose induite par des bactéries pathogènes ou de fortes doses de bactéries opportunistes. De plus, j'ai pu montrer qu'une activation modérée de la voie de signalisation JNK assure une cytoprotection des entérocytes contre les agressions bactériennes. Ce nouveau rôle caractérisé vient s'ajouter au rôle pro-apoptique joué par cette voie quand l'agression intestinale est très forte. Pour expliquer la diversité des rôles assurés par la voie JNK, on peut imaginer que JNK joue un rôle de "gardien" de l'épithélium intestinal: quand le stress est modéré, JNK s'engage dans la protection des entérocytes et quand le stress dépasse les capacités cytoprotectrices de JNK, ce dernier s'active fortement dans les entérocytes agressés pour les engager dans l'apoptose et induire la mort cellulaire régénératrice. Cela permet un remplacement rapide des entérocytes endommagés tout en protégeant l'intégrité de l'épithélium intestinal.

Enfin, mes travaux de recherche m'ont permis d'identifier un nouveau type de cellules dans l'intestin moyen de la drosophile. Ces cellules sont marquées par PSC et sont fort probablement des cellules prolifératives. PSC est l'orthologue de Bmi1 chez les mammifères. Bmi1 marque une sous population de cellules souches intestinales quiescentes qui s'engagent dans la division suite à une agression de la crypte intestinale des mammifères pour redonner les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. Mes résultats préliminaires suggèrent que les cellules PSC+ pourraient être l'équivalent fonctionnel des cellules Bmi1+ des mammifères. Ainsi se manifeste la puissance du modèle *Drosophila melanogaster* grâce aux outils génétiques disponibles permettant de caractériser ces cellules et étudier leurs fonctions et les voies de signalisations qui les contrôlent. Sachant que les mécanismes et les voies de signalisation aboutissant à la sortie des cellules souches Bmi1+ de l'état quiescent à l'état prolifératif ne sont pas encore bien caractérisés chez les mammifères, les recherches menées sur la drosophile pourront ainsi apporter des éléments de réponse sur la régulation de la prolifération et les fonctions précises de ces cellules.

# Annexe

# I- Protocole de culture bactérienne

Une colonie de bactéries est mise en pré-culture dans 10 ml de LB durant la journée dans un incubateur/agitateur à 30°C à 200/220 rotation par minute (rpm). Quand la pré-culture devient trouble, on ajoute à 50 ml de LB, 50 µl de la pré-culture (dans un Erlen de 100 ou 200 ml). La culture se fait durant la nuit dans un agitateur/incubateur à 30°C à 200 rpm. La culture de la bactérie *Lactobacillus plantarum* se fait en anaérobie dans le milieu MRS et l'incubation se fait à 37°C sans agitation. La densité optique (DO) de la culture bactérienne est ensuite mesurée au 1/5<sup>ème</sup> (200 µl de culture + 800 µl LB). Une DO fiable est située entre 0,2 et 0,8. Selon les bactéries, les densités optiques nécessaires pour arriver à déposer 10<sup>6</sup> CFU/drosophile ou 10<sup>7</sup> CFU/drosophile sont résumées dans le tableau suivant :

bactérie	Volume à déposer sur le milieu	DO	CFU par tube (pour 10 drosophiles)	CFU par drosophile
<i>Pseudomonas entomophila</i>	50µl	6,0	1,25.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>
<i>Erwinia Ecc GFP</i>	50 µl	9,6	1,25.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>
<i>Erwinia carotovora</i>	50 µl	2,6	1,25.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>
<i>Erwinia carotovora</i>	50 µl	267	1,25.10 <sup>9</sup>	1,25.10 <sup>8</sup>
<i>Btk</i>	50 µl	0,9	1,25.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>
<i>Btk</i>	50 µl	200	2,5.10 <sup>9</sup>	2,5.10 <sup>8</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50 µl	0,3	1,25.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>

Dans nos calculs, la DO souhaitée est multipliée par 2 pour qu'on puisse ajouter du sucrose à 10% à la préparation finale des bactéries (50% culture bactérienne/50% sucrose à 10%).

## II- Protocole de production de sporanges de

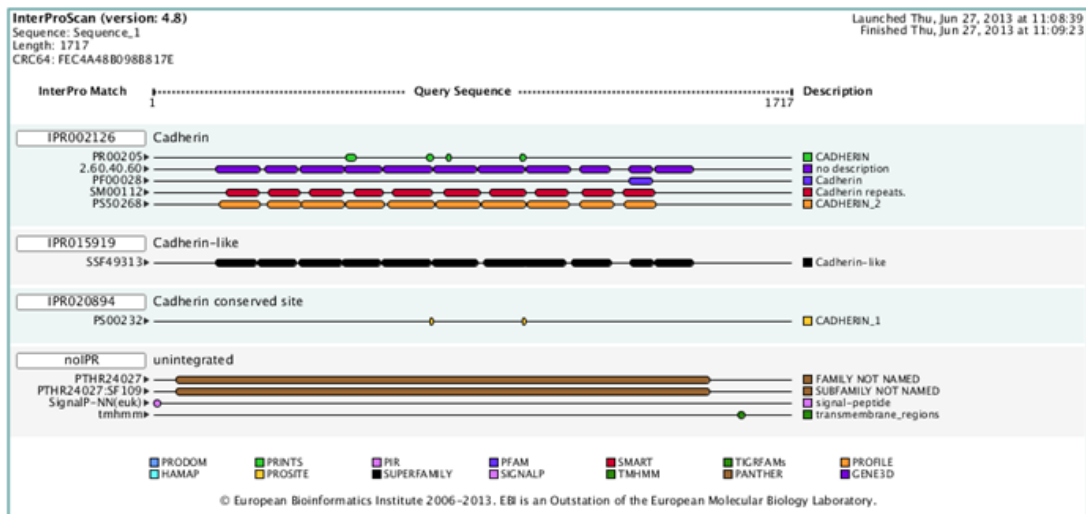
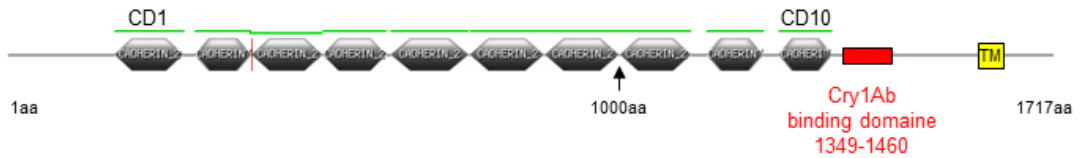
### *Btk*

J'ai utilisé systématiquement deux sources de *Btk* : la formulation bioinsecticide commerciale (Dipel®) achetée dans les coopératives agricoles et la préparation « maison » (*Btk* ne produisant pas de toxines Cry appelée aussi 4D22) produite au laboratoire BES. La souche 4D22 est fournie par le Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) ([www.bgsc.org](http://www.bgsc.org)). La production des sporanges 4D22 se fait suivant le protocole suivant :

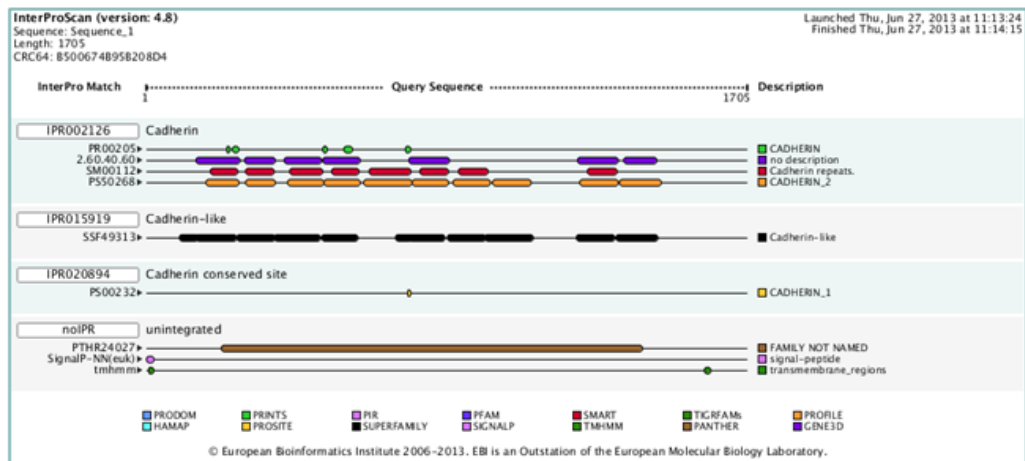
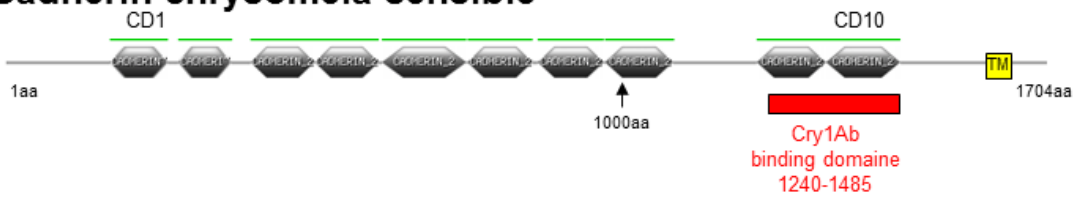
Brièvement, 1ml d'une pré-culture de *Btk* est utilisé pour inoculer 500 ml de milieu PGSM, puis la culture est mise à sporuler pendant 5 jours à 30°C. La présence de sporanges et de cristaux est contrôlée au microscope. Après 5 jours de croissance, 80-90% des bactéries ont sporulé (équivalent au pourcentage trouvé après remise en suspension de Dipel®). Les bactéries végétatives sont tuées par chauffage à 70°C pendant 20 min, et les sporanges culottées à 3700 g, lavées 3 fois avec de l'eau stérile puis lyophilisées pendant 30 h. Le stock est conservé à -20°C. Les CFU par mg sont ensuite calculées afin de normaliser nos expériences entre les produits commerciaux et les préparations « maison ».

# III- Site de fixation de Cry1Ab : analyse de l'homologie de séquence

## cadherin-related protein receptor BT-R1 [*Manduca sexta*]



## Cadherin chrysomela sensible



**Cadherin-related protein receptor BT-R1 [Manduca sexta]**



**Cadherin chrysomela sensible**



Identity: 24%  
Similarity: 41%

**Cad88C Drosophila melanogaster**



30% (45%) et 31% (59%) d'identité avec le Cry1Ab binding domaine de chrysomèle et de Manduca sexta respectivement

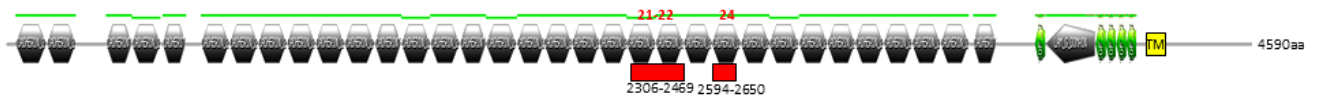
**FAT Drosophila melanogaster**



25% (41%) identité avec le Cry1Ab binding domaine chez Manduca sexta

26% (44%) d'identité avec le Cry1Ab binding domaine chez chrysomèle

**FAT Human**



26% (43%) identité avec le Cry1Ab binding domaine chez chrysomèle

29% (42%) identité avec le Cry1Ab binding domaine chez Manduca sexta

## **IV- Revue 2: Loudhaief and Gallet**

Revue 2: *"Enteroendocrine cells, a potential therapeutic way to control intestinal stem cell proliferation"*. (Sous presse à International Journal of Stem Cell Research & Therapy)

Loudhaief Rihab and Gallet Armel



## Enteroendocrine Cells, A Potential Way to Control Intestinal Stem Cell Proliferation

**Rihab Loudhaief and Armel Gallet\***

*Institut Sophia Agrobiotech, France*

\*Corresponding author: Armel Gallet, Institut Sophia Agrobiotech, UMR INRA 1355/CNRS 7254/UNS, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France, Fax: 33 (0)4 92 38 65 87, E-mail: [gallet@unice.fr](mailto:gallet@unice.fr)

### Perspective

Organisms are subjected during their lifespan to many environmental stresses such as starvation, temperature variations, chemicals, pathogens, injuries... In order to overcome the incoming stress and to yield an adapted answer, organisms have developed throughout evolution robust and conserved mechanisms such as immune response and tissue regeneration helping at maintaining their physiological equilibrium, i.e. their homeostasis. However, the maintenance of the homeostasis can be compromised in certain cases. For example, aging is characterized by an overall decline in tissue homeostasis maintenance with reduced immune function and tissue regeneration capacities and with increased baseline inflammation [1]. Homeostasis can also be disrupted upon chronic or prolonged exposure to toxic or pathogens that can cause damages to organs and tissues [2]. Another example where the homeostasis can be broken down is the predisposition of individuals harboring “silent” mutations to develop pathologies. Under stress conditions, an apparent healthy individual can indeed develop inflammatory diseases, autoimmune syndrome or cancers [3].

The digestive tract is an organ in direct contact with the external milieu facing many xenobiotics or pathogens swallowed along with the food that can harm the mucosa. In the intestine, the replacement of damaged cells relies on intestinal stem cells (ISCs) that divide to give birth to progenitor cells that subsequently differentiate to replenish the gut lining. While under normal condition the intestine is completely renewed in more or less than 2 weeks whether in mouse [4-6] or in *Drosophila melanogaster* [7,8], upon damages ISC division is accelerated (there is a switch from routine division to proliferation) and the gut is renewed in a couple of days [2]. Many signaling pathways involved in the control of ISC division/proliferation have been identified since the last decade [9,10]). Most of these signals are locally produced (referred to the stem cell niche), coming from neighboring cells such as Paneth cells or surrounding tissues such as the underlying mesenchyme/visceral mesoderm [9-12]. The production of these signals is modulated according to the (local or systemic) need at any given time, allowing the adaptation of ISC division/proliferation to environmental cues [2,13]. This process must be tightly regulated otherwise an uncontrolled ISC proliferation results in overgrowth that can lead to tumor occurrence in the case where ISCs bear a pro-oncogenic mutation.

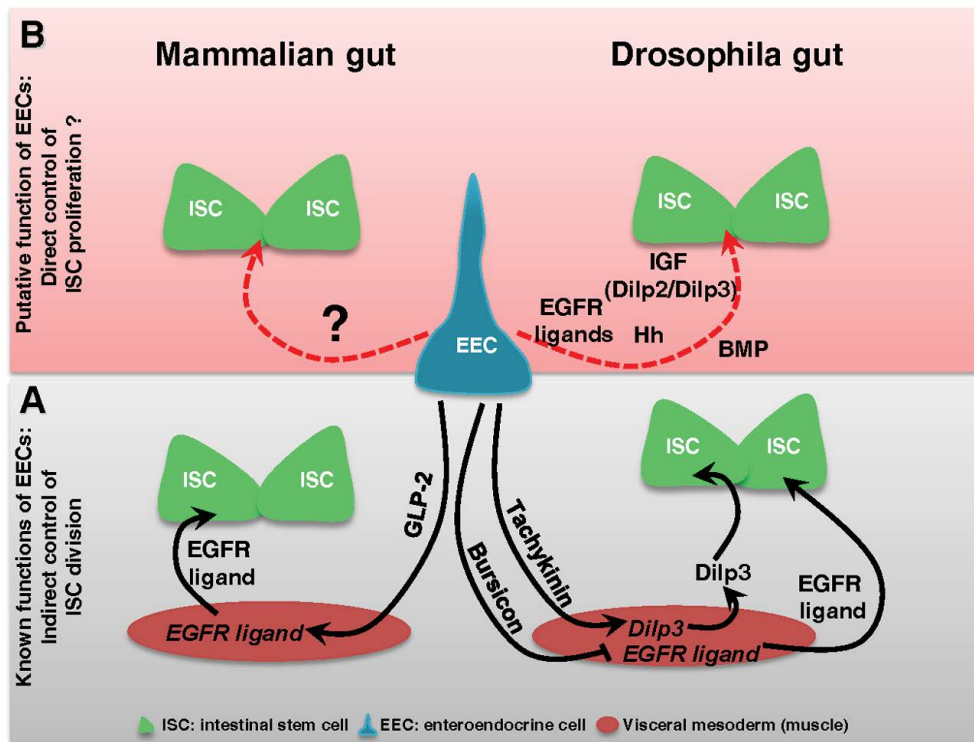
The enteroendocrine cells (EECs) are secreting cells scattered and interspaced between enterocytes in the gut lining. EECs have long been known to make the link between the nutrient content of the gut and the brain by secreting enteroendocrine peptides that regulate digestive functions and nutritional behavior [14]. More recently, EECs have also been implicated in the local immune response by producing cytokines and anti-microbial peptides [15-18]. EECs are not yet considered as being part of the ISC niche although these cells are indirectly implicated in the control of ISC division (Figure 1A). Indeed it was previously demonstrated that EECs may influence ISC proliferation by secreting peptides regulating the production of growth factors by the niche. In *Drosophila* it has been shown that the enteroendocrine peptide Tachykinin (ortholog to TAC in mammals) locally secreted by EECs induced the production of Dilp3 (a *Drosophila* Insulin-like Growth Factors) by the visceral mesoderm [19]. Then Dilp3 promotes ISC proliferation to adapt the growth of the gut to the nutrient availability (Figure 1A) [10]. Still in *Drosophila*, Scopelliti and colleagues [20] have shown that the enteroendocrine hormone Bursicon produced by EECs is able to constrain ISC division by repressing, in the visceral mesoderm, the expression of the EGF growth factor Vein (Figure 1A). Noteworthy, the Bursicon receptor DLGR2 is the mammalian ortholog of LGR4-6. In mammals, the Glucagon like peptide-2 (GLP-2) secreted by the EECs acts on underlying myofibroblasts to induce the secretion of EGFR/ErBB ligands that further bind receptors in ISCs to stimulate their proliferation (Figure 1A) [21-23]. These data highlight that EECs can act as local regulators of ISC division/proliferation through modulation of the stem cell niche activity in both *Drosophila* and mice.

In a recent beautiful transcriptomic analysis *in vivo* in *Drosophila melanogaster*, Dutta and Colleagues identified 453 genes that were differentially expressed in EECs upon ingestion of the strong pathogen *Pseudomonas entomophila* [16]. Among these 453 genes not all are involved in the regulation of the digestive functions, the immune response or paracrine control of the expression of growth factors by the visceral mesoderm. Indeed after our own reading of the data they have released on line (<http://flygutseq.buchonlab.com/resources>), we found that several genes encoding for secreted factors directly implicated in the control of the ISC proliferation are modulated. In this list of genes, we noticed two Insulin-like Growth Factors (Dilp2 and Dilp3) known to control cell proliferation in many tissues in mammals [24]. In *Drosophila*, both were already known to control ISC proliferation according to the nutrient availability.

**Citation:** Loudhaief R, Gallet A (2016) Enteroendocrine Cells, A Potential Way to Control Intestinal Stem Cell Proliferation. Int J Stem Cell Res Ther 3:037

**Received:** May 27, 2016; **Accepted:** June 26, 2016; **Published:** June 30, 2016

**Copyright:** © 2016 Loudhaief R, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



**Figure 1:** Enteroendocrine cells and regulation of intestinal stem cell division.

(A) Scheme summarizing the known functions of EECs in the control of ISC division in mammalian and *Drosophila* guts. The control is indirect and is mediated by the Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) in mammals and by the enteroendocrine hormones Tachykinin and Bursicon in *Drosophila*; (B) Scheme underlying the putative more direct role of EECs in the control of ISC proliferation upon damages.

Dilp2 is normally released by the central nervous system into the circulation while Dilp3 is locally produced by the visceral mesoderm [10]. We also noticed an increased expression of two EGFR ligands (Keren and Spitz), two IL-6 cytokines orthologs (Upd2 and Upd3), the conserved growth factor Hedgehog (Hh), and two BMP ligands (Dpp and Gbb) (Figure 1B). Whereas EGFR, IL-6/JAK/STAT and Hh signaling pathways positively control ISC division, BMP signaling has a versatile function by either activating or inhibiting ISC division depending of the ligands involved. All these growth factors and cytokines are provided by the niche and they bind to their respective receptors at the surface of ISCs to control their division/proliferation in both vertebrates and *Drosophila*. Their production is generally increased upon damages to accelerate gut lining regeneration [2,9,10]. Therefore, a potential production of those different factors by EECs [16] can give to these cells an additional important role to maintain gut homeostasis, this time by sending signals directly controlling the behavior of ISCs (Figure 1B). Nevertheless, it will be necessary to investigate whether the production of these factors by EECs is playing a significant role in the control of ISC division before to conclude anything. Because of the high degree of conservation between *Drosophila* and mammals with respect to the signaling pathways that control ISC division, *Drosophila* midgut is a suitable model for such an investigation. It is indeed easy to invalidate each candidate in EECs and to assess impacts on ISC division/proliferation at steady state or upon damages. Many investigations in mammals will be also necessary before to definitively unravel the roles of EECs in the control of ISC behavior.

These axes of investigations will probably help at designing cancer therapies specifically targeting EECs. In this perspective, it should be noted that because of the primary role of EECs in the digestive functions, it will be of utmost importance to investigate the relationship between the diet and production of these growth factors by the EECs. Also, identifying which types, where and how EECs control the production of growth factors regulating ISC behavior is essential because of the complexity of the intestine physiology.

## References

- Jasper H (2015) Exploring the physiology and pathology of aging in the intestine of *Drosophila melanogaster*. *Invertebr Reprod Dev* 59: 51-58.
- Bonfimi A, Liu X, Buchon N (2016) From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Dev Comp Immunol* 64: 22-38.
- Sun G, Irvine KD (2011) Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* 350: 139-151.
- Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020.
- Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD, Winton DJ (2010) Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* 330: 822-825.
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, et al. (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143: 134-144.
- Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, et al. (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137: 1343-1355.
- Antonello ZA, Reiff T, Ballesta-Illan E, Dominguez M (2015) Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch. *EMBO J* 34: 2025-2041.
- Vanuytsel T, Senger S, Fasano A, Shea-Donohue T (2013) Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2410-2426.
- Pasco MY, Loudhaief R, Gallet A (2015) The cellular homeostasis of the gut: what the *Drosophila* model points out. *Histol Histopathol* 30: 277-292.
- Biswas S, Davis H, Irshad S, Sandberg T, Worthley D, et al. (2015) Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. *J Pathol* 237: 135-145.
- Saillaja BS, He XC, Li L (2016) Regulatory niche in intestinal stem cells. *J Physiol*.
- Peterson LW, Artis D (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14: 141-153.
- Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B (2016) Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil* 28: 620-630.
- Psichas A, Reimann F, Gribble FM (2015) Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest* 125: 908-917.

16. Dutta D, Dobson AJ, Houtz PL, Gläßer C, Revah J, et al. (2015) Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Rep* 12: 346-358.
17. Park JH, Chen J, Jang S, Ahn TJ, Kang K, et al. (2016) A subset of enteroendocrine cells is activated by amino acids in the *Drosophila* midgut. *FEBS Lett* 590: 493-500.
18. Katherine Beebe, Dongkook Park, Paul H. Taghert, Craig A. Micchelli (2015) The *Drosophila* Prosecretory Transcription Factor dimmed Is Dynamically Regulated in Adult Enteroendocrine Cells and Protects Against Gram-Negative Infection. *G3 (Bethesda)* 5: 1517-1524.
19. Amcheslavsky A, Song W, Li Q, Nie Y, Bragatto I, et al. (2014) Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Rep* 9: 32-39.
20. Scopelliti A, Cordero JB, Diao F, Strathdee K, White BH, et al. (2014) Local control of intestinal stem cell homeostasis by enteroendocrine cells in the adult *Drosophila* midgut. *Curr Biol* 24: 1199-1211.
21. Rowland KJ, Brubaker PL (2011) The "cryptic" mechanism of action of glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G1-8.
22. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, Bravo DM, Callaghan B (2013) The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 729-740.
23. Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, et al. (2012) Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol* 14: 401-408.
24. Weroha SJ, Haluska P (2012) The insulin-like growth factor system in cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41: 335-350.



# Références bibliographiques

- Amcheslavsky, A., and Ip, Y.T. (2008). *Drosophila* as a Model for Intestinal Diseases. *28*, 187–192.
- Amichot, M., and Wajnberg, E. (2016). Side effects of *Bacillus thuringiensis* var . *kurstaki* on the hymenopterous parasitic wasp *Trichogramma chilonis*. 3097–3103.
- Ankolekar, C., and Labbé, R.G. (2010). Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 982–984.
- Apidianakis, Y., and Rahme, L.G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis. Model. Mech.* *4*, 21–30.
- Apidianakis, Y., Pitsouli, C., Perrimon, N., and Rahme, L. (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20883–20888.
- Aris, A., and Leblanc, S. (2011). Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reprod. Toxicol.* *31*, 528–533.
- Atherton, J.C., and Blaser, M.J. (2009). Review series Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans : ancient history , modern implications. *119*.
- Bangi, E., Pitsouli, C., Rahme, L.G., Cagan, R., and Apidianakis, Y. (2012). Immune response to bacteria induces dissemination of Ras-activated *Drosophila* hindgut cells. *EMBO Rep.* *13*, 569–576.
- Barfod, K.K., Poulsen, S.S., Hammer, M., and Larsen, S.T. (2010). Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC Microbiol.* *10*, 233.
- Barker, N., Oudenaarden, A. Van, and Clevers, H. (2012). Perspective Identifying the Stem Cell of the Intestinal Crypt : Strategies and Pitfalls.
- Basbous, N., Coste, F., Leone, P., Vincentelli, R., Royet, J., Kellenberger, C., and Roussel, A. (2011). The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO Rep.* *12*, 327–333.
- Beebe, K., Lee, W.-C., and Micchelli, C. a (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage.

Dev. Biol. 338, 28–37.

Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D.I., Lummus, Z., Selgrade, M.K., Doerfler, D.L., and Seligy, V.L. (1999). Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107, 575–582.

Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I.G., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2006). Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan- recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.* 2, 0139–0147.

Biteau, B., Hochmuth, C.E., and Jasper, H. (2008). JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* 3, 442–455.

Biteau, B., Karpac, J., Supoyo, S., Degennaro, M., Lehmann, R., and Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 6, e1001159.

Biteau, B., Hochmuth, C.E., and Jasper, H. (2011a). Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* 9, 402–411.

Biteau, B., Karpac, J., Hwangbo, D., and Jasper, H. (2011b). Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp. Gerontol.* 46, 349–354.

Boggiano, J.C., and Fehon, R.G. (2012). Growth control by committee: intercellular junctions, cell polarity, and the cytoskeleton regulate Hippo signaling. *Dev. Cell* 22, 695–702.

Bøhn, T., Macagnan, C., and Robert, P. (2016). *Daphnia magna* negatively affected by chronic exposure to purified. *Food Chem. Toxicol.* 91, 130–140.

Bonfini, A., Liu, X., and Buchon, N. (2015). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Dev. Comp. Immunol.*

Bosco-Drayon, V., Poidevin, M., Boneca, I.G., Narbonne-Reveau, K., Royet, J., and Charroux, B. (2012). Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. *Cell Host Microbe* 12, 153–165.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *415*, 401–415.

Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., and Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

Buchon, N., Broderick, N. a, Chakrabarti, S., and Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in

*Drosophila*. *Genes Dev.* 23, 2333–2344.

Buchon, N., Broderick, N. a, Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B. (2009b).

*Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* 5, 200–211.

Buchon, N., Broderick, N. a, Kuraishi, T., and Lemaitre, B. (2010). Buchon, N., Broderick, N. a, Kuraishi, T., and Lemaitre, B. (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* 8, 152. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut re. *BMC Biol.* 8, 152.

Buchon, N., Osman, D., David, F.P. a, Fang, H.Y., Boquete, J.-P., Deplancke, B., and Lemaitre, B. (2013). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* 3, 1–14.

Buczacki, S.J. a, Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495, 65–69.

Capo, F., Charroux, B., and Royet, J. (2016). Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut : Local and systemic consequences. *Dev. Comp. Immunol.*

Carstens, K., Anderson, J., Bachman, P., de Schrijver, A., Dively, G., Federici, B., Hamer, M., Gielkens, M., Jensen, P., Lamp, W., et al. (2012). Genetically modified crops and aquatic ecosystems: Considerations for environmental risk assessment and non-target organism testing. *Transgenic Res.* 21, 813–842.

Chakrabarti, S., Liehl, P., Buchon, N., and Lemaitre, B. (2012). Infection-induced host translational blockage inhibits immune responses and epithelial renewal in the *Drosophila* gut. *Cell Host Microbe* 12, 60–70.

Chandler, J.A., Lang, J., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., and Kopp, A. (2011). Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: Ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genet.* 7.

Charroux, B., and Royet, J. (2010). *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin)*. 4, 40–47.

Chatterjee, M., and Ip, Y.T. (2009). Pathogenic stimulation of intestinal stem cell response in *Drosophila*. *J. Cell. Physiol.* 220, 664–671.

Choi, N.H., Lucchetta, E., and Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila*

midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *2011*, 2–7.

Choi, N.-H., Kim, J.-G., Yang, D.-J., Kim, Y.-S., and Yoo, M.-A. (2008). Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* 7, 318–334.

Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O’Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M.B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O’Sullivan, O., et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178–184.

Clark, E.J., Norris, D.O., and Jones, R.E. (1998). Interactions of Gonadal Steroids and Pesticides ( DDT , DDE ) on Gonaduct Growth in Larval Tiger Salamanders , *Ambystoma tigrinum*. *105*, 94–105.

Codelia, V. a, Sun, G., and Irvine, K.D. (2014). Regulation of YAP by Mechanical Strain through Jnk and Hippo Signaling. *Curr. Biol.* 24, 2012–2017.

Cordero, J.B., Stefanatos, R.K., Scopelliti, A., Vidal, M., and Sansom, O.J. (2012). Inducible progenitor-derived Wingless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *EMBO J.* 31, 3901–3917.

Cossentine, J., Robertson, M., and Xu, D. (2016). Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* 109, 1071–1078.

Crickmore, N. (2006). Beyond the spore - Past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *J. Appl. Microbiol.* 101, 616–619.

Van Cuyk, S., Deshpande, A., Hollander, A., Duval, N., Ticknor, L., Layshock, J., Gallegos-Graves, L., and Omberg, K.M. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in Urban Environments following Spraying. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7954–7961.

Devine, G.J., and Furlong, M.J. (2007). Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agric. Human Values* 24, 281–306.

Doekes, G. (2004). IgE Sensitization to Bacterial and Fungal Biopesticides in a Cohort of Danish Greenhouse Workers : The BIOGART Study. *407*, 404–407.

Doig, C.J., Sutherland, L.R., Sandham, J.D., Fick, G.H., Verhoef, M., and Meddings, J.B. (1998). Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 444–451.

Du, E.J., Ahn, T.J., Kwon, I., Lee, J.H., Park, J., Park, H., Kang, T.M., Cho, H., Kim, T.J.,

and Kim, H. (2016). TrpA1 Regulates Defecation of Food-Borne Pathogens under the Control of the Duox Pathway. *I*, 1–22.

Engen, P.A., Green, S.J., Voigt, R.M., Forsyth, C.B., and Keshavarzian, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res.* *37*, 223–236.

Er, J., Lee, A., Cranna, N.J., Chahal, A.S., and Quinn, L.M. (2012). Genetic Systems to Investigate Regulation of Oncogenes and Tumour Suppressor Genes in *Drosophila*. *Cells* *1*, 1182–1196.

Farré, R., and Tack, J. (2013). Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 698–706.

Frankenhuyzen, K. Van (2011). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* *101*, 1–16.

Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K., and Wilcks, A. (2006). Occurrence of Natural *Bacillus thuringiensis* Contaminants and Residues of *Bacillus thuringiensis* -Based Insecticides on Fresh Fruits and Vegetables Occurrence of Natural *Bacillus thuringiensis* Contaminants and Residues of *Bacillus thuringiensis*-Based Inse. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 3435–3440.

Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* *140*, 859–870.

Gaspar, P., and Tapon, N. (2014). Sensing the local environment: Actin architecture and Hippo signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *31*, 74–83.

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Fiscarelli, E., and Senesi, S. (2007). *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes Infect.* *9*, 591–598.

Gill, M., and Ellar, D. (2002). Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* *11*, 619–625.

Ginsburg, C. (2006). Aerial Spraying of *Bacillus Thuringiensis* Kurstaki ( Btk ). *J. Pestic. Reform* *26*, 26–29.

Gold, K.S., and Brückner, K. (2015). Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Immunol.* *27*, 357–368.

Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. a, Ferrandon, D., and Royet, J. (2002). The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is

mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416, 640–644.

Grisolia, C.K., Oliveira, R., Domingues, I., Oliveira-Filho, E.C., Monerat, R.G., and Soares, A.M.V.M. (2009). Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutat. Res.* 672, 119–123.

Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3–20; quiz 21–22.

Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y.S., and Lee, W.-J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847–850.

Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9–22.

Helgason, E., Økstad, O.L.E.A., Caugant, D.A., Mock, L.E., Hegna, I.D.A., Johansen, H.A., and Fouet, A. (2000). One Species on the Basis of Genetic Evidence. 66, 2627–2630.

Hong, A.W., Meng, Z., and Guan, K.-L. (2016). The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13.

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

Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., and Kasatiya, S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 103–105.

James, C. (2013). ISAAA Briefs brief 39 Global status of Commercialized biotech / GM Crops : 2008. Crops.

Jasper, H. (2015). Exploring the physiology and pathology of aging in the intestine of *Drosophila melanogaster*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 59, 47–54.

Jensen, G.B., Larsen, P., Jacobsen, B.L., Madsen, B., Smidt, L., and Andrup, L. (2002). *Bacillus thuringiensis*. *Society* 68, 4900–4905.

Jeschke, P. (2016). Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. *Pest Manag. Sci.* 72, 433–455.

Jiang, H., Patel, P.H., Kohlmaier, A., Grenley, M.O., McEwen, D.G., and Edgar, B.A. (2009). Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* 137, 1343–1355.

- Jiang, H., Patel, P.H., Kohlmaier, A., Grenley, M.O., Donald, G., Edgar, B.A., Phelps, R.A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., et al. (2010). NIH Public Access. *137*, 1343–1355.
- Jiang, H., Grenley, M.O., Bravo, M.J., Blumhagen, R.Z., and Edgar, B.A. (2011). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* *8*, 84–95.
- Jiang, H., Tian, A., and Jiang, J. (2016). Intestinal stem cell response to injury: lessons from *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Johnston, D.S. (2002). THE ART AND DESIGN OF GENETIC SCREENS : *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *3*, 176–188.
- Jones, R.M., Luo, L., Ardita, C.S., Richardson, A.N., Kwon, Y.M., Mercante, J.W., Alam, A., Gates, C.L., Wu, H., Swanson, P.A., et al. (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* *32*, 3017–3028.
- Kango-Singh, M., and Singh, A. (2009). Regulation of organ size: Insights from the *Drosophila* hippo signaling pathway. *Dev. Dyn.* *238*, 1627–1637.
- Karpac, J., Biteau, B., and Jasper, H. (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell Rep.* *4*, 1250–1261.
- Karpowicz, P., Perez, J., and Perrimon, N. (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* *137*, 4135–4145.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Genes and environment: How will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig. Dis.* *28*, 395–405.
- Khan, W.I., and Collins, S.M. (2006). Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* *143*, 389–397.
- Kiliç, A., and Akay, M.T. (2008). A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. *Food Chem. Toxicol.* *46*, 1164–1170.
- Kirouac, M., Vachon, V., No??l, J.F., Girard, F., Schwartz, J.L., and Laprade, R. (2002). Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1561*, 171–179.

Konecka, E., Baranek, J., Bielińska, I., Tadeja, A., and Kaznowski, A. (2014). Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. *Sci. Total Environ.* *472*, 296–301.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., et al. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma.* 292–298.

Lee, K.-A., Kim, S.-H., Kim, E.-K., Ha, E.-M., You, H., Kim, B., Kim, M.-J., Kwon, Y., Ryu, J.-H., and Lee, W.-J. (2013). Bacterial-Derived Uracil as a Modulator of Mucosal Immunity and Gut-Microbe Homeostasis in *Drosophila*. *Cell* *153*, 797–811.

Limmer, S., Haller, S., Drenkard, E., Lee, J., Yu, S., Kocks, C., Ausubel, F.M., and Ferrandon, D. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* RhlR is required to neutralize the cellular immune response in a *Drosophila melanogaster* oral infection model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17378–17383.

Lin, G., Xu, N., and Xi, R. (2010). Paracrine unpaired signaling through the JAK/STAT pathway controls self-renewal and lineage differentiation of *drosophila* intestinal stem cells. *J. Mol. Cell Biol.* *2*, 37–49.

Linlin Guo, Karpac, J., and L. Tran, S. (2015). NIH Public Access. *19*, 161–169.

Lu, Y., and Li, Z. (2015). No intestinal stem cell regeneration after complete progenitor ablation in *drosophila* adult midgut. *J. Genet. Genomics* *42*, 83–86.

Lu, Y., and Li, Z. (2015). No intestinal stem cell regeneration after complete progenitor ablation in *drosophila* adult midgut. *J. Genet. Genomics* *42*, 83–86.

Maeda, K., Takemura, M., Umemori, M., and Adachi-Yamada, T. (2008). E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes Cells* *13*, 1219–1227.

Manning, A.M., and Davis, R.J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* *2*, 554–565.

Marianes, A., and Spradling, A.C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife* *2013*, 1–19.

Micchelli, C. a, and Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* *439*, 475–479.

Moravek, M., Dietrich, R., Buerk, C., Broussolle, V., Guinebretière, M.H., Granum, P.E.,

- Nguyen-The, C., and Märtlbauer, E. (2006). Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 293–298.
- Morillo Prado, J.R., Chen, X., and Fuller, M.T. (2012). Polycomb Group Genes Psc and Su(z)2 Maintain Somatic Stem Cell Identity and Activity in *Drosophila*. *PLoS One* 7.
- Nehme, N.T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J. a, Ewbank, J.J., and Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 3, e173.
- Nester EUGENE, THOMASHOW, L.S., METZ, M., and GORDON, M. (2002). *Bacillus thuringiensis*:
- Ohlstein, B., and Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439, 470–474.
- Ohlstein, B., and Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 315, 988–992.
- Okinaka, R.T., and Keim, P. (2016). The Phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. 1–12.
- Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y.T., Su, W.C., Poidevin, M., Tsai, Y.C., and Lemaitre, B. (2012). Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *J Cell Sci* 125, 5944–5949.
- Ota, M., and Sasaki, H. (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* 135, 4059–4069.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., and Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins (Basel)*. 6, 3296–3325.
- Panayidou, S., and Apidianakis, Y. (2013). Regenerative Inflammation: Lessons from *Drosophila* Intestinal Epithelium in Health and Disease. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 2, 209–231.
- Pardo-López, L., Soberón, M., and Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 3–22.
- Paredes, J.C., Welchman, D.P., Poidevin, M., and Lemaitre, B. (2011). Negative regulation by Amidase PGRPs shapes the *drosophila* antibacterial response and protects the Fly from innocuous infection. *Immunity* 35, 770–779.
- Pasco, M.Y., Loudhaief, R., and Gallet, A. (2015). The cellular homeostasis of the gut: What

- the *Drosophila* model points out. *Histol. Histopathol.* *30*, 277–292.
- Perdigoto, C.N., and Bardin, A.J. (2013). Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 2307–2322.
- Perrimon, N., Bonini, N.M., and Dhillon, P. (2016). Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* *9*, 229–231.
- Qi, Z., and Chen, Y.-G. (2015). Regulation of intestinal stem cell fate specification. *Sci. China. Life Sci.* *58*, 570–578.
- Radtke, F. (2005). Self-Renewal and Cancer of the Gut: Two Sides of a Coin. *Science* (80-. ). *307*, 1904–1909.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* *18*, 189–194.
- Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.-Y., Ip, Y.T., and Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21064–21069.
- Renzi, M.T., Amichot, M., Pauron, D., Tchamitchian, S., Brunet, J.L., Kretzschmar, A., Maini, S., and Belzunces, L.P. (2016). Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *127*, 205–213.
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C.L., Ulgherait, M., Hur, J.H., Ansari, W.S., Lo, T., Jones, D.L., and Walker, D.W. (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab.* *14*, 623–634.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B., and Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* *250*, 129–136.
- Royet, J., Charroux, B., *Drosophila*, T., and Pathways, I. (2013). gut epithelium. 259–263.
- Sancho, R., Nateri, A.S., de Vinuesa, A.G., Aguilera, C., Nye, E., Spencer-Dene, B., and Behrens, A. (2009). JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumourigenesis in mice. *EMBO J.* *28*, 1843–1854.
- Sansinenea, E., and Ortiz, A. (2015). Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Biotechnol. Lett.* *37*, 483–490.
- Sauka, D.H., Basurto-Ríos, R.E., Ibarra, J.E., and Benintende, G.B. (2010). Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop. Entomol.*

39, 767–773.

Shaw, R.L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B. a, and Tapon, N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* 137, 4147–4158.

Soberón, M., Gill, S.S., and Bravo, A. (2009). Review Signaling versus punching hole : How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells ? 66, 1337–1349.

St Johnston, D., and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: Parallels and diversity. *Cell* 141, 757–774.

Staley, B.K., and Irvine, K.D. (2010). Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* 20, 1580–1587.

Stark, J.D., and Banks, J.E. (2003). P OPULATION- L EVEL E FFECTS OF P ESTICIDES AND O THER T OXICANTS ON A RTHROPODS.

Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep.* 1, 347–352.

Thomas, W.E., and Ellar, D.J. (1983). BACILLUS THURINGIENSIS VAR ISRAELENIS CRYSTAL 6-ENDOTOXIN : EFFECTS ON INSECT AND MAMMALIAN CELLS IN VITRO AND IN VIVO. 197, 181–197.

Tian, A., and Jiang, J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife* 2014, 1–23.

Tian, A., Shi, Q., Jiang, A., Li, S., Wang, B., and Jiang, J. (2015). Injury-stimulated Hedgehog signaling promotes regenerative proliferation of *Drosophila* intestinal stem cells. *J. Cell Biol.* 208, 807–819.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders *Lgr5*-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255–259.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, a, Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R. a, and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870–874.

Uronis, J.M., M?hlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 4.

- Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J.L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J. Invertebr. Pathol.* *111*, 1–12.
- Varelas, X., Miller, B.W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F.A., Sakuma, R., Pawson, T., Hunziker, W., McNeill, H., et al. (2010). The Hippo Pathway Regulates Wnt/Catenin Signaling. *Dev. Cell* *18*, 579–591.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11414–11419.
- Vriz, S., Reiter, S., and Galliot, B. (2014). *Cell Death. A Program to Regenerate.* (Elsevier Inc.).
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* *138*, 3907–3914.
- Wandler, A.M., and Guillemin, K. (2012). Transgenic expression of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes apoptosis or tumorigenesis through JNK activation in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002939.
- Wang, M.C., Bohmann, D., and Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* *5*, 811–816.
- Wei, Z., Cao, S., Liu, S., Yao, Z., Sun, T., Li, Y., Li, J., Zhang, D., and Zhou, Y. (2014). Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients? survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget*.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 142–149.
- Whitmarsh, a J., and Davis, R.J. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene* *26*, 3172–3184.
- Wilcks, A., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. (2006). Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *48*, 410–418.
- Wirth, M.C., Park, H., Walton, W.E., and Federici, B.A. (2005). Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* Delays Evolution of Resistance to Cry11A in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *71*, 185–189.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et

al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *2747–2761*.

Zhou, F., Rasmussen, A., Lee, S., and Agaisse, H. (2013). The UPD3 cytokine couples environmental challenge and intestinal stem cell division through modulation of JAK/STAT signaling in the stem cell microenvironment. *Dev. Biol.* *373*, 383–393.