



HAL
open science

Étude des évènements mitochondriaux impliqués dans le contrôle de l'apoptose par rbf1, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur rb

Vincent Ruby

► To cite this version:

Vincent Ruby. Étude des évènements mitochondriaux impliqués dans le contrôle de l'apoptose par rbf1, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur rb. Génétique animale. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLV039 . tel-01908006

HAL Id: tel-01908006

<https://theses.hal.science/tel-01908006>

Submitted on 29 Oct 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.

Étude des évènements mitochondriaux impliqués dans le contrôle de l'apoptose par *rbf1*, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur *rb*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: biologie cellulaire

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 19 Juillet 2018, par

Vincent Ruby

Composition du Jury :

Anne-Marie Pret Professeur, UVSQ	Président
Frédérique Peronnet Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Magalie Lecourtois Chargé de recherche, INSERM	Rapporteur
Mireille Laforge Chargée de recherche, CNRS	Examineur
Isabelle Guéna Professeur, UVSQ	Directeur de thèse

*à mon père,
la personne la plus fière de cette thèse après moi
à ma mère,
la personne la plus fière de moi après cette thèse*

Remerciements

Une thèse c'est bon mais c'est long. Pour voir le bout il faut avoir des gens sur qui compter. Que ce soit au labo, ou à la maison, je n'ai vraiment pas eu à me plaindre. Pour commencer il y a Isabelle. Merci de tout mon cœur de m'avoir proposé de faire une thèse avec toi. Ton accueil a été formidable dès le début. Ton énergie et ta volonté sont vraiment communicatifs. Je suis convaincu qu'avec toi, la recherche et l'enseignement ont de beaux jours devant eux. Ensuite, je dois dire que ton binôme de bureau n'y est pas pour rien. Aurore, ton engagement génial dans tout ce que tu fais, t'honore. Sans toi, cette thèse aurait été bien plus fade et compliquée. Et merci à Bernard. Quand on te rencontre, on sait qu'on va passer une bonne thèse. Merci de diriger Les Grands Biologistes Compétents (à moins que ça ne soit Les Guedins de la Biologie Cellulaire).

Avec vous, le reste de l'équipe a bien évolué en presque 5 ans, mais Christine était là depuis le début. On rigolait bien en pièce à mouche avec ta copine Marcelle. Ces moments sont toujours aussi frais à ma mémoire. Au début, j'étais le piu-piu d'Amandine. Grâce à toi, le début de la thèse a été particulièrement efficace et formateur. Je suis arrivé avec une collègue de Bureau mais tu es très vite devenue une amie. Il y a aussi Sylvina. On se croiera à un concert un de ces quatre. Je t'attends ! il risque d'y avoir Jessie et Fred d'ailleurs. Il faut juste prévoir des bières et du saucisson pour Jessie mais Fred sera sur scène, derrière la batterie. Merci à vous trois pour tous vos bons conseils et nos bonnes rigolades. Enfin il y a ma piu-piu Juliette. La petite stagiaire de L3 a bien grandi. Mais arrête de tyranniser le bureau avec tes chansons débiles et tes jeux à la con. Je dis ça mais on s'est bien marré (B9). Et je pense que Marion ne se laissera pas faire. Elle m'a l'air plutôt débrouillarde la jeune padawan.

Enfin je remercie toutes ces personnes formidables que j'ai pu croiser au coin d'un bureau ou d'un labo : Natalie, Flore, Delphine, Arnaud, Sébastien G, Sébastien S et Jean-Marc. Cette thèse m'a permis de vous rencontrer et rien que pour ça, cela valait le coup. Et puis toutes les sœurs de la galère. D'abord Jessica, ma binôme partie dans le froid écossais. Je pense que tu as trouvé ta maison là-bas, pleins de châteaux et de fantômes. Ça me comble de joie pour toi. Et Caro, l'autre moitié de Biowitch®. Je veux une médaille pour t'avoir supporté. Eli aussi devrait en avoir une. Pour service rendu au gouter. Sevasti a pris ta place au bureau

mais y a beaucoup moins pensé que toi. On aura au moins appris quelques insultes en grecque. Et je ne sais pas si Nesrine a été suffisamment formée pour cette tâche. Ça fait beaucoup de sœurs de la galère mais il y a aussi Benjamin. Frère, accroches-toi. Bientôt ton tour mais on regrette presque d'être parti quand c'est fini.

J'ai aussi pu compter sur du soutien extérieur. Mon papa, je suis fier de te présenter cette thèse. C'est vraiment beaucoup grâce à toi que je suis là. Avoir un scientifique à la maison ça aide beaucoup pour développer l'esprit. Maman, félicitation ! Tu es grand-mère d'une petite thèse. Tout l'amour que j'ai reçu n'apparaît peut-être pas de manière évidente dans le texte de cette thèse mais je peux te dire qu'il a beaucoup compté. Petit frère, tu n'étais pas beaucoup là pendant ces 5 années, toujours à vivre la vie que tu voulais. Savoir que tu sois bien à chaque fois que tu vas quelque part me suffit pour être heureux. Merci à mamie et papi, pas si loin du labo et que j'ai pu visiter quelques fois pour me sentir cocooné. Merci à toute ma famille d'être aussi géniale. J'ai une chance de fou avec vous.

Merci à tous les copines et les copains : Julie, Alex, Bif, Benjamin, Fanny, Xavier, Ludo, Geoffroy, Jun, Charlie, Jacques, Alexandre, Grégory, Florian, Lionel... Avec vous, la vie de thésard est tellement plus facile. Je pense particulièrement à Francis. Tu es le capitaine du navire KBJ. Tu es mon capitaine. Ce que j'ai acquis aux arts martiaux m'a forgé et si je suis là aujourd'hui, tu y es pour beaucoup.

Je dois dire que ma plus belle découverte au cours de cette thèse, c'est Léa. Je n'ai pas écrit de thèse sur toi mais j'espère qu'une vie de chansons et de poèmes te conviendra. Et merci de m'avoir fait connaître tous ces gens formidables : Eve, Zoe, Yann, Flo, Gunther, Delphine, Jérémie, Jaufré, Josiane, Patrice...

Je vous remercie tous d'avoir lu jusqu'ici mais il en reste pas mal derrière.

Bon courage !

Table des matières

Remerciements	1
Abréviations.....	7
Introduction.....	11
A. La mitochondrie	12
1. Description.....	12
a. Origine et découverte	12
b. Structure	13
2. Fonctions.....	14
a. Métabolisme	14
i) Cycle de l'acide citrique (TCA).....	14
ii) Cycle de β -oxydation	14
b. Respiration	15
c. Homéostasie calcique	15
i) Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter (MCU)	16
ii) Canaux d'efflux.....	17
iii) Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cellulaire	17
d. Apoptose.....	17
i) La famille Bcl-2	18
ii) Cytochrome c	19
iii) Smac/DIABLO et Htra2/Omi.....	20
3. Dynamique.....	20
a. Fission mitochondriale	21
i) Les protéines effectrices et régulatrices de la fission mitochondriale	21
ii) Description du mécanisme de fission	22
iii) Régulations de la fission mitochondriale	23
b. Fusion mitochondriale	24
i) Les protéines effectrices et régulatrices de la fusion	24
ii) Mode de fonctionnement des protéines responsables de la fusion mitochondriale	25
iii) Régulations de la fusion mitochondriale	26
c. Trafic mitochondrial.....	27

d.	Biogenèse des mitochondries	29
e.	Maintien de l'intégrité et contrôle qualité	29
i)	L'UPR mitochondriale.....	30
ii)	Les voies de la mitophagie	31
A)	PINK1/PARKIN	31
(a)	PINK1	32
(b)	Parkin.....	33
(c)	Modes d'action dans la mitophagie	34
B)	Autres voies de mitophagie indépendantes de PINK1/Parkin	36
iii)	Régulation de la mitophagie	37
B.	L'Apoptose	38
1.	<i>Généralités</i>	38
2.	<i>Rôles physiologiques</i>	39
3.	<i>Le processus apoptotique</i>	41
a.	Les caspases	41
b.	Les IAPs (Inhibitors of Apoptosis)	43
c.	Les protéines Rpr, Hid et Grim (RHGs).....	45
d.	Evènements mitochondriaux	47
C.	Rbf1.....	49
1.	<i>Les protéines à poches</i>	49
a.	Structure protéique des protéines à poche	50
b.	Mode d'action des protéines à poche	51
c.	Mécanismes de régulation.....	55
2.	<i>Fonctions cellulaires</i>	57
a.	Le cycle cellulaire	57
b.	La différenciation	58
c.	L'apoptose.....	59
D.	Situation du sujet	62
	Résultats	65

A. Évènements mitochondriaux impliqués dans l'apoptose induite par Rbf1..... 66

1.	<i>Contexte scientifique.....</i>	<i>66</i>
2.	<i>Rb1 induit une apoptose mitochondriale dépendante de Debcl et Drp1</i>	<i>68</i>
a.	<i>Résumé.....</i>	<i>68</i>
b.	<i>Article</i>	<i>69</i>
3.	<i>Données complémentaires sur le rôle de la dynamique mitochondriale dans l'apoptose induite par Rbf1. 71</i>	
a.	<i>MARF est impliquée dans le phénotype d'aile induit par Rbf1</i>	<i>71</i>
b.	<i>MARF est nécessaire à l'apoptose induite par Rbf1</i>	<i>72</i>
c.	<i>PINK1 et Parkin sont impliqués dans phénotype d'aile induit par Rbf1.....</i>	<i>74</i>
d.	<i>PINK1 et Parkin sont nécessaires à l'apoptose induite par Rbf1</i>	<i>75</i>
e.	<i>PINK1 agit en aval de Debcl dans l'apoptose induite par Rbf1.....</i>	<i>77</i>
f.	<i>Recherche d'évènements de mitophagie induit par Rbf1</i>	<i>78</i>
4.	<i>Conclusion sur les évènements mitochondriaux impliqués dans l'apoptose induite par Rbf1 ..</i>	<i>80</i>

B. Liens entre l'apoptose induite par Rbf1 et la traduction .. 80

1.	<i>Contexte scientifique.....</i>	<i>80</i>
2.	<i>La surexpression de PABP supprime le phénotype d'aile induit par Rbf1.....</i>	<i>81</i>
a.	<i>Résumé.....</i>	<i>81</i>
b.	<i>Manuscrit</i>	<i>82</i>

Discussion & Perspectives 95

A. Les évènements mitochondriaux induits par Rbf1 97

1.	<i>La régulation de E2F/rb sur la mitochondrie et l'apoptose</i>	<i>97</i>
2.	<i>La dynamique mitochondriale dans l'apoptose.....</i>	<i>100</i>
3.	<i>Le stress oxydant dans la voie apoptotique.....</i>	<i>102</i>
4.	<i>Le rôle de la mitophagie dans l'apoptose.....</i>	<i>103</i>

B. Le rôle de la traduction dans l'apoptose induite par Rbf1

106

1.	<i>Rbf1 et PABP</i>	106
2.	<i>La traduction et l'apoptose</i>	108
C. Conclusion		110
Matériel & Méthodes		112
A. Génétiques		113
1.	<i>Les drosophiles</i>	113
a.	Le système UAS/Gal4	113
b.	Les chromosomes balanceurs.....	114
2.	<i>Test d'interaction génétique</i>	114
B. Biologie cellulaire		115
1.	<i>Dissection de larves</i>	115
2.	<i>Observation de l'apoptose par marquage TUNEL</i>	115
3.	<i>Immunofluorescence</i>	116
4.	<i>Observation en microscopie confocal</i>	116
5.	<i>Quantification des cellules apoptotiques</i>	116
6.	<i>Analyse statistique</i>	117
Bibliographie		118

Abréviations

4EBP : eIF4E Binding Protein
ADP : Adenosine Di-Phosphate
APAF-1 : apoptotic protease-activating factor 1
ARK : APAF1-related killer
ARN : Acide RiboNucléique
ARNi : ARN interférent
ATFS : Stress Activated Transcription Factor
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BAK : BCL2 antagonist/killer
BAX : BCL2-associated X protein
BCL2 : B cell leukemia/lymphoma 2
BH : BCL2 Homology Domain
BIR : Baculovirus IAP repeat
BNIP3 : BCL2 interacting protein 3
CARD : caspase activation and recruitment domain
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
DCP : Decapping Protein 1
DEBCL : Death executioner Bcl-2
DECAY : Death executioner caspase related to Apopain/Yama
DED : death effector domains
DIAP : Death-associated inhibitor of apoptosis
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
DREAM : Drosophila RB, E2F, and Myb
DREDD : Death related ced-3/Nedd2-like caspase
DRICE : Drosophila Interleukin-1 β -Converting Enzyme
DRONC : Death regulator Nedd2-like caspase
DRP1 : Dynamin related protein 1
E2F : E2F transcription factor

EAO : Espèce Activée de l'Oxygène
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EI : espace intermembranaire
EMRE : Essential MCU regulator
ERK : extracellular regulated MAP kinase
FAD : Flavin Adenine Dinucleotide
FI : filaments intermédiaires
FUNDC1 : FUN14 domain containing 1
GABA : Gamma Amino Butyric Acid
GDAP1 : ganglioside induced differentiation associated protein 1
GED : GTPase Effector Domain
GFP : Green Fluorescent Protein
GH3 : Grim helix 3
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HDAC : Histone deacetylase
HECT : E6-AP carboxylique terminus
HID : head involution defective
HSP : Heat Shock Protein
HTRA2 : High temperature requirement A2
IAP : Inhibitors of Apoptosis
IBM : IAP Binding Motif
IBR : in-between-RING
IRES : Internal Ribosome Entry Site
JNK : Jun N-terminal kinase
LC3 : light chain 3
MARCH5 : membrane associated ring-CH-type finger 5
MARF : Mitochondrial Assembly Regulatory Factor
MCU : Mitochondrial Calcium Uniporter
MEM : Membrane Externe Mitochondriale
MF : microfilaments d'actine
MFN : Mitofusin

MIM : Membrane Interne Mitochondriale
MPP : Mitochondrial Processing Peptidase
MT : Microtubule
MUL1 : Mitochondrial ubiquitin ligase 1
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NEDD8 : neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8
NES : Nuclear Export Signal
NIX : NIP3-like protein X
NLS : Nuclear Localization Signal
NMD : nonsense-mediated decay
NRF : Nuclear Respiratory Factors
OPA1 : Optic Atrophy 1
PABP : Poly-Adenylate Binding Protein
PARL : Preselinin-associated Rhomboid-like protease
PBS : phosphate buffered saline
PGAM5 : Phosphoglycerate mutase family member 5
PGC-1 : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1
PH3 : phospho-histone H3
PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1
RB : Retinoblastoma protein
RBF : Retinoblastoma-family protein
RBR : RING-in-between-RING
RE : réticulum endoplasmique
RHG : Reaper, Hid, Grim
RING : really interesting new gene
RNAi : RNA interference
ROS : reactive oxygen species
SUMO : small ubiquitin-related modifier
TCA : Cycle de l'acide citrique
TRAP1 : TNFR-associated protein 1
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UAS : Upstream Activating Sequence

UBL : Ubiquitin-like

UPR^{mt} : mitochondrial Unfolded Protein Response

VCP : Valosin-containing protéine

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel

VPS35 : vacuolar protéine sorting 35

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

Introduction

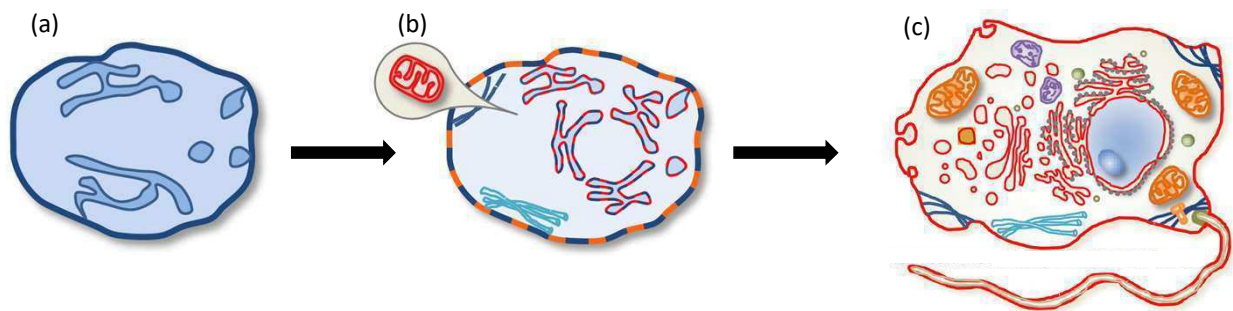


Figure 1. La théorie de l'endosymbiose.

(a) La lignée proto-eucaryote évolue avec le développement d'endomembranes.

(b) Ayant développé la plupart des capacités des eucaryotes (noyau, phagocytose), le proto-eucaryote englobe l'alpha-protéobactérie, ancêtre de la mitochondrie.

(c) Dernier ancêtre commun eucaryote

Adapté de : López-García et al., 2015

A. La mitochondrie

1. Description

a. Origine et découverte

L'apparition de la mitochondrie est un élément précurseur dans la différenciation des domaines eucaryote et procaryote. Cette apparition est due à l'intégration d'une alpha-protéobactérie au cours de l'évolution des formes de vies ancestrales vers les eucaryotes actuels.

En effet, la théorie de l'origine endosymbiotique des mitochondries, formulée par Lynn Margulis, est aujourd'hui majoritairement admise. Cette théorie avance que les premières ébauches du réticulum endoplasmique (RE) et du noyau se sont formées, suite à des invaginations de la membrane plasmique, d'une cellule procaryote ancestrale. Cette cellule ancestrale aurait alors endocyté une autre cellule procaryote, hétérotrophe et capable d'aérobie. Une symbiose se serait alors établie entre l'hôte et la bactérie endocytée qui deviendra la mitochondrie au cours de l'évolution (Figure 1). L'ordre d'apparition entre la mitochondrie et les autres organelles de la cellule est encore très discuté (López-García and Moreira, 2015).

L'alpha-protéobactérie possédait le matériel génétique qui lui permettait de survivre et de se multiplier de façon autonome avant son intégration. Une partie importante de cette information génétique a été transférée vers le noyau de la cellule eucaryote hôte. Parmi les gènes relatifs à l'activité mitochondriale il n'en reste qu'environ 100 chez les organismes ayant conservé le plus grand génome mitochondrial. L'homme et la drosophile n'ont, pour leur part, conservé que 37 gènes mitochondriaux, dont 13 seulement codent des protéines.

L'historique de la découverte de la mitochondrie est relatée dans une revue de Ernest et Schatz publiée en 1981 (Ernster and Schatz, 1981). Dans les années 1840, Henle, Aubert et Kölliker détaillèrent leurs premières observations de la mitochondrie. En 1890, Altman démontra la présence de cet organite dans toutes les cellules eucaryotes et l'appela « bioblaste ». C'est en 1898 que le nom de « mitochondrie » sera introduit par Benda. Ce nom vient des racines grecques *mitos* (filament) et *chondros* (grain), en référence aux formes compactées de l'organite qui sont observées durant la spermatogenèse. Alors que dès les années 1910, les premières études établissant le fonctionnement chimique du métabolisme

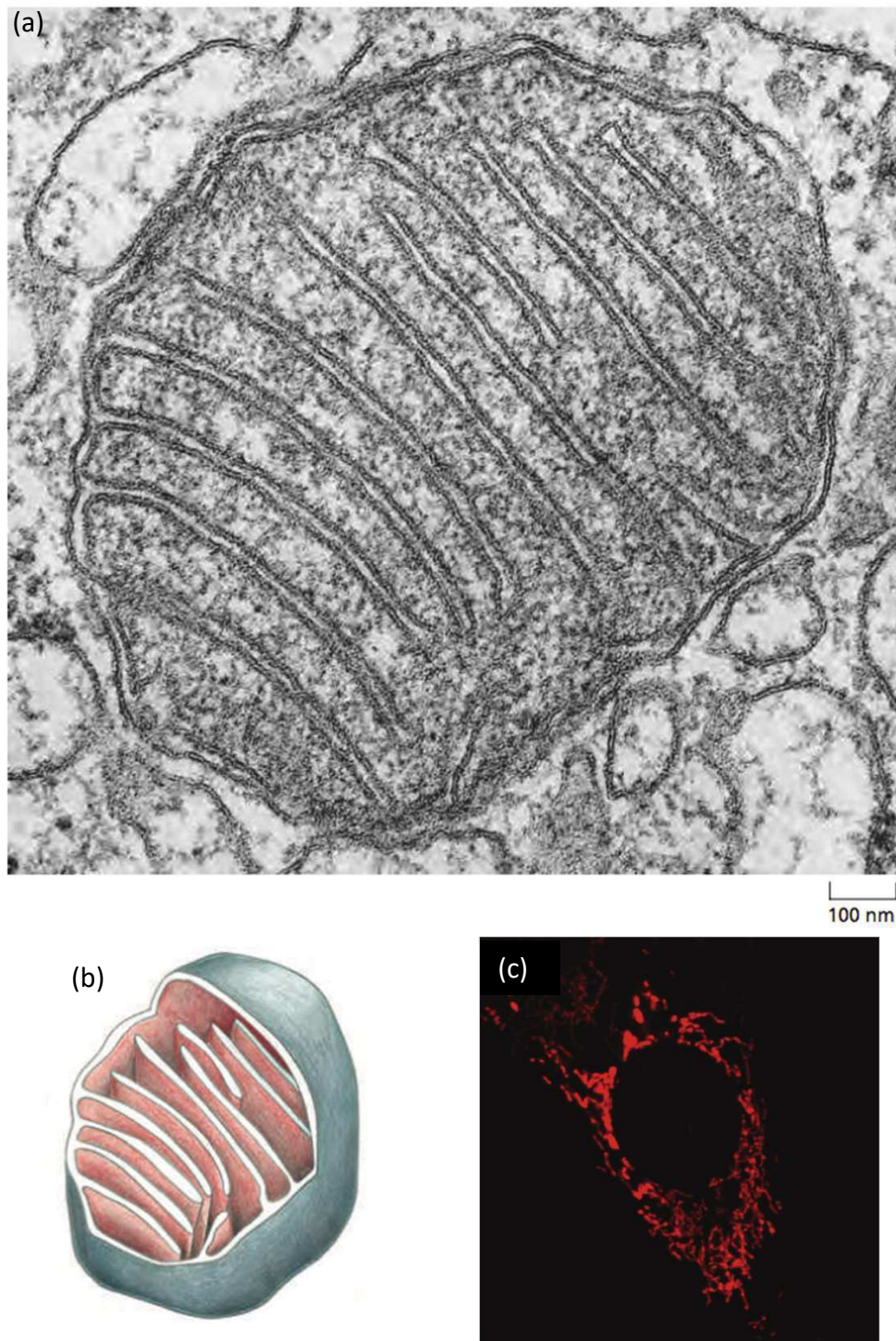


Figure 2. La structure mitochondriale

(a) Coupe observée par microscopie électronique

(b) Dessin d'une mitochondrie en trois dimensions avec retrait de la partie supérieure.

(c) Observation en microscopie confocale du réseau mitochondrial d'un myoblaste exprimant une protéine fluorescente rouge localisée à la mitochondrie (objectif X63)

Adapté de : Alberts *et al.*, 2013 et Liesa *et al.*, 2009

et de la respiration cellulaire sont publiées, il faudra attendre 1949 pour que le lien entre ces mécanismes et la mitochondrie soit définitivement prouvé par Kennedy, Lehninger et Green notamment. Ces avancées sont principalement dues à l'amélioration considérable des techniques de fractionnement permettant de séparer les mitochondries du reste de la cellule. Peu de temps après, Palade et Sjöstrand mirent au point les techniques de microscopie électronique permettant de mieux se figurer leur organisation.

b. Structure

La mitochondrie est un organe présentant de nombreux aspects particuliers. Elle possède notamment, comme le noyau et les chloroplastes, deux membranes aux propriétés différentes (Figure 2). La membrane externe mitochondriale (MEM) est « semi-perméable ». La présence d'un canal spécifique : VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) laisse passer les ions et les petites protéines (<10kDa) donnant à l'espace intermembranaire (EI) une composition très proche de celle du cytosol. Pour les protéines de plus grosse taille, des complexes d'importation TOM (Translocase of the Outer Membrane) permettent aux protéines possédant un signal peptidique spécifique de passer la membrane externe. Le rôle de la MEM est principalement de servir d'interface entre la mitochondrie et le reste de la cellule. En cela, elle a un rôle prépondérant dans la dynamique mitochondriale et sa régulation. On y trouve donc un certain nombre de récepteurs et de protéines permettant la translocalisation, depuis le cytosol vers les différents sous compartiments mitochondriaux.

La membrane interne mitochondriale (MIM) est très différente de la MEM. Elle est constituée de 80% de protéines. Les 20% de phospholipides restant sont d'une composition enrichie en cardiolipides. Cette composition rend la MIM bien moins perméable que la MEM et lui permet d'être très sélective vis-à-vis de ce qui est transféré du cytosol vers la matrice mitochondriale. Le passage de certaines molécules nécessite des transporteurs spécifiques. C'est par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques que sont importés l'Adénosine DiPhosphate (ADP), du phosphate inorganique (Pi) et du pyruvate qui sont des composés essentiels aux activités enzymatiques s'effectuant dans la mitochondrie et indispensables au fonctionnement cellulaire. On trouve, par ailleurs, au niveau de la MIM, une machinerie enzymatique conséquente, comprenant des complexes protéiques impliqués dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS). La MIM, en se repliant sur elle-même, forme des crêtes,

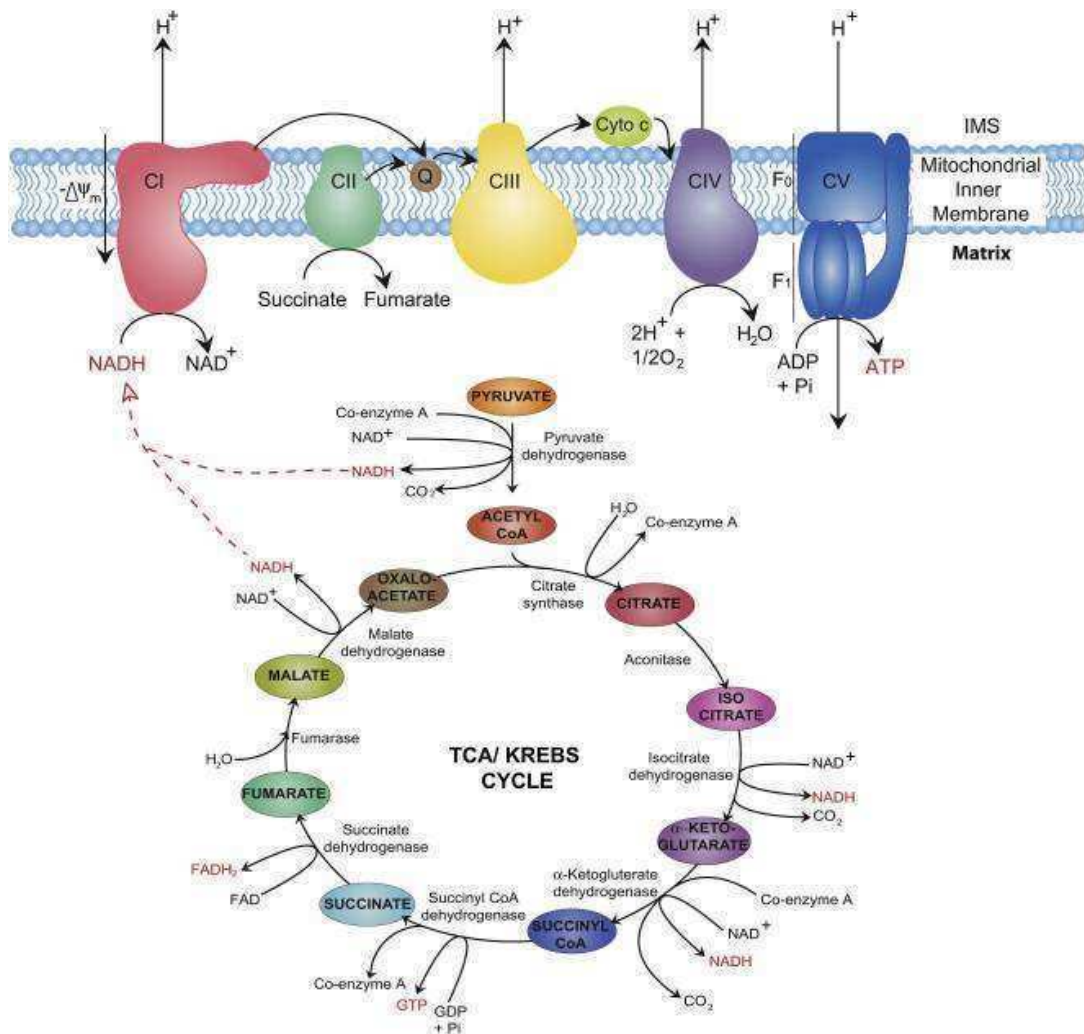


Figure 3. Bioénergétique de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs/TCA.

Le pyruvate est converti en molécules à haute énergie comme NADH, GTP et $FADH_2$ à travers la catalysation des enzymes du cycle de Krebs. Le NADH généré est transporté au complexe I et est converti en NAD^+ par la chaîne respiratoire. Le transfert des électrons le long de la chaîne maintient le potentiel de membrane via une pompe à proton au niveau de la membrane interne. L'étape finale est la formation d'ATP à partir d'ADP par l'ATP synthase.

Issu de : Osellame *et al.*, 2012

permettant d'augmenter la surface d'échange et la quantité des protéines favorisant ainsi sa capacité de production d'énergie.

Enfin, on retrouve également au niveau de la matrice mitochondriale plusieurs enzymes nécessaires aux fonctions mitochondriales, fonctions que je décrirai plus tard dans cette introduction. La forte concentration en protéines de la matrice est responsable d'une viscosité plus importante par rapport à celle du cytosol.

2. Fonctions

Les mitochondries remplissent des fonctions essentielles au sein de la cellule. Elles sont impliquées dans le métabolisme, comme siège du cycle de Krebs et de la β -oxydation, réactions nécessaires à la mise en place d'un potentiel réducteur. Ce potentiel réducteur est à son tour utilisé pour la respiration, une autre fonction des mitochondries. Enfin, elles sont impliquées dans les mécanismes d'homéostasie calcique, lipidique et d'apoptose.

a. Métabolisme

i) Cycle de l'acide citrique (TCA)

La mitochondrie est l'organite dans lequel se termine de nombreuses voies métaboliques. Le cycle de l'acide citrique est décrit par Krebs en 1937 mais ne sera associé à la mitochondrie qu'à partir de 1949 grâce à l'amélioration des techniques de fractionnement cellulaire. Ce cycle présente un ensemble de réactions permettant, notamment par l'apport de Coenzyme A comme substrat, d'établir un potentiel d'oxydo-réduction. Ce potentiel est formé par des molécules de NADH, NADPH et de FADH₂ (Figure 3). L'acétyl-CoA provient principalement du métabolisme des glucides, s'officiant dans le cytosol, mais peut aussi être produit grâce à la β -oxydation, mécanisme s'effectuant dans la mitochondrie. Par ailleurs, on peut observer que, sur l'ensemble des réactions du cycle de l'acide citrique, il y a consommation de H₂O et production de CO₂ et d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Nous verrons par la suite que c'est la phosphorylation oxydative, pour laquelle le cycle de Krebs est indispensable, qui est généralement le principal producteur d'ATP (Figure 3).

ii) Cycle de β -oxydation

Les mécanismes de métabolisation des acides gras constituent la β -oxydation. Des réactions enzymatiques permettent de dégrader les acides gras en diminuant la chaîne

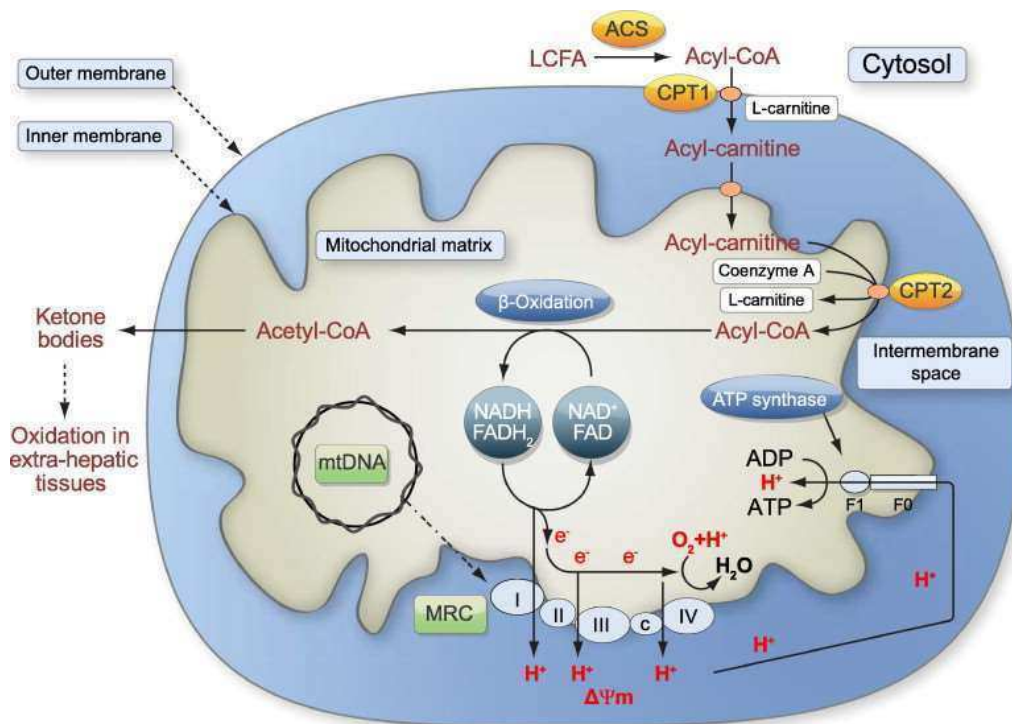


Figure 4. Représentation schématique de la β -oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie des cellules hépatiques.

L'entrée des acides gras à longue chaîne (C14-C18) dans la mitochondrie, requière un système de transport spécifique nécessitant 4 étapes : activation par liaison à un coenzyme A pour former un Acyl-CoA, conversion en Acyl-carnitine, translocation dans l'espace intermembranaire puis dans la matrice. L'acide gras est reconverti en Acyl-CoA pour subir les cycles successifs de β -oxydation. Les molécules de NADH et FADH_2 ainsi produits servent à alimenter la chaîne respiratoire permettant d'établir un potentiel de membrane qui activera l'ATP synthase.

Issu de : Begriche *et al.*, 2011

carbonée de 2 carbones par tour de cycle. Chaque tour de cycle permet la formation d'un acétyl-CoA qui servira pour l'alimentation du cycle de l'acide citrique présenté précédemment (Figure 4).

b. Respiration

La respiration est aussi appelée la phosphorylation oxydative. Elle a lieu à la membrane interne et implique 4 complexes protéiques membranaires : complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), complexe III (ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase), complexe IV (cytochrome *c* oxydase), et deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome *c*. Les NADH et FADH₂, principalement produits par le cycle de l'acide citrique, vont céder des électrons au complexe I et au complexe II respectivement. L'ubiquinone sert ensuite à transporter des électrons vers le complexe III. Enfin, c'est le cytochrome *c* qui va les acheminer au complexe IV où ils seront utilisés pour réduire l'oxygène (O₂) en eau (H₂O). Le transfert des électrons vers un porteur de plus haut potentiel permet aux complexes I, III et IV de coupler ce gain d'énergie à une pompe à protons. Cette pompe permet le passage de H⁺ depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Il se crée ainsi un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et un potentiel de membrane (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement). L'utilisation de cette force proton-motrice est alors utilisée par le complexe F₁F₀ ATP synthase. Ce complexe va coupler l'entrée des protons dans la matrice, avec la phosphorylation de l'ADP en ATP (Figures 3 et 4).

L'ATP est la principale forme d'énergie utilisée par la cellule *via* des enzymes dites « ATPase ». Elles utilisent l'énergie fournie par la déphosphorylation de l'ATP en ADP, pour permettre une activité endothermique, chimique ou mécanique.

c. Homéostasie calcique

La capacité de la mitochondrie à réguler l'homéostasie calcique a été mise en évidence dès 1961 par l'équipe de Engstrom. Le calcium (Ca²⁺) est un des plus importants messagers intracellulaires, avec l'AMPc et les cascades de phosphorylation par exemple. La transduction du signal dépendant du calcium nécessite sa fixation à des protéines tampons, son stockage dans des compartiments cellulaires et son extrusion hors de la cellule. La liaison de Ca²⁺ déclenche des modifications de la conformation de certaines protéines. Cela active ou inhibe

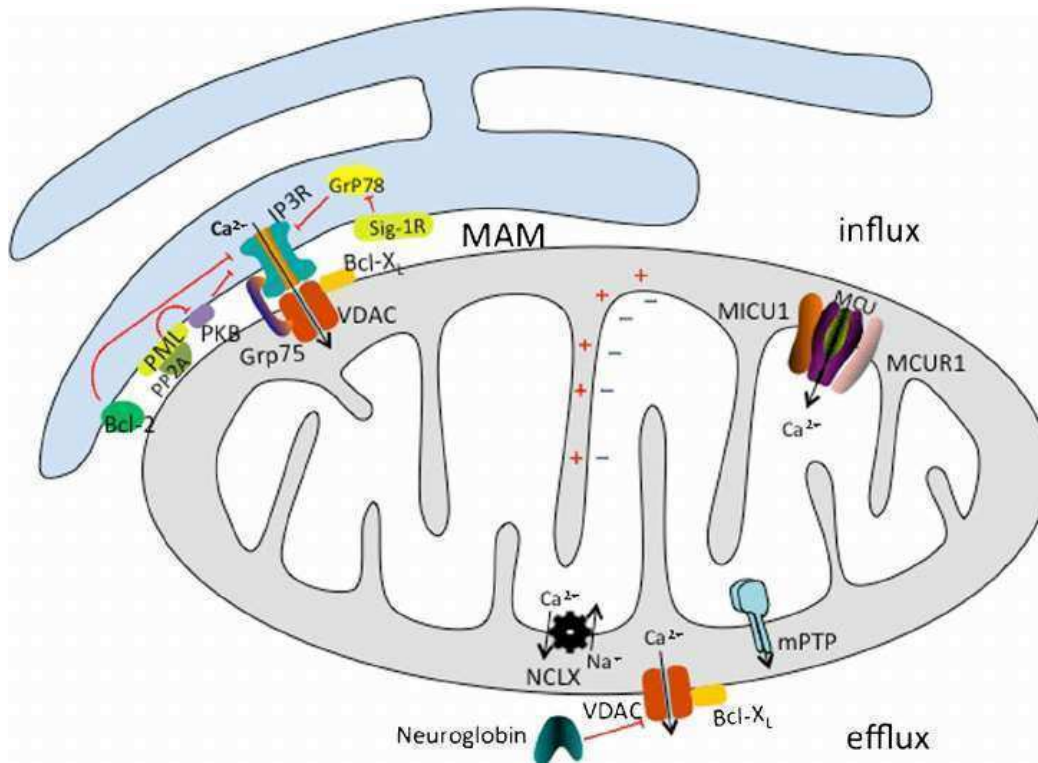


Figure 5. Localisation et fonction de la régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale.

Au niveau de la membrane interne, les influx calciques sont opérés par le complexe MCU sensible à la concentration de Ca²⁺ de l'espace intermembranaire. Les efflux sont permis par 2 canaux qui associent cette sortie à l'entrée de Na⁺ pour l'un et H⁺ pour l'autre. Le passage de la membrane externe nécessite l'ouverture de VDAC, aussi appelé porine. Elle permet notamment l'arrivée de calcium depuis le reticulum endoblastmique au niveau des MAM.

Issu de : Schäfer *et al.*, 2014

les fonctions des protéines ciblées. Les changements dynamiques de la concentration et de la localisation de Ca^{2+} permettent de déclencher de nombreux événements cellulaires incluant la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et la transmission synaptique. Pour éviter son activation non-pertinente et assurer sa réactivité, le calcium est stocké au niveau du réticulum endoplasmique (RE) d'où il peut être relâché très rapidement dans le cytosol. Le RE constitue d'ailleurs le plus gros réservoir de Ca^{2+} de la cellule. On le trouve notamment impliqué dans la voie de signalisation de l' IP_3 . Dans cette voie, l'interaction d'une protéine G avec PIP_2 à la membrane plasmique permet la libération d' IP_3 dans le cytosol. Celui-ci active alors les canaux calciques du RE. En ce qui concerne la mitochondrie, la matrice est très peu concentrée en calcium. Le passage à travers la membrane externe n'est pas contrôlé, s'effectuant grâce à la Porin (VDAC). A contrario, le passage à travers la membrane interne est dû à des transporteurs actifs permettant la sortie du Ca^{2+} contre son gradient. Pour autant, en cas d'excès de concentration du calcium dans le cytosol, des canaux calciques à la membrane interne, permettent son entrée massive et rapide dans la matrice. (Granatiero, De Stefani and Rizzuto, 2017) (Figure 5).

i) Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter (MCU)

L'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale est permise par le MCU ("Mitochondrial Calcium Uniporter", complexe de transport du Ca^{2+} mitochondrial). Ce complexe, identifié seulement très récemment, est composé de trois membres qui sont MCU, MCUB et EMRE. MCU et MCUB possèdent deux domaines transmembranaires séparés par un domaine en boucle exposé dans l'espace intermembranaire qui va permettre la régulation de l'activité du canal. Les séquences en acide aminé de MCU et MCUB sont très proches. La différence d'activité viendrait notamment de l'absence de deux acides aminés dans le domaine en boucle pour MCUB. Cette absence se traduirait par une perte d'affinité avec le calcium et une diminution de l'activité du canal. Le rapport entre MCU et MCUB semble donc être très important pour l'efficacité du transporteur. Enfin, EMRE est la dernière protéine à avoir été identifiée dans ce complexe. Elle est capable d'interagir avec le principal régulateur décrit pour ce canal, MICU1. Celle-ci va permettre l'activation du canal en condition d'excès de calcium cytosolique. Les autres régulateurs de l'activité du MCU sont tous les membres de la famille MICU, MCUR1 et SLC25A23 (De Stefani, Patron and Rizzuto, 2015).

ii) Canaux d'efflux

Les mécanismes d'export sont décrits depuis les années 1970. Il en existe deux : un transporteur antiport troquant l'entrée de $2H^+$ pour la sortie d'un Ca^{2+} ; et un autre permettant l'entrée de 3 ou 4 Na^+ (la stœchiométrie n'est pas encore déterminée avec certitude) pour la sortie d'un Ca^{2+} . Le premier est retrouvé dans quasiment tous les types cellulaires tandis que le second est spécifique des cellules musculaires.

iii) Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cellulaire

À la différence du réticulum endoplasmique, la mitochondrie n'a pas un rôle de stockage du calcium et cette capacité à l'accumuler n'est pas généralisée à toutes les mitochondries de la cellule. En effet, des études semblent montrer que l'internalisation du calcium est très localisée au niveau de microdomaines membranaires où sont associées les membranes du RE et des mitochondries. C'est là que l'on retrouve le MCU mais aussi les canaux du RE par lesquels le calcium est libéré depuis la lumière du réticulum (De La Fuente *et al.*, 2016). L'organisation de ces microdomaines est permise par l'existence, au niveau du RE, de « membranes associées à la mitochondrie » (MAMs) qui sont des structures permettant le rapprochement et les échanges entre les deux organites (Achleitner *et al.*, 1999). Les MCUs ayant une faible affinité pour le calcium, leur proximité au niveau des points d'interaction RE-mitochondrie feront de ces structures, les premières que rencontreront les ions Ca^{2+} (Pinton *et al.*, 2008).

d. Apoptose

L'apoptose constitue la forme de mort cellulaire programmée la plus répandue et la plus étudiée. Alors que des agressions environnementales peuvent entraîner des morts cellulaires comme la nécrose, qui aboutiront à la libération de facteurs fortement délétères pour les cellules voisines, l'apoptose est considérée comme une mort propre. Des stimuli, internes ou externes, vont mener à l'activation de protéases à cystéines spécifiques appelées caspases. Ce nom est un acronyme de « cystein-dependent aspartate-specific proteases » décrivant leur activité enzymatique : la catalyse par une chaîne latérale cystéine des liaisons peptidiques au niveau d'un résidu d'acide aspartique. Ces caspases sont les effecteurs de la dégradation de constituants cellulaires, conduisant à la formation de corps apoptotiques.

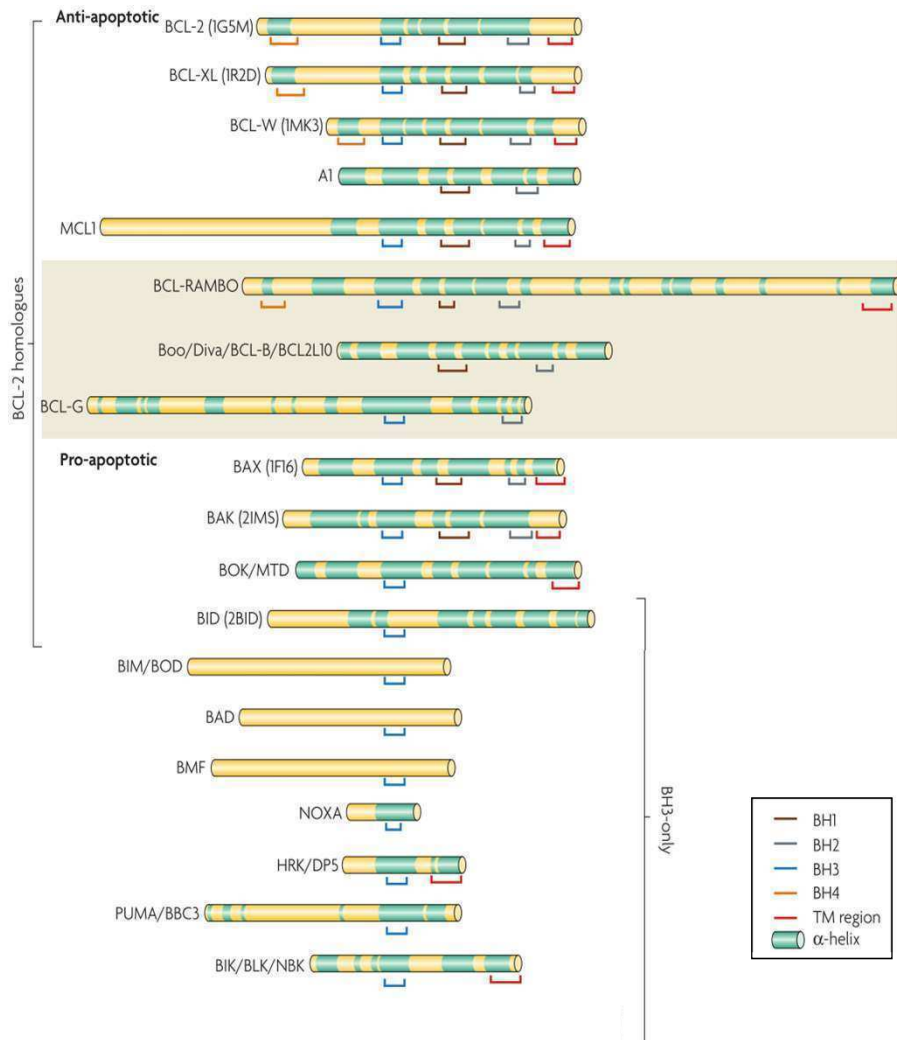


Figure 6. Alignement des séquences des protéines de la famille Bcl-2.

Les domaines BH1, BH2 et BH3 se conforment pour former un poche hydrophobe qui peut lier les peptides BH3-only. Les cinq premières protéines sont généralement anti-apoptotiques. Le rôle des trois protéines dans le rectangle plus sombre sont moins bien décrites et ne peuvent pas encore être caractérisées. Les 11 dernières protéines sont pro-apoptotiques.

Issu de : Youle and Strasser, 2008

Ceux-ci, peuvent alors être pris en charge par les cellules avoisinantes limitant une réaction inflammatoire au sein du tissu. Pour aboutir à ce résultat, deux voies majeures sont décrites : la voie intrinsèque, principalement déclenchée par des signaux internes à la cellule tels que des dommages de l'ADN, qui débutera par l'activation de facteurs de transcription tels que p53 ; la voie extrinsèque, déclenchée par l'interaction d'un récepteur à "domaine de mort" tel que FAD avec son ligand au niveau de la membrane plasmique. Les deux voies aboutiront à l'activation des caspases. Je m'attacherai dans les trois paragraphes ci-dessous à décrire succinctement les événements mitochondriaux qui, chez les mammifères, participent à ce qu'on appelle la voie intrinsèque d'activation de l'apoptose, à savoir : la perméabilisation de la MEM par des membres de la famille Bcl-2, la libération du cytochrome c et des protéines Smac/DIABLO et Htra2/Omi. (Estaquier *et al.*, 2012). L'implication des mitochondries dans l'apoptose chez *Drosophila melanogaster* fera l'objet d'une plus large partie présentée dans la seconde partie de cette introduction (B).

i) La famille Bcl-2

La famille Bcl-2 regroupe un ensemble de gènes codant à la fois de facteurs pro- et anti-apoptotiques. Cette famille doit son nom au premier membre de la famille identifiée, le gène *bcl-2*, mis en évidence dans le cas du lymphome folliculaire humain à cellules B (*B-cell lymphoma*). Dans cette pathologie, une translocation t(14;18) place le gène *bcl-2* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline, augmentant fortement la production de protéine Bcl-2. Il a été montré que, contrairement à beaucoup d'oncogènes, Bcl-2 n'a pas d'activité favorisant la prolifération cellulaire. En effet, si Bcl-2 a un rôle pro-oncogénique, c'est grâce à sa capacité à inhiber l'apoptose. Ainsi, les cellules qui auraient dû entrer en apoptose, suite à l'accumulation de dommages à l'ADN, vont être maintenues en vie au sein du tissu. Si d'autres altérations favorisant le processus oncogénique sont acquises par la cellule (insensibilité aux signaux de d'arrêt de la division cellulaire, autosuffisance aux signaux de croissance et prolifération cellulaire illimitée) celle-ci devient alors tumorale (Youle and Strasser, 2008).

On dénombre 14 gènes appartenant à la famille Bcl2 chez les mammifères (Figure 6). Ces gènes codent des protéines qui présentent des domaines BH conservés, pour Bcl-2 Homologie Domaine (BH1, BH2, BH3 et BH4), et pour certaines une séquence d'ancrage membranaire. Les protéines anti-apoptotiques de la famille comprennent des domaines BH1,

BH2, BH3 et parfois BH4 (comme Bcl-2 et Bcl-XL). Les pro-apoptotiques sont de deux types celles comprenant des domaines BH1, BH2 et BH3 (Bax, Bok, Bak...) et celles ne possédant qu'un unique domaine BH3 et appelées « BH3 only » (Bad, Bid, Bim...). L'action de ces *BH3-only* passe par leur capacité à se lier avec les autres membres de la famille Bcl-2 en inhibant leur activité dans le cas des membres anti-apoptotiques ou en la stimulant dans le cas des membres pro-apoptotiques. Ces derniers sont les effecteurs de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe observée au cours du déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose. (Martinou and Youle, 2011).

Alors que Bak est constitutivement à la MEM, Bax reste cytosolique dans les cellules saines et sera adressée à la mitochondrie en cas de déclenchement de l'apoptose. Cette relocalisation va permettre à Bax de s'oligomériser avec Bak pour former des pores au niveau de la membrane externe mitochondriale (Wei *et al.*, 2001). Ces pores vont entraîner la sortie de l'espace intermembranaire de facteurs déterminant pour le processus apoptotique, comme le cytochrome *c* et les protéines Smac/DIABLO et Htra2/Omi sur lesquels je reviendrais (Goldstein *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001).

Dans les cellules saines, Bax est inhibée par l'action de Bcl-2 et Bcl-XL qui vont interagir avec son domaine BH3. Le recrutement de Bax à la membrane est permis par l'action des protéines *BH3-only*. D'une part, elles inhibent son interaction avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par compétition au niveau du domaine BH3 de celles-ci ; d'autre part, elles favorisent l'oligomérisation de Bax et Bak (Eskes *et al.*, 2000).

ii) *Cytochrome c*

Comme nous l'avons vu précédemment, le cytochrome *c* est un élément essentiel dans la respiration mitochondriale. Il permet le transfert des électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire. Outre son rôle dans la phosphorylation oxydative, il est aussi requis pour l'activation des caspases. Chez les mammifères, cette activation est opérée par un complexe nommé apoptosome. Ce complexe est formé par l'interaction du cytochrome *c* avec la protéine Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1) dans le cytosol. La perméabilisation de la MEM, par l'action de Bax et Bak, va permettre au cytochrome *c* de se relocaliser dans le cytosol et d'interagir avec Apaf-1. Cette interaction est au centre de la formation de l'apoptosome (Zou *et al.*, 1999). Une fois formé, ce complexe est capable de

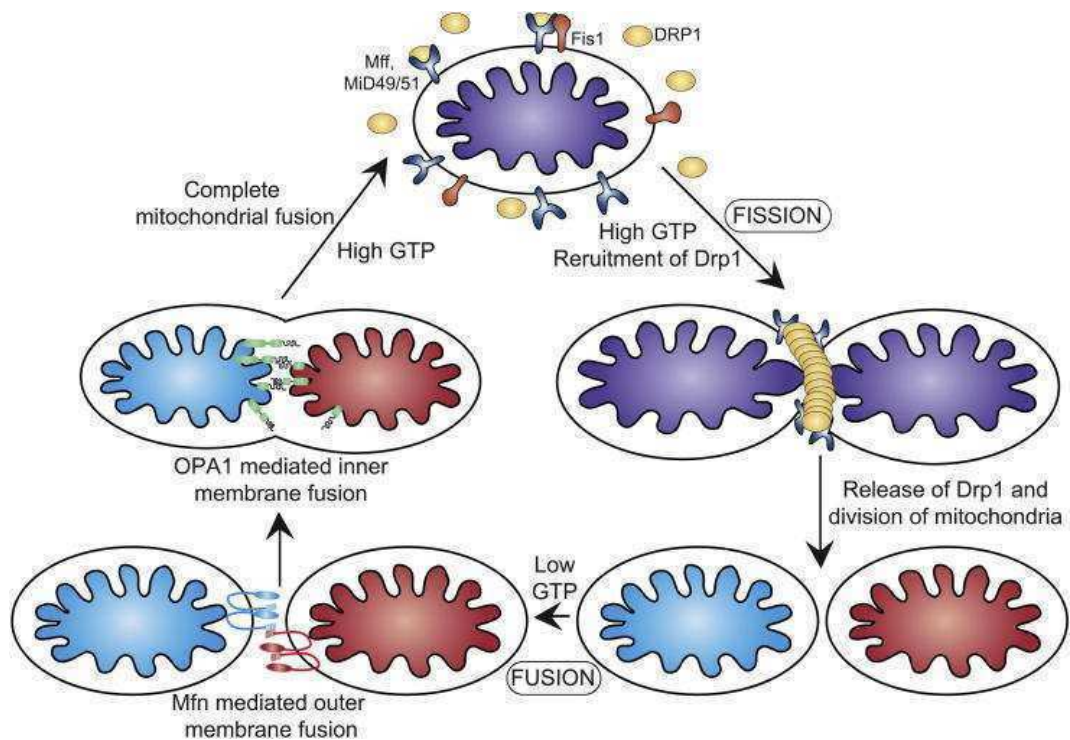


Figure 7. Équilibre fusion/fission mitochondrial.

L'état d'équilibre de la morphologie mitochondriale requière une balance entre des événements de fission et de fusion. La division de l'organite est opérée par Drp1 qui forme un oligomère de haut poids moléculaire à la surface mitochondriale. La fusion est un processus en 2 étapes qui requière la fusion des membrane externe puis interne. Cette première est facilitée par l'accrochage de mitofusines de membranes adjacentes. OPA1 permet la fusion de la membrane interne.

Issu de : Osellame *et al.*, 2012

déclencher la cascade d'activation des caspases en induisant notamment l'autoclivage de la caspase 9, une caspase initiatrice de la voie intrinsèque de l'apoptose.

iii) *Smac/DIABLO et Htra2/Omi*

Il a été découvert un peu plus tard, que d'autres facteurs mitochondriaux se relocalisaient au cytosol lors du processus apoptotique. Ils acquièrent alors une activité pro-apoptotique. C'est le cas de la protéine Smac/DIABLO, qui doit ses noms à sa découverte par deux équipes de chercheurs en parallèle. Ces équipes ont pu mettre en évidence qu'elle était capable d'augmenter l'activité de la caspase 3, l'une des caspases effectrices dans la voie intrinsèque de l'apoptose, en interagissant avec XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un inhibiteur des caspases (Verhagen *et al.*, 2000).

Il en va de même pour la protéase Htra2/Omi, découverte très peu de temps après, qui est aussi libérée de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol et peut se lier avec XIAP ou d'autre IAP pour induire leur dégradation et favoriser l'apoptose (Suzuki *et al.*, 2001; Vande Walle, Lamkanfi and Vandenabeele, 2008).

3. Dynamique

Les mitochondries ne sont pas des organites isolés et figés comme les premières images permettant leur observation ont pu le laisser croire. Elles constituent en fait un réseau particulièrement actif qui est capable de se remodeler en fonction des besoins de la cellule ou du tissu. Pour générer cette dynamique, la régulation des niveaux de fission et fusion mitochondriales est central (Figure 7). Le rapport fission/fusion est modulé pour permettre, par exemple, au déplacement des mitochondries, au contrôle qualité mitochondrial et donc est déterminant pour différents processus cellulaires comme la division et la survie cellulaire.

Ainsi, dans certains types cellulaires, les mitochondries accentuent leur fission et se relocalisent à des sites particuliers différents du site de biogenèse. C'est le cas des neurones, par exemple, dans lesquels on observe un acheminement des mitochondries depuis le corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone. Dans le cas de la croissance cellulaire, de la division cellulaire ou du remplacement des mitochondries défectueuses, les quantités de mitochondries vont être modulées. La régulation de cette dynamique mitochondriale est nécessaire à la plasticité fonctionnelle de la cellule et demande un contrôle précis des événements de fission et fusion mitochondriaux.

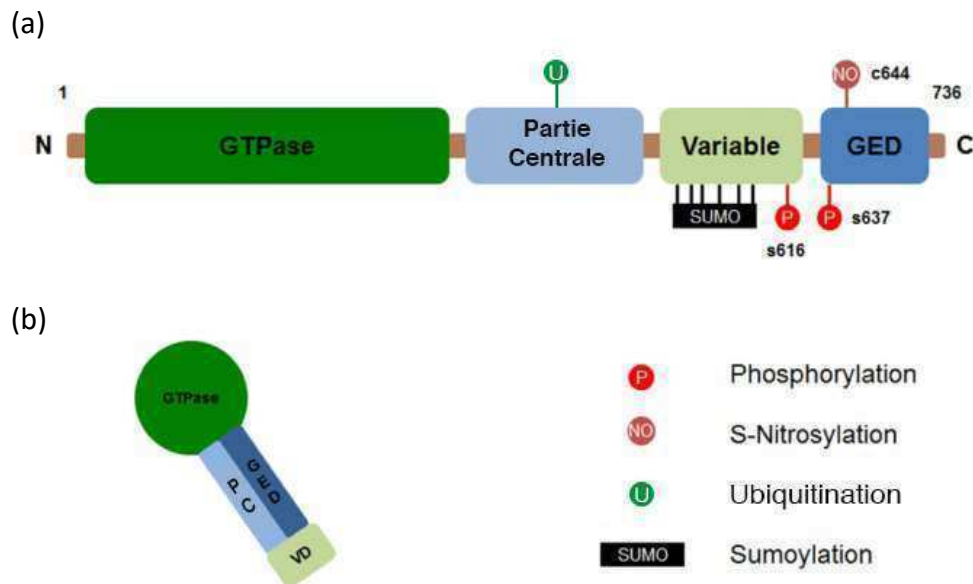


Figure 8. Organisation des domaines et modifications post-traductionnelles de Drp1.

(a) Structure des domaines et modifications post-traductionnelles. De nombreuses modifications post-traductionnelles de Drp1 régulent l'activité GTPase de Drp1 ce qui affecte sa capacité à induire la fission mitochondriale.

(b) Structure repliée de Drp1.

VD, domaine variable; GED, domaine GTPase effecteur; PC, partie centrale; P, phosphorylation; NO, S-Nitrosylation; U, Ubiquitination; SUMO, Sumoylation

Adapté de : Cho, B. *et al.*, 2013

a. Fission mitochondriale

i) *Les protéines effectrices et régulatrices de la fission mitochondriale*

La fission est au centre de la dynamique mitochondriale. Plusieurs protéines sont responsables de la formation des vésicules à commencer par les membres de la famille des dynamines. L'action de cette famille de GTPases passe par la formation d'un anneau contractile au niveau d'invaginations de la surface des membranes intracellulaires et plasmiques qui va séparer la vésicule formée de sa membrane d'origine en appliquant une pression mécanique. La liaison à une molécule de GTP est importante pour la formation de l'anneau alors que la déphosphorylation est nécessaire pour le détachement de la vésicule. La *Dynamamin-related Protein 1* (Drp1) est une dynamine fortement impliquée dans les mécanismes de fission mitochondriale et peroxysomale (Smirnova *et al.*, 2001). Cette protéine de 736 acides aminés chez les mammifères, possède un domaine GTPase C-terminal, un domaine central et un domaine GTPase effecteur (GED) qui régule l'hydrolyse du GTP (Figure 8). Alors qu'elle est localisée constitutivement dans le cytosol, Drp1 peut être recrutée à la mitochondrie par des protéines réceptrices telles que Mff, Fis1, MiD49 ou MiD51, que ce soit indépendamment (Loson *et al.*, 2013) ou de manière coordonnée entre elles (Zhang *et al.*, 2016). Le processus de fission mitochondriale est conservé et il existe un homologue de Drp1 chez *Drosophila melanogaster* portant le même nom et présentant des fonctions similaires (Verstreken *et al.*, 2005).

Fis1, un des partenaires de Drp1, est une protéine mise en évidence peu de temps après celle-ci (James *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003). Elle possède, en C-terminal, un domaine d'ancrage à la membrane externe mitochondriale tandis que son extrémité N-terminal est exposé dans le cytoplasme (Suzuki *et al.*, 2003). Chez les mammifères, l'extrémité N-terminal possède un site potentiel d'interaction avec Drp1, ce qui expliquerait pourquoi cette protéine est importante dans le processus de fragmentation mitochondriale médiée par Drp1. Bien que ce rôle semble conservé par l'homologue de drosophile (Ziviani, Tao and Whitworth, 2010), il existe peu d'études dans ce modèle.

D'autres protéines ont été mises en évidence comme récepteurs mitochondriaux de Drp1 chez les mammifères comme facteur de fission mitochondriale (Mff), une protéine permettant le recrutement de Drp1 à la fois à la mitochondrie et au peroxysome (Gandre-

Babbe and van der Blik, 2008). *Tango11* est l'homologue de ce gène chez la *D. melanogaster*. Les protéines MiD49 et MiD51 (pour *Mitochondrial dynamics proteins*) sont également décrites comme plateforme de recrutement de Drp1 à la mitochondrie chez les mammifères (Palmer *et al.*, 2011) mais elles ne présentent pas d'homologues chez la drosophile.

Enfin, des mutations du gène *GDAP1* (*Ganglioside-induced differentiation associated protein 1*) ont été associées à des formes récessives de la maladie neurodégénérative de Charcot-Marie-Tooth de type 4A (Cuesta *et al.*, 2002). La protéine codée par *GDAP1* ressemble aux glutathione S-transférases mais possède un domaine transmembranaire et un domaine d'adressage à la mitochondrie (Wagner *et al.*, 2009). Elle interagit avec Drp1 et Fis1 pour induire la fission mitochondriale mais semble pouvoir réguler, par ailleurs, la production d'Espèce Activée de l'Oxygène (EAO) et le potentiel de membrane mitochondriaux (Niemann *et al.*, 2009). Il existe un orthologue du même nom chez *D. melanogaster* qui est aussi impliqué dans la régulation de la dynamique mitochondriale (López Del Amo *et al.*, 2015).

Chez la drosophile, *PMI* (*Pantagruelian Mitochondrion I*) code pour une protéine de la membrane interne mitochondriale. Des travaux récents ont permis de mettre en évidence la capacité de cette protéine à induire la fission mitochondriale indépendamment de Drp1 (Rival *et al.*, 2011). Cette capacité est due à son activité inhibitrice sur la morphogénèse de la matrice mitochondriale et est fortement associée à l'activité de la chaîne respiratoire. *TMEM11* est l'homologue de *PMI* chez l'homme (Macchi *et al.*, 2013).

ii) Description du mécanisme de fission

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le recrutement de Dnm1, l'homologue de Drp1, par Fis1 est déjà démontré. En revanche, les mécanismes de recrutement de Drp1 chez les mammifères sont plus discutés. Comme nous l'avons vu précédemment, cette fonction est assurée par plusieurs facteurs en plus de Fis1 : Mff, MiD49 (codé par *MIEF2*) et MiD51 (codé par *MIEF1*). Selon les études les plus récentes, il semblerait que ces facteurs puissent interagir entre eux pour permettre le recrutement de Drp1. Chez la drosophile, la protéine réceptrice de Drp1 à la mitochondrie n'est pas connue.

Une fois à la mitochondrie, Drp1 agit en s'oligomérisant. En effet, la liaison au GTP permet à Drp1 de modifier sa conformation. Ce changement de conformation induit son auto-assemblage sous forme d'anneaux composés de 16 monomères, pour les plus abondants, présentant un diamètre intérieur de ~20nm et extérieur de ~30nm. Si des

analogues de GTP non-hydrolysables sont liés aux monomères, ce sont alors des structures en spirales de ~36nm de diamètres qui se forment et suite à cette oligomérisation , Drp1 n'a plus la capacité à induire la fission mitochondriale (Basu *et al.*, 2017). Ainsi le fonctionnement de Drp1 ressemble énormément au fonctionnement des dynamines.

iii) Régulations de la fission mitochondriale

Drp1 étant la protéine centrale de la fission mitochondriale, son activité est finement régulée notamment par de nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 8).

La régulation post-traductionnelle de Drp1 peut se faire par plusieurs types de modifications. Premièrement, la protéine Drp1 peut être phosphorylée. Plusieurs sites de phosphorylations ont été décrits pour moduler positivement ou négativement son activité. La fission mitochondriale est notamment importante au cours de la division cellulaire, afin de permettre la répartition des mitochondries entre les deux cellules filles. Concernant ce processus, il a été montré dans des cellules HeLa, que le complexe cycline B/CDK1 (cyclin dépendant kinase 1) permet la phosphorylation du résidu sérine 616 de Drp1. L'ajout d'un groupement phosphate sur cet acide aminé situé dans la région GED de Drp1 permet l'activation de la fission mitochondriale. À l'inverse, la phosphorylation du résidu sérine en 637 par la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) induit une diminution de cette activité. Ces données sont rappelées dans la revue (Nan *et al.*, 2017). Ces sites de phosphorylation sont conservés chez le nématode et la drosophile.

Par ailleurs, Drp1 peut également être régulée par ubiquitination. Chez les mammifères, la protéine MARCH5, une E3-ubiquitine ligase de la membrane externe mitochondriale, est capable d'ubiquitiner Fis1 et Drp1. Il a été mis en évidence que la surexpression du gène codant MARCH5 conduit à la formation d'un réseau mitochondrial tubulaire alors qu'une mutation de son domaine "really interesting new gene (RING) finger" aboutit à une fragmentation mitochondriale. Ces données vont dans le sens d'une régulation négative de Drp1 par MARCH5 (Nakamura *et al.*, 2006; Yonashiro *et al.*, 2006). Des résultats contradictoires, obtenus peu de temps après, montrent que cette ubiquitination serait, à l'inverse, activatrice et même requise pour l'activité de Drp1 (Karbowski, Neutzner and Youle, 2007). La relation entre Drp1 et MARCH5 nécessite donc d'être davantage explorée. Il existe un homologue de *MARCH5* chez la drosophile (*CG9855*) mais aucune étude n'a, pour le moment, montré son implication dans la régulation de la dynamique mitochondriale.

Une autre régulation possible de Drp1 se fait par SUMOylation. Ce mode de régulation, qui présente des mécanismes proches de ceux de l'ubiquitination, est médié par la protéine Sumo1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1). Les données de la littérature suggèrent que la sumoylation protège Drp1 de l'ubiquitination conduisant à la dégradation. Elle conférerait une meilleure stabilité à Drp1 et pourrait être augmentée par Bax/Bak au cours de l'apoptose (Harder, Zunino and McBride, 2004; Wasiak, Zunino and McBride, 2007; Figueroa-Romero *et al.*, 2009).

Enfin, une activation de la fission mitochondriale a été mise en évidence dans le cas d'une régulation par S-Nitrosylation de Drp1. Un groupement d'oxyde nitrique est ajouté sur un résidu Sérine dans le domaine GED, proche du résidu phosphorylé par CDK1 comme décrit précédemment. L'effet de cette S-Nitrosylation reste discuté concernant ses conséquences sur l'activité de Drp1, certains résultats allant dans le sens d'une augmentation de son activité GTPase et de son oligomérisation, tandis que d'autres ne montrent pas d'effet de cette modification sur ces mécanismes (Cho *et al.*, 2009; Bossy *et al.*, 2010). Pour le moment, cette modification post-traductionnelle n'a pas été mise en évidence chez *D. melanogaster*.

b. Fusion mitochondriale

i) *Les protéines effectrices et régulatrices de la fusion*

Chez les mammifères, la fusion mitochondriale est principalement effectuée par les Mitofusines 1 et 2 pour ce qui est de la membrane externe et OPA1 pour la membrane interne.

Tout comme OPA1, les Mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) sont des GTPases de la famille des dynamines. Elles sont constituées de 750 acides aminés environ et sont codées par les gènes *MFN1* et *MFN2*. MFN1/2 sont des protéines transmembranaires. Elles possèdent un domaine GTPase N-terminal localisé dans le cytosol et deux motifs hydrophobes également cytosoliques (HR1 et 2) et localisés de part et d'autre du domaine transmembranaire. Le motif HR2 qui se trouve en C-terminal, permet l'interaction entre les mitochondries destinées à fusionner (Santel and Fuller, 2001). L'effet de la déficience de l'une ou l'autre de ces protéines est partiellement supprimée par la surexpression de l'autre (Chen *et al.*, 2003), tandis que la double déficience mène à une abolition totale de la fusion mitochondriale (Chen, Chomyn and Chan, 2005). Des différences sont à noter au niveau de l'expression de leurs gènes. L'expression de *MFN1* est ubiquitaire tandis que *MFN2* est plus fortement exprimée dans

certaines tissus comme le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau (Santel *et al.*, 2003). L'homologue de *MFN2*, chez la drosophile, est *Marf* et il existe un autre membre de la famille des mitofusines : *fzo* (fuzzy onions). Tandis que le premier remplit le rôle ubiquitaire de *MFN1* chez les mammifères, *fzo* semble restreint à une activité dans la formation des spermatozoïdes.

La protéine OPA1 (Optic Atrophy 1) est importante dans la fusion de la MIM et dans le remodelage des crêtes mitochondriales. L'expression du gène *OPA1* est ubiquitaire mais conduit, via un épissage alternatif, à la production de plusieurs formes d'OPA1 (Akepati *et al.*, 2008). Les peptides ainsi produits sont ensuite clivés afin de générer d'une part une forme longue, possédant un domaine transmembranaire ancré à la MIM ; et d'autre part, une forme courte localisée dans l'espace intermembranaire. La première est très importante pour le mécanisme de fusion mitochondriale, tandis que la deuxième est impliquée dans l'activité de la chaîne respiratoire (Del Dotto *et al.*, 2017). Il existe un homologue d'OPA1 chez la drosophile portant le même nom.

ii) *Mode de fonctionnement des protéines responsables de la fusion mitochondriale*

Ce sont MFN1 et MFN2 qui initient la fusion mitochondriale. Localisées à la surface des mitochondries à fusionner, elles vont interagir entre elles depuis chacune des membranes. Cela se fait grâce aux domaines hydrophobes HR2, décrit précédemment, qui va se lier au domaine analogue de la protéine en vis-à-vis (Koshiba *et al.*, 2004). Un changement conformationnel permettra alors de créer un contact entre les membranes adjacentes ce qui aboutira à la fusion. Ce changement ferait intervenir l'hydrolyse du GTP. De plus, des études ont montré la capacité pour les MFNs et OPA1 d'interagir entre-elles en des points de contact MIM/MEM (Guillery *et al.*, 2008). L'absence d'OPA1 ou de MFN1 bloque la fusion mitochondriale (Cipolat *et al.*, 2004; Chen, Chomyn and Chan, 2005). Le mode d'action d'OPA1 régissant cette fusion reste, pour le moment, inconnu. La localisation ainsi que la similitude d'OPA1 avec les dynamines laissent penser que c'est en agissant sur la courbure de la MIM qu'OPA1 favorisera la fusion. Chez *D. melanogaster*, *Marf* et *Opa1*, les homologues de MFN2 et OPA1, sont également requis dans le mécanisme de fusion (Dorn *et al.*, 2011; Rai, Katti and Nongthomba, 2014).

iii) Régulations de la fusion mitochondriale

Il existe de nombreux modes de régulation de la fusion mitochondriale, ceux-ci pouvant moduler l'activité des MFNs ou d'OPA1. Ils sont d'ailleurs prépondérants dans la réponse de la cellule aux différents événements tels que le cycle cellulaire ou l'apoptose.

Dans les cellules mammifères, l'ubiquitination de MFN2 par Parkin, une E3-ubiquitine ligase que j'évoquerais plus tard (A)) va mener à la dégradation de MFN2 et à une inhibition de la fusion mitochondriale (Gong *et al.*, 2015). Par ailleurs, il a pu être observé que la suppression d'un inhibiteur de la deubiquitine mitochondriale USP30 menait à la stabilisation de MFN2. Cette stabilisation est associée à la liaison d'une ubiquitine n'induisant pas de dégradation (Leboucher *et al.*, 2012). Ces résultats paraissent contradictoires, toutefois, pourraient s'expliquer par on ne peut exclure la présence d'au moins deux sites de liaison à l'ubiquitine, l'un étant pro-dégradation tandis que l'autre serait stabilisateur.

Par ailleurs, l'activité des mitofusines peut également être régulée par phosphorylation. Une forme non-phosphorylable de MFN2 a un effet protecteur contre le stress induit par un agent génotoxique, la doxorubicine. Cette phosphorylation est effectuée par la Jun kinase JNK et est associée à la fragmentation mitochondriale et à l'apoptose (Leboucher *et al.*, 2012). De façon différente, la phosphorylation de la Thréonine 562 de MFN1 par ERK inhibe son activité GTPase et sa capacité à s'oligomériser. Cela se traduit par une fragmentation mitochondriale et de l'apoptose (Pyakurel *et al.*, 2015). Ainsi la phosphorylation des MFNs peut engendrer des effets opposés sur leur activité.

Le niveau de fusion mitochondrial peut également être régulé par une régulation de la transcription des gènes *MFN1* et *MFN2*. Les protéines PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1) α et β sont décrites comme les deux co-activateurs de NRF-1/2 (nuclear respiratory factors-1/2) et ERR α (nuclear estrogen-related receptor α). Ces facteurs de transcription ont un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes codant les protéines de la chaîne respiratoire et dans la biogénèse mitochondriale. Ils seront abordés par la suite (A.d). Il a été mis en évidence chez la souris, qu'en interagissant avec ERR α , PGC-1 α et β peuvent respectivement augmenter l'expression des gènes *MFN1* et *MFN2* (Liesa *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2014). Enfin, il existe une régulation des quantités d'ARNm *MFN1* impliquant l'action de mir-140, un micro-ARN dont l'expression est observée

dans l'apoptose de cardiomyocytes (Li *et al.*, 2014). En modifiant la quantité de MFNs, les cellules vont modifier l'équilibre de la dynamique cellulaire.

L'activité de OPA1 peut être régulée de manière très fine du fait de l'existence de deux isoformes et du rapport entre les quantités de ces isoformes (il y en a deux c'est cela ?). La régulation de cette balance est permise par l'action de protéases mitochondriales. Les deux formes sont importantes pour le bon fonctionnement des mitochondries saines. L'accumulation de formes courtes active est observée dans deux conditions : suite à l'action de la protéase YME1L en présence d'une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial et de la production énergétique, (Mishra *et al.*, 2014) ou suite à l'action de la protéase OMA1 en réponse à une chute du potentiel mitochondrial ou sous l'effet de stress variés (Baker *et al.*, 2014). Alors que le gène *OMA1* n'est pas retrouvé dans le génome de la drosophile, il existe un homologue de *YME1L* portant le même nom. Cependant si l'importance d'*YME1L* est bien démontrée dans la régulation de la morphogénèse des crêtes mitochondriales et de l'apoptose, aucun lien direct n'a encore pu être établi avec la régulation d'Opa1, et donc la fusion mitochondriale chez la drosophile (Qi *et al.*, 2016). En revanche, la capacité de Rhomboid-7 (Rho-7), une protéase mitochondriale homologue de la protéine PARL (Preselinin-associated Rhomboid-like protease) de mammifère, à cliver Opa1 est bien établi (Rahman and Kylsten, 2011).

Hormis les clivages de OPA1 qui régulent son activité, d'autres modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence dont les effets ne sont pas encore clairs. Ainsi il a été mis en évidence que les lysines 926 et 931 (K926 et K931) de OPA1 étaient acétylées dans des cellules dépourvues de SIRT3, une déacétylase connue pour son implication dans la réponse mitochondriale aux protéines mal conformées (UPR^{mt}). Ces acétylations s'accompagnent d'une diminution de la fusion mitochondriale et d'un blocage de l'activité GTPase d'OPA1 (Samant *et al.*, 2014). Ces modifications n'ont pour le moment pas été observées chez la drosophile.

c. Trafic mitochondrial

Bien que moins importante que les phénomènes de fission/fusion mitochondriale, la capacité à gérer la localisation des mitochondries dans la cellule est prépondérante dans la dynamique mitochondriale. Ces processus sont réalisés par des protéines permettant de relier

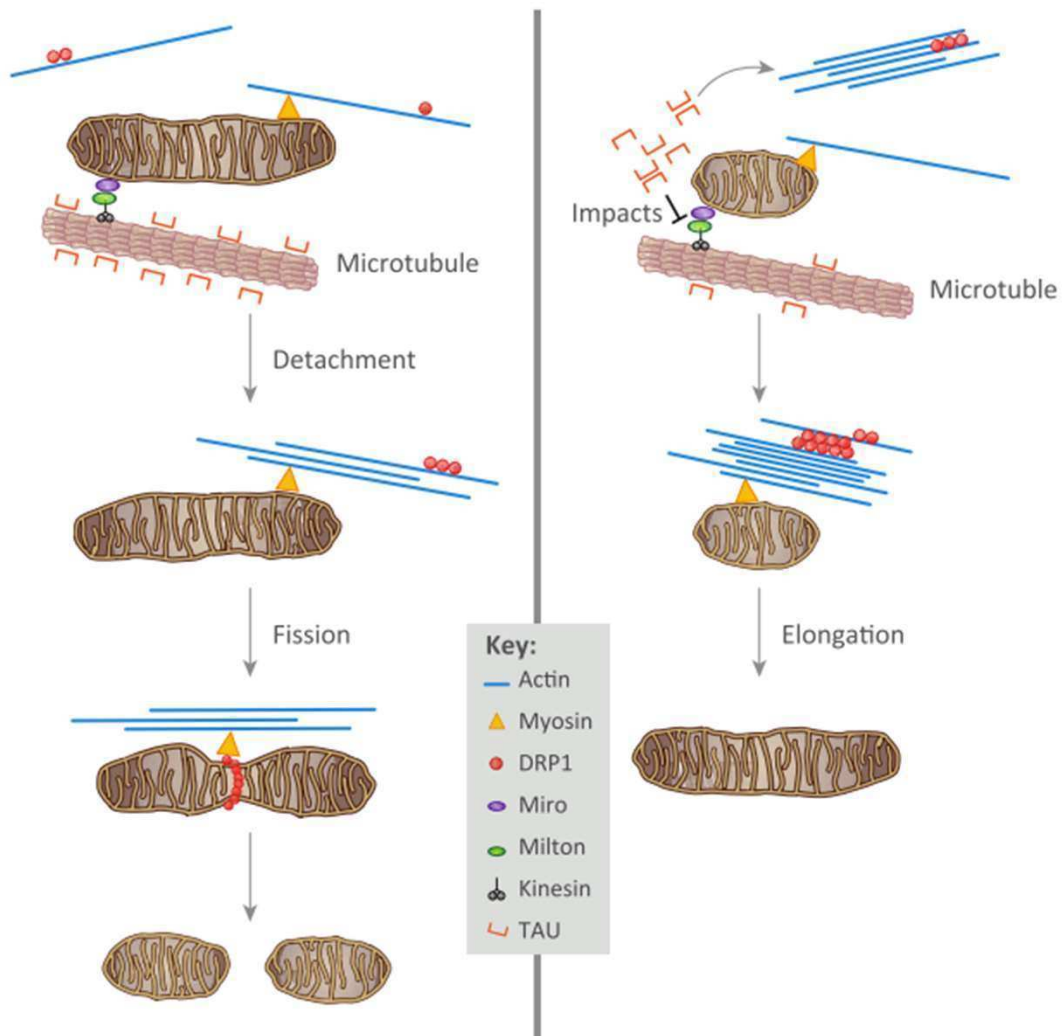


Figure 9. Transport mitochondrial et fission mitochondriale

Les mitochondries sont principalement transportées le long des microtubules. Ce transport est réalisé grâce aux protéines Miro et Milton qui font la liaison avec les kinésines. Quand les mitochondries sont liées à l'actine, la fission est facilitée (gauche). Une présence élevée de TAU (droite), comme c'est le cas dans la maladie de Parkinson, détache les mitochondries des microtubules. Cela conduit à une augmentation de l'actine-F, détruisant l'interaction physique avec Drp1. Cela mène à une elongation mitochondriale et à de la neurodégénérescence.

Issu de : DuBoff *et al.*, 2013

les mitochondries aux microfilaments d'actine, aux filaments intermédiaires et aux microtubules (Anesti and Scorrano, 2006).

La liaison de la mitochondrie avec les microfilaments d'actine (MF) est prépondérante chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces MF ont un rôle avéré de régulateur de la localisation et du transport mitochondrial (Simon, Karmon and Pon, 1997). A l'inverse, chez les mammifères, les microfilaments ne semblent impliqués que dans les déplacements sur des courtes distances dans les régions cellulaires plus pauvres en microtubules. Le rôle de l'actine dans le transport mitochondrial chez les eucaryotes supérieurs reste peu clair, notamment parce que des résultats contradictoires sont présentés dans la littérature. Prenons l'exemple de la myosine un moteur moléculaire associé aux microfilaments d'actine. Un lien entre les mitochondries et la myosine V a pu être établi. Dans certains types cellulaires, elle colocalise clairement avec les mitochondries, tandis que dans d'autres types cellulaires, mitochondrie et myosine ne colocalisent que partiellement. Cependant, le réseau d'actine est impliqué de façon évidente dans la formation des points d'échanges de membranes entre le RE et la mitochondrie et dans le processus apoptotique (Yi, Weaver and Hajnóczky, 2004; Varadi, Tsuboi and Rutter, 2005) Dans certaines maladies neurodégénératives, la modulation du transport des mitochondries est fortement impliquée dans la perte de la capacité à déclencher la fission mitochondriale. Cette implication est présentée dans la figure 9.

Les filaments intermédiaires (FI) forment des structures plus stables et sont fortement impliqués dans la résistance mécanique des cellules et des tissus. La composition de ces FI va varier d'un type cellulaire à l'autre. Leur capacité à réguler le trafic et la localisation mitochondriale reste, pour le moment, assez obscure. Le rôle de la Desmine, une protéine capable de former des FI dans les cellules cardiaques et musculaires, est le mieux caractérisé. En effet, elle permet la bonne répartition des mitochondries dans les fibres musculaires. De plus, elle joue un rôle dans les modifications de la morphologie mitochondriale induites par la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Enfin, dans certaines cellules, la trichoplein, une protéine associée à la kératine, se lie avec la mitofusine pour permettre l'ancrage de la mitochondrie au réseau de FI (Silvander *et al.*, 2017).

Pour finir, le réseau le plus important dans le trafic mitochondrial intracellulaire chez les eucaryotes supérieurs, est le réseau de microtubules (MT). Dans l'étude des mouvements mitochondriaux, que ce soit dans les axones notamment, ou dans le contexte de la mitophagie (sujet abordé plus tard), un grand nombre d'études a mis en évidence l'utilisation du réseau

de MT. Ce réseau très dynamique est constitué d'hétéro-dimères formé d' α -tubuline et de β -tubuline. Ces microtubules servent de structures pour le déplacement des protéines motrices comme les kinesines (allant vers l'extrémité la plus dynamique ou "+") et les dynéines (allant vers l'extrémité la plus stable ou "-"). Ainsi, des membres des familles 1 et 3 des kinésines sont impliqués dans le transport des mitochondries. Cette activité est permise par leur interaction avec des protéines présentes à la mitochondrie. Par exemple, la protéine Milton, d'abord découverte chez la drosophile, est impliquée dans la formation d'un complexe nécessaire à l'établissement du lien avec les kinésines. Miro est la deuxième protéine essentielle à ce complexe (Hollenbeck and Saxton, 2005).

d. Biogenèse des mitochondries

Le processus de biogénèse est nécessaire pour augmenter le pool mitochondrial de manière contrôlée dans des conditions de croissance cellulaire, de division cellulaire ou de renouvellement mitochondrial. Ainsi, il a été mis en évidence la régulation des mécanismes de biogénèse mitochondrial par des activateurs de transcription centraux : PGC-1 α et β (Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1 α et β). PGC-1 α interagit notamment avec les récepteurs NRF1 et 2 au niveau du noyau pour aller réguler positivement la transcription de gènes impliqués dans le renouvellement du pool mitochondrial. C'est le cas par exemple des gènes codant les mitofusines décrites précédemment (Liesa *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2014). On retrouve un orthologue de *pgc-1* chez *D. melanogaster*, *spargel*. Les modifications transcriptionnelles induites par PGC-1 vont mener à une augmentation de l'activité des mitochondries et seront même favorable à une augmentation de la longévité des organismes comme la drosophile, puisque la surexpression de *PGC-1* entraîne une augmentation de la longévité (Rera *et al.*, 2011) tandis que son inhibition dans les neurones de souris entraîne de la dégénérescence (Cui *et al.*, 2006).

e. Maintien de l'intégrité et contrôle qualité

En plus de son rôle dans l'augmentation de la quantité de mitochondries lors de la division cellulaire, la biogénèse mitochondriale est importante pour le renouvellement des mitochondries déjà existantes. Ce processus est essentiel pour garantir le bon fonctionnement du réseau mitochondrial. En effet, de par le phénomène de respiration, cet organe est particulièrement sujet à l'accumulation d'EAO qui par leurs propriétés oxydantes peuvent

altérer le contenu mitochondrial et conduire à l'accumulation de mitochondrie défectueuses dans la cellule. Par exemple, si les EAO entraînent des modifications des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire, celle-ci peut être moins efficace pour répondre aux besoins de la cellule en énergie. Une moindre efficacité de la chaîne respiratoire peut conduire à une augmentation de son activité ce qui se traduit par une augmentation des EAO libérées et donc par l'installation d'un cercle vicieux, dans lequel plus il y a d'EAO, plus il y a de dommages au niveau de la chaîne respiratoire, plus celle-ci est sollicitée et plus d'EAO sont produits, etc. Les EAO ne restent, bien évidemment, pas cantonnés à la mitochondrie et vont pouvoir détériorer le reste de la cellule. La modification de l'ADN, en particulier, est très critique pour la cellule car les altérations ainsi induites peuvent être à l'origine de la survenue de mutations et parfois d'un développement tumoral.

Afin d'éviter ces situations extrêmes, des mécanismes de maintien de l'intégrité mitochondriale existent et reposent sur des senseurs de la "bonne santé" de la mitochondrie. Ces senseurs peuvent entraîner des régulations fines telles que la dégradation spécifique des éléments altérés mais, dans le cas de modifications plus importantes, ils peuvent entraîner la dégradation de mitochondries entières (mitophagie) voir même, déclencher l'apoptose. Le chapitre suivant s'intéresse à ces mécanismes de protection intégrés au fonctionnement mitochondrial.

i) L'UPR mitochondriale

Alors que de nombreuses protéines sont adressées et importées à la mitochondrie pour y être maturées et assemblées, l'accumulation de protéines mitochondriales n'ayant pas leur conformation normale peut conduire à un stress protéotoxique. L'accumulation de protéines mal conformées dans la mitochondrie peut conduire au déclenchement d'une réponse appelée UPR^{mt} (mitochondrial unfolded protein response). Chez le nématode, la protéine ATFS-1 (Stress-activated transcription factor) est physiologiquement importée à la mitochondrie où elle est dégradée constitutivement par la protéase LON. En cas de stress protéotoxique, cette importation est altérée et ATFS-1 peut alors être adressée au noyau où elle active de la transcription de gènes dont ceux codant pour les protéines chaperonnes HSP60 et HSP70 (heat shock protein) (Nargund *et al.*, 2012, 2015). Par ailleurs, les protéines mitochondriales endommagées sont dégradées par CLPP-1 (ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1), une protéase matricielle, entraînant une accumulation de peptides

dans la matrice (Haynes *et al.*, 2007). Le transporteur HAF-1 permet l'exportation de ces peptides dans le cytosol (Haynes *et al.*, 2010).

Chez les mammifères, l'homologue de ATFS-1 appelé ATF5 (activating transcription factor 5) a été mis en évidence (Fiorese *et al.*, 2016). Cette protéine se comporte de la même façon qu'ATFS-1. Normalement adressée à la mitochondrie, ATF5 se localise au noyau en cas de stress mitochondrial où elle joue un rôle de facteur de transcription. Les facteurs de transcription ATF4 et CHOP sont aussi impliqués dans la réponse au stress protéotoxique mitochondrial mais la relation entre ces protéines n'a pas encore été déterminée (Melber and Haynes, 2018). On retrouve une protéine remplissant le rôle de CLPP-1 nommé CLPX (Al-Furoukh *et al.*, 2015).

Chez la drosophile, on ne retrouve pas d'homologue des facteurs de transcription ATF4, 5 et CHOP. De plus, CG5045, l'homologue de CLPX, n'a pas été associé à l'UPR^{mt} (Matsushima *et al.*, 2017). En revanche, la perte et la surexpression du gène codant pour la protéine chaperonne mitochondriale TRAP1 induisent une augmentation de la transcription des gènes *hsp60*, *mthsp70* et *cg5045* dont les homologues chez le nématode sont associés à l'UPR^{mt}. Les mécanismes, permettant à TRAP1 lorsqu'elle est à une dose spécifique de réguler négativement l'expression de ces gènes, ne sont pas connus (Baqri *et al.*, 2014).

L'étude de l'UPR^{mt} commence à être bien décrite chez le nématode et les mammifères mais reste très flou chez la drosophile à la différence de la mitophagie.

ii) Les voies de la mitophagie

Il existe plusieurs voies d'induction de la mitophagie. La plus importante et la mieux décrite est dépendante de l'action des protéines PINK1 et PARKIN. Dans certains contextes cellulaires particuliers, il existe d'autres voies d'inductions impliquant NIX et BNIP3 ou FUNDC1 que nous détaillerons plus tard.

A) PINK1/PARKIN

PARK2/PARKIN et *PARK6/PINK1* ont été retrouvées mutées dans des cas de maladie de Parkinson familiales. Cette maladie est associée à la présence de mitochondries endommagées (Lücking *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2001). En absence de PARKIN ou de PINK1, les mitochondries, normalement éliminées par un mécanisme d'autophagie, sont conservées ce qui conduit à une accumulation d'EAO mitochondriales.

(a) PINK1



(b) Parkin

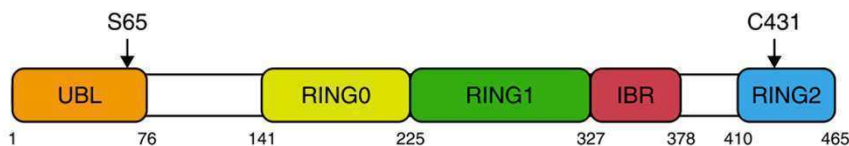


Figure 10. Organisation des domaines de PINK1 et Parkin humaines.

(a) PINK1 possède une séquence d'adressage mitochondrial à l'extrémité N-terminale (MTS), une séquence transmembranaire en hélice α (TM) et un domaine Ser/Thr kinase (Kinase). F104 est un résidu N-terminal alternatif généré en cas de clivage par PARL. S228 et S402 sont des sites d'autophosphorylation.

(b) Parkin contient un domaine N-terminal ressemblant à l'ubiquitine (UBL), trois domaines RING et un domaine IBR. S65 est un site de phosphorylation pour PINK1. C431 est le centre catalytique de l'activité ubiquitine ligase.

Issu de : Eiyama and Okamoto, 2015

(a) PINK1

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) a initialement été identifié comme un gène présentant un profil d'expression modifié dans des cellules cancéreuses exprimant une copie exogène du gène codant la phosphatase PTEN (suppresseur de croissance tumorale homologue de la Tensine) (Unoki and Nakamura, 2001) (Figure 10). PINK1, est une protéine de 581 acides aminés, qui contient une séquence d'adressage mitochondrial en N-terminal, un domaine transmembranaire, un domaine kinase à Sérine/Thréonine hautement conservé et un domaine C-terminal d'auto-régulation. L'importation de PINK1 dans la mitochondrie se fait à travers la machinerie d'import général comprenant les complexes TOM et TIM (Translocase of the Inner Membrane) (Lazarou *et al.*, 2012).

Deux régions sont critiques pour la régulation de PINK1. Celles-ci correspondent aux sites de clivages ciblés par MPP (mitochondrial processing peptidase) et PARL (Preselinin-associated Rhomboid-like protease). MPP coupe le peptide signal de PINK1 dans la matrice mitochondriale tandis que PARL clive son domaine transmembranaire dans l'espace intermembranaire (Jin *et al.*, 2010; Deas *et al.*, 2011; Greene *et al.*, 2012). Suite à ces deux événements, PINK1 clivée est re-exportée vers le cytosol puis dégradée par la voie « N-end rule » via le protéasome. La concentration en PINK1 dans les mitochondries saines est donc très faible (Yamano and Youle, 2013). Le peu de PINK1 qui est importée dans les mitochondries est capable de phosphoryler des protéines de l'espace intermembranaire telles que HTRA2/Omi (PARK13), TRAP1 (TNFR-associated protein 1), une chaperonne mitochondriale ou NDUFA10, une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire. Ces phosphorylations sont nécessaires à leur bon fonctionnement (Plun-Favreau *et al.*, 2007; Pridgeon *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2014). Il a d'ailleurs été mis en évidence chez *D. melanogaster*, que la surexpression de TRAP1 supprime le phénotype induit par la perte de PINK1 fonctionnelle mais pas de Parkin (Costa, Loh and Martins, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

L'import de protéines, donc de PINK1, dans la mitochondrie nécessite un gradient de protons. En absence de ce gradient, cette importation est fortement inhibée. Ainsi, PINK1 est accumulée à la MEM. Elle est alors capable de s'auto-phosphoryler sur 3 résidus (Ser228, Thr257 et Ser402) pour s'auto-activer (Kondapalli *et al.*, 2012; Okatsu *et al.*, 2012; Aerts *et al.*, 2015). Cette stabilisation par auto-phosphorylation est accompagnée par la formation d'un complexe multimerique de 700kDa comprenant la machinerie TOM (Narendra *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2012; Lazarou *et al.*, 2012; Okatsu *et al.*, 2012).

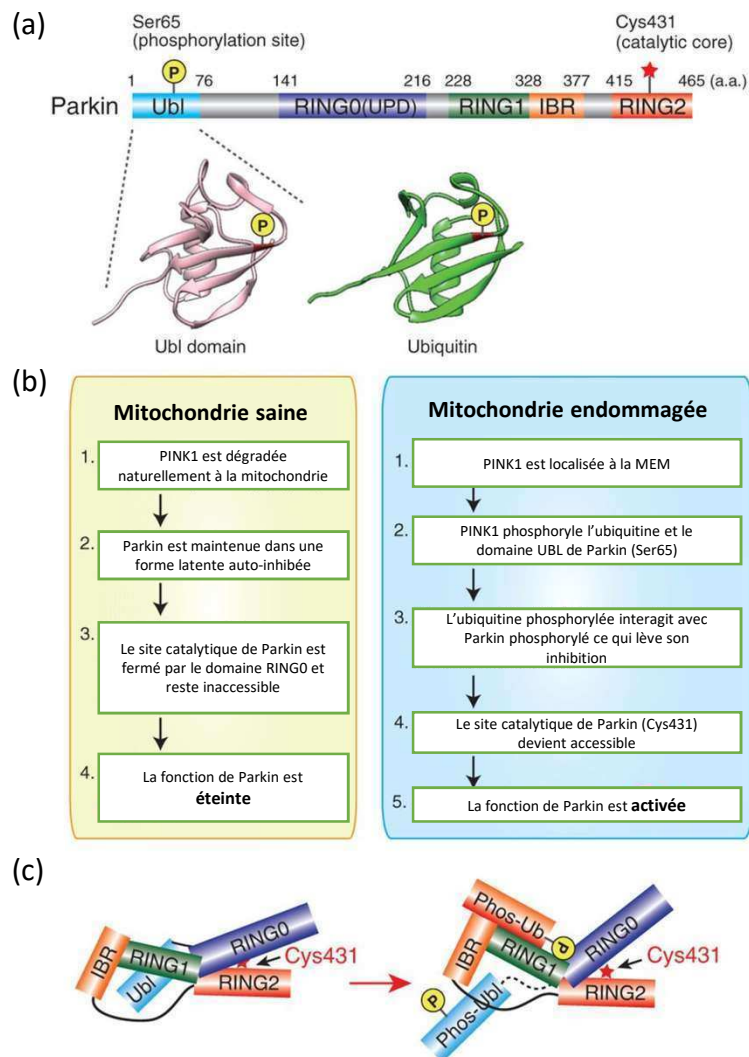


Figure 11. Description de la structure et du fonctionnement de Parkin

- (a) La structure de domaines de Parkin. La similarité entre les structures tertiaires du domaine UBL et de l'ubiquitine y est aussi présenté.
- (b) Modèle actuel du mécanisme moléculaire conduisant à l'activation de Parkin dans les mitochondries dépolariées.
- (c) Effet de la phosphorylation de Parkin et de l'ubiquitine phosphorylé en Ser65 sur l'accessibilité du site catalytique de Parkin.

Issu de : Matsuda *et al.*, 2016

(b) Parkin

La protéine Parkin, codée par le gène *PARK2*, est une ubiquitine E3 ligase de type « RING-in-between-RING » (RBR) de 465 acides aminés. Elle catalyse les mono- et poly-ubiquitinations de nombreux substrats, dont elle-même. (Sarraf *et al.*, 2013; Spratt, Walden and Shaw, 2014) (Figure 11). Associée à des co-enzymes spécifiques, Parkin ajoute une ubiquitine (Ub), de 76 acides aminés, aux résidus Lysine de ses substrats (y compris l'ubiquitine elle-même). Lorsque ce cycle est enchaîné plusieurs fois de suite, en résulte l'allongement de la chaîne poly-Ub. En fonction de la localisation de la liaison sur l'ubiquitine ciblée pour l'allongement de la chaîne, des événements différents sont induits. La structure de Parkin consiste en un domaine N-terminal ressemblant à l'ubiquitine (UBL=Ub-like) suivi par une séquence flexible et 4 régions riche en cystéines capables de lier chacune deux atomes de Zinc. Ces régions sont suivies de 3 domaines RING 0, 1 et 2. Les deux derniers sont séparés par un domaine IBR (in-between-RING) (Figure 11).

De nombreuses mutations font de *PARK2* le premier gène impliqué dans les maladies de Parkinson familiales. Initialement Parkin fut identifiée comme une E3 ubiquitine-ligase classique de type RING qui dirige l'interaction entre l'enzyme de liaison de l'Ub de type E2 et le substrat indépendamment d'une interaction directe avec l'ubiquitine. Il a été démontré plus récemment que Parkin a un résidu Cystéine catalytique dans son domaine RING2 qui forme un thioester transitoire avec l'ubiquitine avant le transfert sur la protéine substrat, ressemblant ainsi aux enzymes de type HECT (E6-AP carboxylique terminus). Ce nouveau mécanisme hybride RING/HECT conduit à sa re-classification comme un membre de la famille de type RBR des E3 Ub-ligase qui s'auto-inhibe à travers plusieurs interactions intra-moléculaires (Spratt, Walden and Shaw, 2014).

L'étude de la structure inactive de Parkin a fourni une image complète de son mode d'auto-inhibition (Wauer and Komander, 2013). Outre l'extrémité N-terminal qui garde Parkin dans une conformation fermée, son activité est réprimée par un domaine REP (repressor of parkin) bloquant le site de liaison aux enzyme E2 dans le domaine RING1. De plus, le domaine RING0 s'interpose entre RING1 et RING2 et, de cette façon, couvre le résidu Cys431. Il en résulte une séparation spatiale entre les sites actifs des enzymes E2 et Parkin, ce qui empêche le transfert de l'ubiquitine. En effet, les mutations ciblant les régions auto-inhibitrices l'activent et augmentent son auto-ubiquitination (Trempe *et al.*, 2013). En se basant sur sa structure fermée, il est apparu que Parkin doit être activée et effectuer des réarrangements

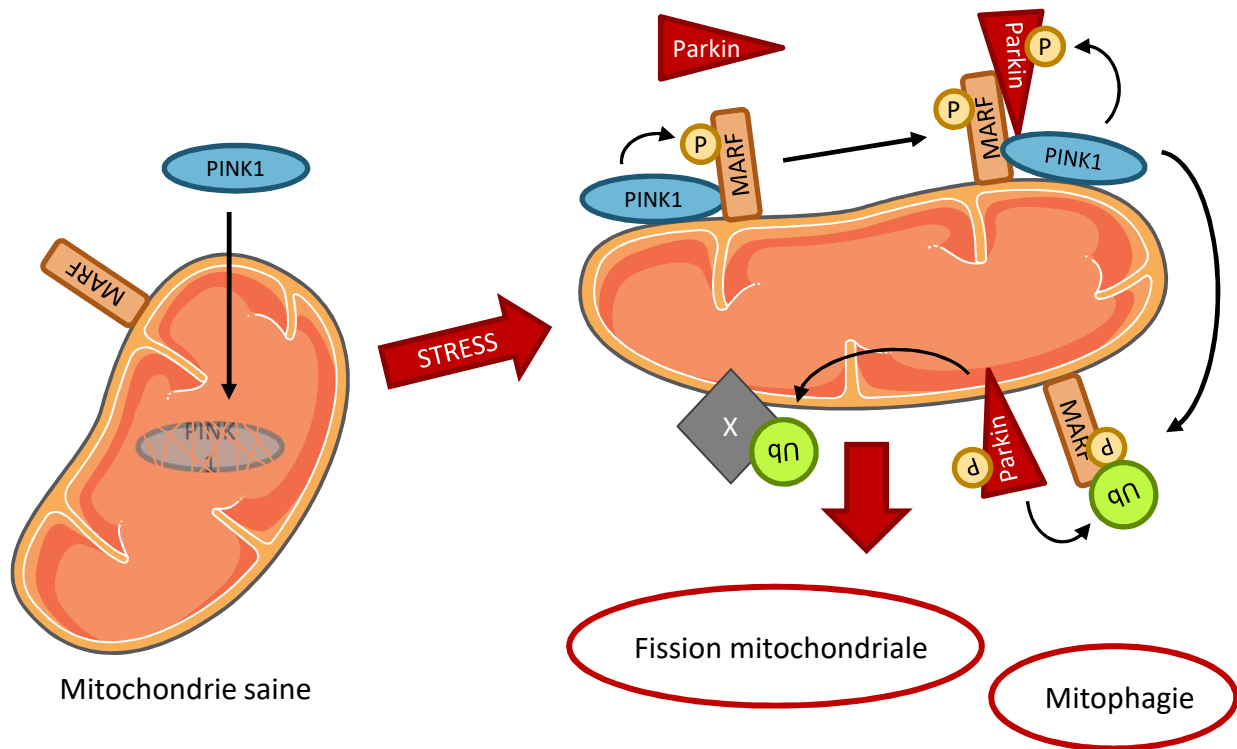


Figure 12. Mode d'action de PINK1 et Parkin.

PINK1 est dégradée constitutivement par une protéase présente à la membrane interne mitochondriale. Quand la mitochondrie est endommagée au point de perdre le potentiel de membrane interne, l'importation de PINK1 n'est plus provoquée. Elle est accumulée à la membrane externe mitochondriale lui permettant d'exercer son activité de kinase. Elle phosphoryle (P) notamment la mitofusine MARF qui permet le recrutement Parkin. Parkin est alors phosphorylée par PINK1, ce qui débloque son activité ubiquitine(Ub)-ligase. Elle ubiquitine alors une grande variété de protéines de la membrane externe mitochondriale dont MARF. Cette ubiquitination entraînant la dégradation de MARF par le protéasome, la fission mitochondriale est favorisée. De plus, l'ubiquitine présentée par de nombreuses protéines de la surface mitochondriale entraîne la reconnaissance de la mitochondrie par la machinerie d'autophagie.

majeurs pour obtenir son activité enzymatique d'E3 Ub-ligase (Caulfield *et al.*, 2014; Caulfield, Fiesel and Springer, 2015).

(c) Modes d'action dans la mitophagie

Quand la forme longue de PINK1 est stabilisée à la MEM des mitochondries endommagées, son domaine à activité kinase est tournée vers le cytosol. Plusieurs protéines impliquées dans la modulation de la dynamique mitochondriale et l'apoptose ont été proposées comme des substrats potentiels de PINK1 (Wang *et al.*, 2011; Arena *et al.*, 2013; Chen and Dorn, 2013). Il a été démontré que PINK1 phosphoryle Parkin au niveau du résidu Serine 65 dans le domaine N-terminal UBL (Kondapalli *et al.*, 2012). Cela active sa fonction enzymatique et induit sa relocalisation au niveau des mitochondries endommagées (Shiba-Fukushima *et al.*, 2012; Iguchi *et al.*, 2013) (Figure 12). Des simulations 3D de modélisation moléculaire suggèrent que la phosphorylation de Parkin relâche sa structure auto-inhibitrice et initie l'ouverture de sa conformation. Cela débouchera sur son activation enzymatique (Caulfield *et al.*, 2014).

De plus, PINK1 a été récemment identifié comme la première kinase, phosphorylant capable de phosphoryler l'ubiquitine au niveau du résidu Serine 65 (Kane *et al.*, 2014; Kazlauskaite *et al.*, 2014; Koyano *et al.*, 2014). La liaison de cette ubiquitine phosphorylée (p-Ser65-Ub) au domaine RING1 de Parkin mène au relâchement du domaine auto-inhibiteur UBL (Okatsu *et al.*, 2015; Sauve *et al.*, 2015; Wauer *et al.*, 2015). De cette façon, la phosphorylation de Parkin est facilitée, ce qui cause plusieurs réarrangements structuraux majeurs dont découlera une dé-répression de l'activité enzymatique et le maintien d'une conformation active (Kazlauskaite *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Yamano *et al.*, 2015). Les deux événements de phosphorylation effectués par PINK1 activent alors complètement les fonctions enzymatiques de Parkin (Figure 11).

De manière intéressante, les ubiquitines phosphorylées déjà liées à de protéines membranaires mitochondriales peuvent servir comme récepteurs pour Parkin sur les mitochondries endommagées (Okatsu *et al.*, 2015). Les premiers recrutements de Parkin aux mitochondries endommagées initient donc une boucle auto-amplificatrice dans laquelle Parkin ajoute des ubiquitines aux protéines de la MEM ce qui fournit davantage de substrats pour la phosphorylation dépendante de PINK1 qui à leur tour, amplifient l'activation de Parkin, son recrutement et son activité E3 Ub-ligase (Ordureau *et al.*, 2014).

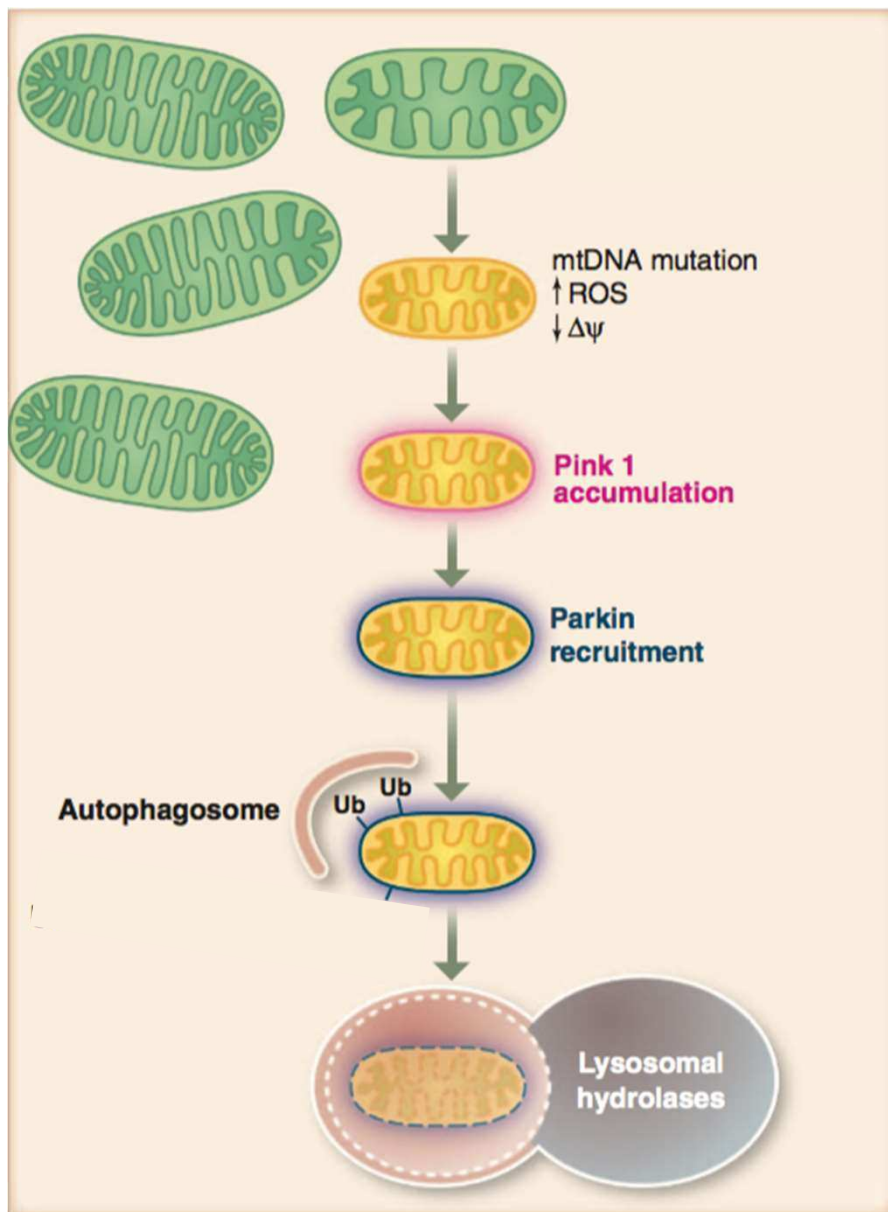


Figure 13. Modèle d'induction de la mitophagie par PINK1/Parkin.

En cas de dommages à l'ADN mitochondriale, d'augmentation de la concentration en ROS et de dépolérisation membranaire, PINK1 est accumulée à la surface mitochondriale. Cela permet le recrutement de Parkin présent dans le cytosol, qui ubiquitine de nombreuses protéines présentes à la membrane externe de la mitochondrie. L'ubiquitine sert alors de marqueur dans la reconnaissance de la mitochondrie pour former l'autophagosome. La fusion de l'autophagosome à une vésicule lysosomale mène à la dégradation de la mitochondrie défaillante.

Issu de : Youle *et al.*, 2012

La voie PINK1/Parkin est un processus séquentiel régulé de manière complexe. Elle coordonne plusieurs aspects du contrôle qualité mitochondrial, fortement dépendant de l'extension des dommages mitochondriaux. De cette façon PINK1 et Parkin modifient un large spectre de protéines substrats et entraînent leur dégradation (Chan *et al.*, 2011; Sarraf *et al.*, 2013; Cunningham *et al.*, 2015).

Parmi les cibles les mieux caractérisées, MFN1 et 2 sont dégradées pour prévenir des re-fusions de mitochondries endommagées avec le réseau sain (Figure 12). Cette dégradation associée aux mitochondries (MAD) est réalisée via VCP/p97 (Valosin-containing protéine) par le protéasome (Poole *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010). Ce processus conduira les mitochondries endommagées à leur fragmentation ce qui favorisera également leur incorporation dans les autophagosomes, des vésicules spécifiques à l'autophagie. Celles-ci fusionneront avec les lysosomes, des vésicules contenant des enzymes à même de dégrader tous les éléments contenus dans les autophagosomes. Les protéines Miro-1 et -2 sont d'autres substrats de Parkin impliquées dans les déplacements mitochondriaux. Elles permettent la liaison entre les mitochondries et les microtubules via les protéines motrices kinésines. La dégradation de ces protéines mène à l'inhibition des mouvements mitochondriaux et promeut plus tard la ségrégation des mitochondries endommagées (Wang *et al.*, 2011). De nombreuses autres protéines ont été identifiées comme cibles de PINK1 et Parkin (Tanaka *et al.*, 2010; Sarraf *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2017) mais les fonctions associées qui ne sont pas liées à la dégradation restent incompréhensibles. De manière intrigante, des liaisons de chaînes poly-Ub aux topologies d'assemblage distinctes ont été identifiées selon les substrats suggérant une régulation plus complexe des protéines ubiquitinylées par des chaînes topologiquement diverses (Swatek and Komander, 2016). L'accumulation d'ubiquitine phosphorylé en Ser65 sur des protéines situées à la surface de la mitochondrie permet le recrutement des récepteurs impliqués dans l'autophagie. Des protéines comme l'OPTN (Optineurine) et NDP52 (nuclear dot protéine 52) se lient aux chaînes poly-Ub. Ces protéines sont alors capables de recruter des récepteurs de l'autophagie comme LC3 (light chain 3) (Lazarou *et al.*, 2015). La reconnaissance de ces mitochondries par les autophagosomes conduit à leur mitophagie (Figure 13).

Les études récentes identifient un rôle supplémentaire pour PINK1/Parkin dans la formation des vésicules dérivées de la mitochondrie (MDVs) suggérant une voie alternative pour la dégradation pour les protéines mitochondriales. Une étude de spectrométrie de

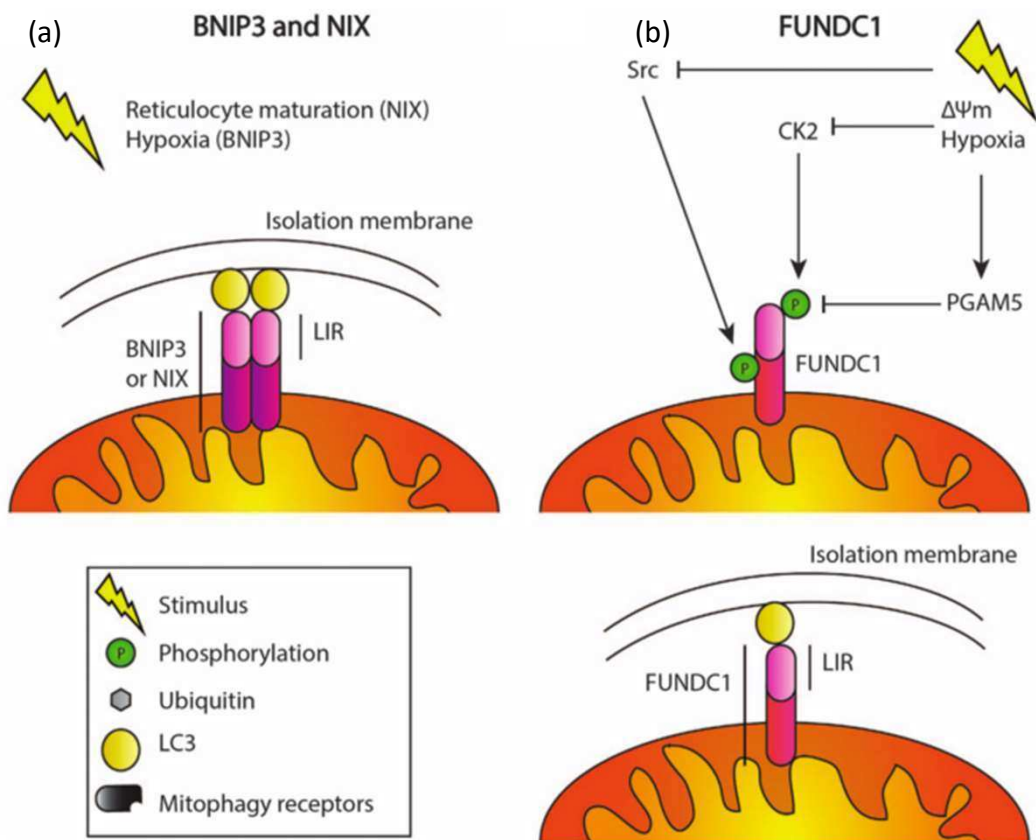


Figure 14. Autres voies mitophagiques.

- (a) BNIP3 et NIX sont activées en réponse respectivement à l'hypoxie et à la maturation des reticulocytes. Ces récepteurs de la mitophagie lient directement LC3 grâce à un domaine LIR et induisent le recrutement et la formation de la membrane d'isolation pour former l'autophagosome.
- (b) La phosphorylation par Src et CK2 induit l'inactivation de FUNDC1. La déphosphorylation par PGAM5 permet la liaison de LC3 menant à la mitophagie.

Issu de : Bernardini *et al.*, 2017

masse menée chez la drosophile a montré un renouvellement plus lent de la chaîne respiratoire en contexte homozygote mutant perte de fonction pour PINK1 et Parkin comparé au mutant de Atg7, un gène impliquée dans l'autophagie (Vincow *et al.*, 2013). Cela suggère un mécanisme de renouvellement des protéines mitochondriales indépendant de la mitophagie qui pourrait participer à la dégradation de composants mitochondriaux. Les MDVs transportent sélectivement, grâce à l'action de protéines cargo, de lipides oxydés depuis les mitochondries vers les peroxisomes (Braschi *et al.*, 2010). D'autres protéines cargo permettent l'adressage aux lysosomes (Soubannier *et al.*, 2012). Au moins une partie des MDVs sont générés par la protéine cargo VPS35 (vacuolar protéine sorting 35) (Braschi *et al.*, 2010). Ce gène (*VPS35* aussi appelé *PARK17*) est lié à certaines formes autosomales dominante de la maladie de Parkinson. L'expression de *VPS35* chez la mouche supprime d'ailleurs le phénotype associé à la perte de Parkin mais pas celle de PINK1 (Malik, Godena and Whitworth, 2015).

En plus de la dégradation de composants isolés et de mitochondries entières, Parkin joue aussi un rôle dans la biogenèse mitochondriale. En effet, *in vitro* Parkin est capable d'ubiquitiner PARIS (ZNF746) qui est un répresseur transcriptionnel de PGC1- α . L'activité basale de Parkin est suffisante pour adresser PARIS au protéasome (Shin *et al.*, 2011) facilitant alors l'expression de PGC-1 α (Wu *et al.*, 1999). Ainsi, la perte de Parkin peut contribuer à la mort cellulaire en empêchant la biogenèse mitochondriale (Stevens *et al.*, 2015). Enfin, suite à un stress génotoxique à l'étoposide, Parkin s'oppose à la translocalisation de Bax à la mitochondrie. Cela pourrait être dû à une ubiquitination directe de Bax par Parkin (Johnson *et al.*, 2012). De plus, lors d'une perte de potentiel de membrane, la surexpression de Parkin induit une suppression du phénotype mitochondriale défectueux et est capable d'inhiber l'apoptose dépendante de Bax (Pascucci *et al.*, 2016).

B) Autres voies de mitophagie indépendantes de PINK1/Parkin

Dans d'autres cas, la mitophagie n'est pas là dans un but de traitement des mitochondries déficientes mais fait partie d'un processus normal de différenciation cellulaire. C'est le cas par exemple lors de la formation des érythrocytes. La formation des globules rouges nécessite, en effet, une élimination des mitochondries, entre autres, ce qui se fait par un processus différent de la voie PINK1/Parkin. Cette voie dépend de NIX (NIP3-like protein X

aussi connu sous le nom de BNIP3L), une protéine ressemblant fortement aux membres *BH3-only* de la famille Bcl-2. Sa fonction serait d'être un récepteur spécifique de la mitophagie (Schweers *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2008). NIX est localisé à la MEM et contient un motif WXXL-like du côté du cytosol qui peut se lier à LC3 et son homologue GABARAP (GABA receptor-associated protein), *in vitro* et *in vivo* (Novak *et al.*, 2010). Il n'existe pas d'homologue du gène codant cette protéine chez *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster* (Figure 14).

D'autres voies de la mitophagie existent mais sont moins étudiées que celles vues précédemment. FUNDC1 (FUN14 domain-containing protein 1) a été identifié comme un récepteur de l'autophagie impliqué dans la réponse à l'hypoxie (Liu *et al.*, 2012) (Figure 14). Il est présent à la MEM où il est notamment régulé par PGAM5 (Phosphoglycerate mutase family member 5) (Chen *et al.*, 2014). De plus, la cardiolipine, un lipide mitochondrial est capable d'interagir directement avec LC3 en cas de dommages mitochondriaux (Chu *et al.*, 2013; Kagan *et al.*, 2016). Enfin, les Ub-ligases Smurf-1 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1), Gp78 et Mul1 (Mitochondrial ubiquitin ligase 1) ont aussi été signalées comme effectrices de la mitophagie (Orvedahl *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2014).

iii) Régulation de la mitophagie

Des études « *genome-wide* » ont cherché des régulateurs de la translocalisation de Parkin et/ou de la mitophagie (Hasson *et al.*, 2013; Lefebvre *et al.*, 2013; Ivatt *et al.*, 2014).

L'activité de Parkin est elle-même modulée par plusieurs enzymes du système d'ubiquitination. En effet, l'action d'enzymes E2 de conjugaison de l'Ub a été mise en avant dans la régulation de la translocalisation de Parkin ainsi que la modulation de son activité enzymatique sur les mitochondries endommagées. Par exemple, UBE2D et UBE2L3 favorisent l'activation et la translocalisation de Parkin tandis que UBE2R1 a un rôle d'inhibiteur (Fiesel *et al.*, 2014). Par ailleurs d'autres Ub-ligase de type E3 sont impliquées dans les formes familiales de la maladie de Parkinson comme FBXO7 (F-box only protein 7) codée par le gène *PARK15*. Cette protéine participe au maintien de l'intégrité mitochondriale en interagissant avec PINK1 et Parkin. Des données *in vivo* confirment ces observations *in vitro* puisque sa surexpression chez *D. melanogaster* supprime le phénotype induit par la perte de Parkin (Burchell *et al.*, 2013).

Il existe aussi des désubiquitinases qui antagonisent l'action de Parkin en enlevant les Ub conjuguées par celle-ci. Ainsi, ont été identifiés USP30 (ubiquitin specific peptidase 30)

(Bingol *et al.*, 2014) et USP15 (Cornelissen *et al.*, 2014), capables de cliver les chaînes poly-Ub présentes à la surface mitochondriale. À l'inverse, USP8 permet de lever l'inhibition de Parkin elle-même en enlevant les Ub inhibitrices de celle-ci (Durcan *et al.*, 2014).

Pour finir, d'autres régulateurs de la voie PINK1/Parkin sont en lien avec l'apoptose et l'autophagie. Par exemple, Ambra1 (activating molecule in Beclin1-regulated autophagy) est une protéine capable de stimuler l'activité du complexe PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) de classe III qui est essentiel à la formation de nouveaux phagophores. Ambra1 interagit physiquement avec Parkin au cours du processus d'initiation de la mitophagie (Van Humbeeck *et al.*, 2011). D'ailleurs, Beclin1, une protéine participant à la formation de vésicules, en interagissant avec PINK1, joue un rôle dans le processus autophagique (Michiorri *et al.*, 2010). De plus, il a pu être mis en évidence le rôle de protéines de la famille Bcl-2 dans la mitophagie. Ainsi, certains membres anti-apoptotiques de cette famille inhibent la translocation de Parkin à la membrane des mitochondries dépolarisées tandis qu'elle est augmentée par les protéines *BH3-only* (Hollville *et al.*, 2014).

Enfin, des résultats récents montrent l'expression de microARNs lors d'événements importants de mitophagie. Ceux-ci ont un effet répresseur sur la traduction de PINK1 induisant donc un boucle de contrôle négatif (Kim *et al.*, 2016).

Suite à l'accumulation de récepteurs activés de la mitophagie, LC3 et les membres de la famille GABARAP lient et promeuvent la formation d'autophagosomes de concert avec de nombreux autres récepteurs à l'autophagie incluant le complexe d'initiation de l'autophagie ULK1 (Unc-51-like kinase 1) et le complexe ATG12-ATG5-ATG16L. S'en suit le gonflement de la mitochondrie, l'autophagosome fusionne avec un lysosome permettant un nettoyage protéolytique à faible pH de mitochondries endommagées (Lamb, Yoshimori and Tooze, 2013).

B. L'Apoptose

1. Généralités

La biologie, comme son nom l'indique, s'est longtemps contentée de l'étude du vivant. Les travaux conduits par Mathias Jakob Schleiden, Theodor Schwann et Rudolf Carl Virchow au XIX^{ème} siècle ont défini la cellule comme unité du vivant mais aussi montré que toutes les cellules surviennent à partir de cellules préexistantes. Le destin cellulaire est alors pour la

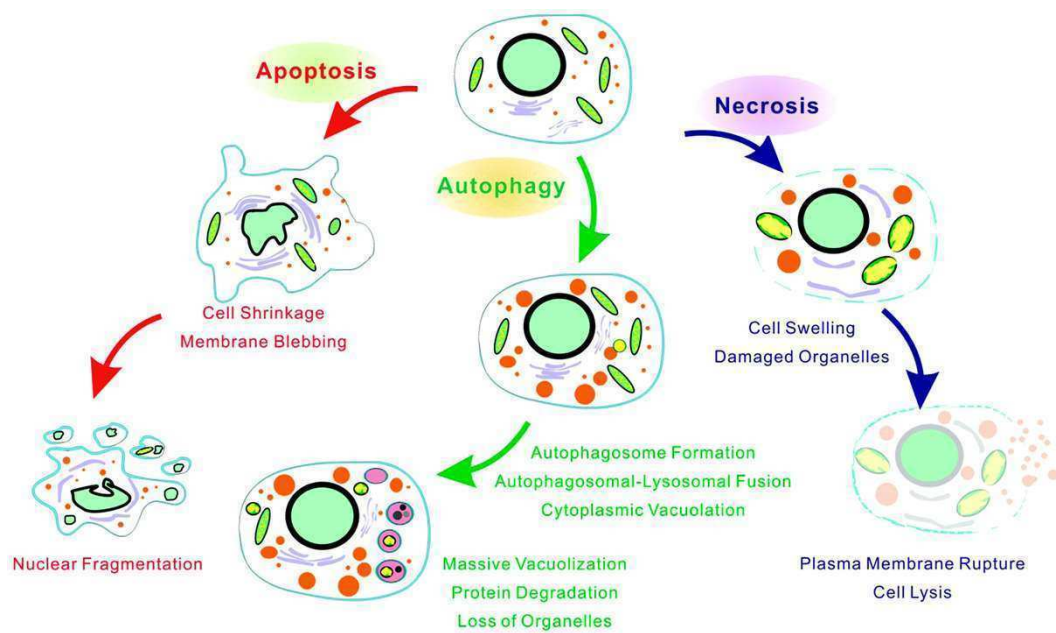


Figure 15. Les voies de mort cellulaire.

L'apoptose, l'autophagie et la nécrose présentent des processus très différents entre elles.

Issu de : Tan *et al.* (2014)

communauté scientifique restreint à la division et à la différenciation. Bien que des descriptions morphologiques de mort cellulaire soit proposées par la suite, il faudra attendre notamment les travaux de Lockshin en 1965 pour que la notion de mort cellulaire programmée émerge suite à son observation au cours des processus de métamorphose des insectes (Lockshin and Williams, 1965). Un type de mort cellulaire programmée sera nommé « apoptose » pour la première fois par Kerr en 1972 du grec ancien « αποπτωση » ce qui évoque la chute des feuilles en automne, soit une mort nécessaire et prédestinée faisant partie d'un cycle. Ici, ce terme s'applique à une mort cellulaire particulière sur le plan morphologique puisqu'elle aboutit à la formation de corps apoptotiques conservant une membrane imperméable et contenant les restes du noyau, des constituants du cytoplasme et même des organites relativement préservés (Kerr *et al.*, 1972). Ces corps apoptotiques sont alors phagocytés et dégradés par les cellules environnantes. Cette mort cellulaire est « propre » en comparaison à la nécrose qui est l'autre mort cellulaire (non programmée) déjà connue à l'époque et qui peut entraîner des réactions inflammatoires très fortes.

Dans la foulée, un troisième type de mort cellulaire est décrit : l'« autophagie » (Schweichel and Merker, 1973). Ce terme signifiant « se manger soi-même » désigne une mort cellulaire un peu particulière puisqu'elle constitue, dans un premier temps, un mécanisme de survie en réponse à un stress dû à des carences. Ces carences vont entraîner la formation de vésicules à doubles membranes dans le cytoplasme dans lesquelles sont accumulés des constituants cellulaires. Ces vésicules, les autophagosomes, vont fusionner avec des lysosomes ce qui entrainera la dégradation de leur contenu. Cette auto-digestion va permettre à la cellule de libérer des substrats qui pourront alors servir à pallier les besoins les plus urgents. Cependant, dans certains cas, une activation anormale de l'autophagie peut enclencher un processus de mort associé à l'autophagie (Figure 15).

2. Rôles physiologiques

L'apoptose est un processus de mort cellulaire très conservé au cours de l'évolution. Elle joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions des organismes pluricellulaires. Les premières avancées dans sa compréhension furent permises par les recherches du laboratoire de Robert Horvitz sur le nématode *Caenorhabditis elegans* dès les années 1980. Ces recherches permirent d'identifier des gènes impliqués dans le déclenchement de morts cellulaires programmées pour certaines cellules au cours du développement de l'organisme

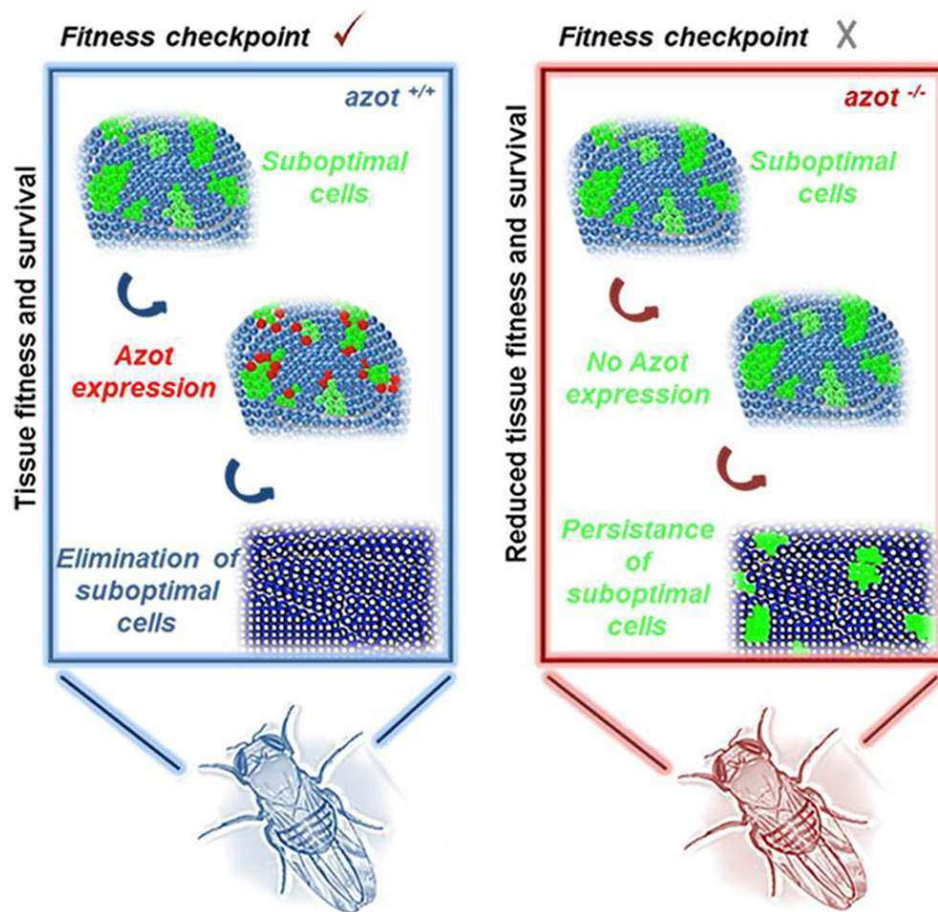


Figure 16. Rôle de l'apoptose dans l'optimisation de la population tissulaire.

En exemple ici, azot permet une sélection au niveau tissulaire des cellules les plus performantes. Dans ce cas, le développement serait optimal des tissus ce qui se traduirait par une meilleure survie de l'organisme entier.

Issu de: Merino *et al.*, 2015

(Ellis and Horvitz, 1986). Par ailleurs, au cours de la morphogénèse d'organismes plus complexe, l'apoptose est impliquée dans l'élimination des tissus interdigitaux au cours du développement embryonnaire et fœtal (Lindsten *et al.*, 2000). On la retrouve aussi fortement impliquée dans le remaniement des organes de la mouche au cours de sa métamorphose. Cette dernière a d'ailleurs permis de nombreuses avancées dans le champ de l'apoptose. En effet, la disparition des glandes salivaires de la larve requière à la fois l'apoptose et la mort par autophagie (Jiang, Baehrecke and Thummel, 1997; Berry and Baehrecke, 2007).

L'homéostasie tissulaire est aussi un processus dans lequel l'apoptose joue un rôle prépondérant. Ce processus vise à entretenir un équilibre entre croissance, division et mort cellulaires dans le tissu afin que celui-ci maintienne son intégrité et conserve sa fonction. Pour cela, des cellules peuvent en venir à déclencher leur propre apoptose lorsqu'elles sont trop nombreuses (Conradt, 2009). Ce mécanisme nécessite cependant une grande finesse de réponse pour éviter les réactions excessives qui entraîneraient une mort massive dans le tissu. Elle peut aussi être déclenchée afin de préserver l'intégrité d'un tissu. Dans ce cas, l'apoptose peut permettre l'élimination des cellules aux caractéristiques moins optimales que leurs voisines. Ce faisant, les cellules plus efficaces ou plus aptes à remplir les fonctions du tissu vont pouvoir se développer d'avantage et se diviser, augmentant d'autant plus l'efficacité du tissu tout entier. Des mécanismes de sélections ont ainsi été mis en évidence chez la drosophile. Cette sélection se fait, suite à des échanges entre les cellules avoisinantes, par l'action des protéines telles que dMyc et Flower (de la Cova *et al.*, 2004; Rhiner *et al.*, 2010). Lors de ce processus dit de compétition, les cellules considérées comme « perdantes » rentrent en apoptose (Morata and Ripoll, 1975) (exemple en Figure 16).

Enfin, l'apoptose est un mécanisme mis en œuvre dans l'élimination de cellules dangereuses pour l'organisme. Des cellules infectées déclenchent l'apoptose suite à la stimulation de la voie « extrinsèque » par les lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire les ayant reconnues comme telles. De plus, l'absence d'apoptose mène à des pathologies extrêmement graves dont les cancers. L'apoptose a ici une fonction de garde-fou : les cellules dont le cycle cellulaire se dérègle sont capables d'activer leur entrée en apoptose. Elles préviennent de cette façon leur division incontrôlée qui aboutirait sur la formation d'une tumeur. L'apoptose est ici déclenchée par des senseurs de la cellule : les protéines de la famille Bcl-2. Ces senseurs sont sensibles à des variations d'EAO ou à l'apparition de dommages à l'ADN.

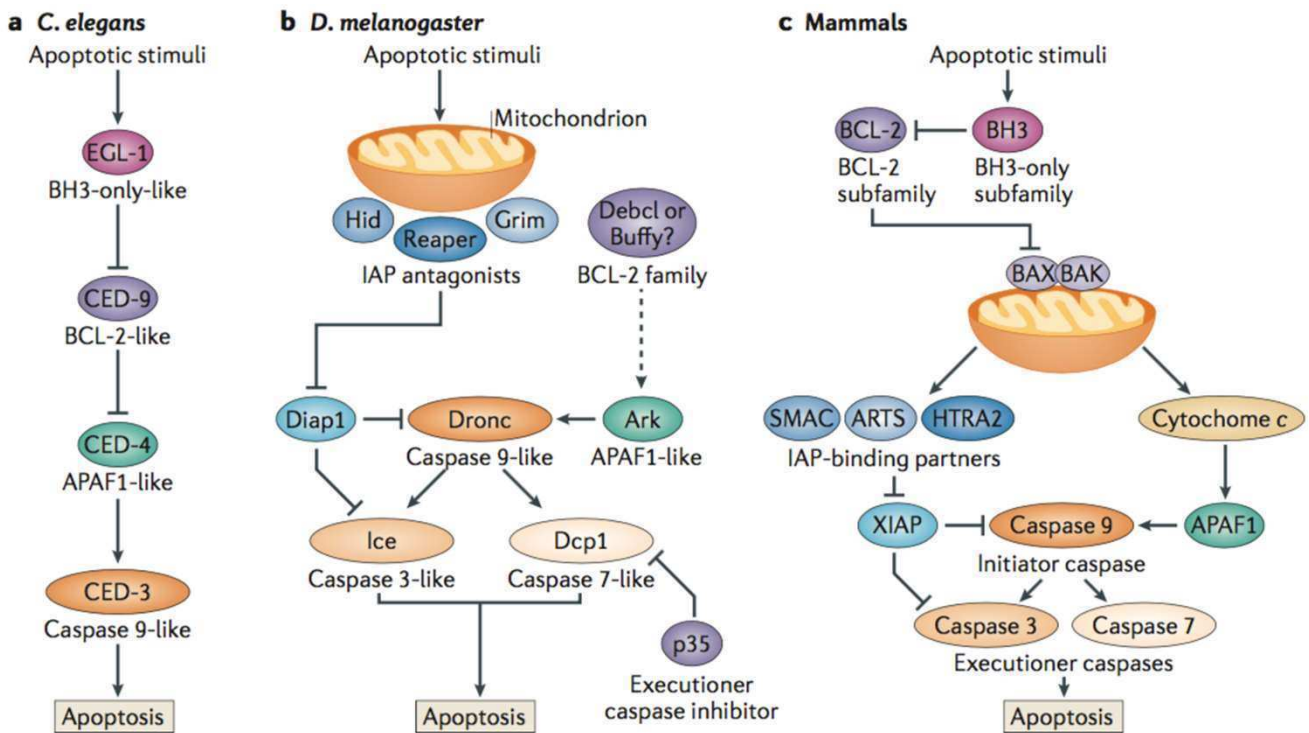


Figure 17. Le cœur de la machinerie apoptotique est conservé.

Les régulateurs de l'apoptose chez *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et les mammifères montrent la conservation évolutive de la voie apoptotique.

- Pour *C. elegans*, EGL-1 (homologue des protéines BH3-only) se lie à et inhibe CED-9 (homologue de la famille Bcl-2), ce qui résulte sur la libération de CED-4 (homologue de Apaf-1). Ce faisant, la cellule est alors capable d'être éliminée par CED-3 (une caspase).
- Chez *D. melanogaster*, Reaper, Hid et Grim (RHG) entraîne la dégradation des diAP1, libérant ainsi les caspases effectrices drICE et Dcp1. En parallèle, cela permet à Dronc (homologue de la caspase 9) d'interagir avec Dark (homologue d'Apaf-1) pour former l'apoptosome, activateur de caspases. La protéine p35 est une inhibiteur spécifique aux caspases effectrices.
- Chez les mammifères, la balance entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est centrale pour le devenir cellulaire. Durant l'apoptose, les protéines BH3-only facilite un relargage du cytochrome c depuis la mitochondrie. Celui-ci se lie à Apaf-1 et donne naissance à l'apoptosome. En parallèle, les antagonistes des IAPs comme SMAC, HTRA2 et ARTS, se relocalisent à la mitochondrie et libèrent les caspases de leur inhibition par le IAPs. En particulier, la caspase 9 est libérée de XIAP et activée par l'apoptosome, ce qui entraîne l'activation des caspases effectrices 3 et 7.

Issu de: Fuchs and Steller, 2015

3. Le processus apoptotique

Comme mentionné précédemment, les premières études sur l'apoptose se firent chez le nématode. Dans cet organisme, la mutation des gènes *egl-1*, *ced-3* et *ced-4* induit l'apparition de gonflements au niveau des régions dans lesquelles des cellules entrent normalement en apoptose chez le nématode sauvage. Sera également identifié le gène *ced-9*, capable *a contrario* d'inhiber cette mort cellulaire (Hengartner, Ellis and Horvitz, 1992). L'utilisation d'un organisme modèle relativement simple a permis de hiérarchiser les différents acteurs de la cascade d'activation. En se basant sur ces découvertes, les études dans des organismes plus complexes ont montré l'évolution de ce processus avec une augmentation notable des intervenants et systèmes de régulation. Chez la drosophile, le système présente l'avantage d'être intermédiaire (Figure 17).

Nous nous restreindrons ici à la description de l'apoptose chez la drosophile. Son étude dans ce modèle a un grand intérêt pour la raison que des événements majeurs impliqués dans l'apoptose chez les mammifères, notamment la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome *c* semblent avoir une importance moindre. Ce modèle peut donc permettre d'étudier d'autres événements, plus difficilement accessibles chez les mammifères.

a. Les caspases

Comme indiqué plus haut, les principaux effecteurs de l'apoptose sont les caspases (Figure 18). Ces protéases sont produites constitutivement par les cellules mais sont accumulées sous une forme inactive appelée pro-caspases. Leur activation nécessite leur clivage au niveau de résidus aspartate. Les caspases appelées « initiatrices » possèdent un long prodomaine et sont recrutées par des protéines adaptatrices au sein de complexes d'activation. Ces plateformes offrent une grande proximité entre les pro-caspases ce qui entraîne leur homodimérisation. Elles s'auto-activent alors par leurs clivage réciproques, l'activité du domaine pro-caspase étant suffisante. Une fois les caspases initiatrices opérationnelles, elles clivent les caspases « effectrices » qui sont, pour leur part, déjà assemblées en dimères. Les dimères actifs de caspases effectrices clivent alors plus de 400 substrats différents (Lüthi and Martin, 2007). Certains d'entre eux sont associés aux changements morphologiques observés au cours de l'apoptose comme le bourgeonnement

de la membrane, la fragmentation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques (Taylor, Cullen and Martin, 2008).

Les événements de la cascade d'activation des caspases sont assez bien décrits chez les mammifères. 18 caspases y ont été identifiées, certaines étant associées à l'apoptose et d'autres ont un rôle dans la réponse inflammatoire (Kumar, 2007; Eckhart *et al.*, 2008). Chez la drosophile, c'est 7 caspases qui ont été identifiées. Les études génétiques ont bien établi que Dronc (*Drosophila* Nedd2-like caspase) est la caspase initiateur la plus importante. Son domaine CARD (caspase activation and recruitment domain), présent dans le pro-domaine N-terminal, évoque la caspase-9 de mammifère, initiateur dans la voie intrinsèque. Ce domaine lui permet d'interagir avec Dark/Ark, un homologue de APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1). Ainsi, elle s'active et ces protéines forment ensemble une plateforme d'activation de caspase, communément appelée « apoptosome » (L Dorstyn *et al.*, 1999). L'apoptosome peut alors activer les caspases effectrices drICE (*Drosophila* Interleukin-1 β -Converting Enzyme) dans la totalité des cellules (Fraser, McCarthy and Evan, 1997) mais aussi Dcp-1 (*Drosophila* caspase-1) qui est exprimée dans certains types cellulaires au cours du développement et qui est redondante avec drICE (Song, McCall and Steller, 1997).

La caspase Dredd possède, pour sa part, deux domaines DEDs (death effector domains) dans son pro-domaine N-terminal (Chen *et al.*, 1998). Ces domaines rappelant la caspase-8 de mammifère lui permettent d'interagir avec la protéine adaptatrice dFADD (*Drosophila* Fas-associated death domain). Mais contrairement à la caspase-8 qui a un rôle essentiel dans la voie extrinsèque de l'apoptose, Dredd semble être principalement impliquée dans la réponse immunitaire innée (Leulier *et al.*, 2000). Dans cette voie, Dredd est activée par le récepteur Toll et active Relish, un facteur de transcription ressemblant à NF-KB (Stoven *et al.*, 2003).

Strica ressemble, de par la présence d'un long pro-domaine, à une caspase initiateur. Pourtant, l'absence de domaines CARD ou DED dans ce pro-domaine et sa richesse en sérine/thréonine la rendent atypique (Doumanis *et al.*, 2001). Son étude semble indiquer un rôle dans l'apoptose développementale de certains organes en particuliers comme, par exemple, les glandes salivaires (Leulier *et al.*, 2006). De plus, on observe une redondance fonctionnelle avec Dronc dans l'apoptose ayant lieu au cours de l'ovogénèse (Baum *et al.*, 2007) et de la métamorphose pour les neurones peptidergiques (G. Lee *et al.*, 2011). Malgré ces découvertes, les cibles de cette caspase initiateur restent inconnues.

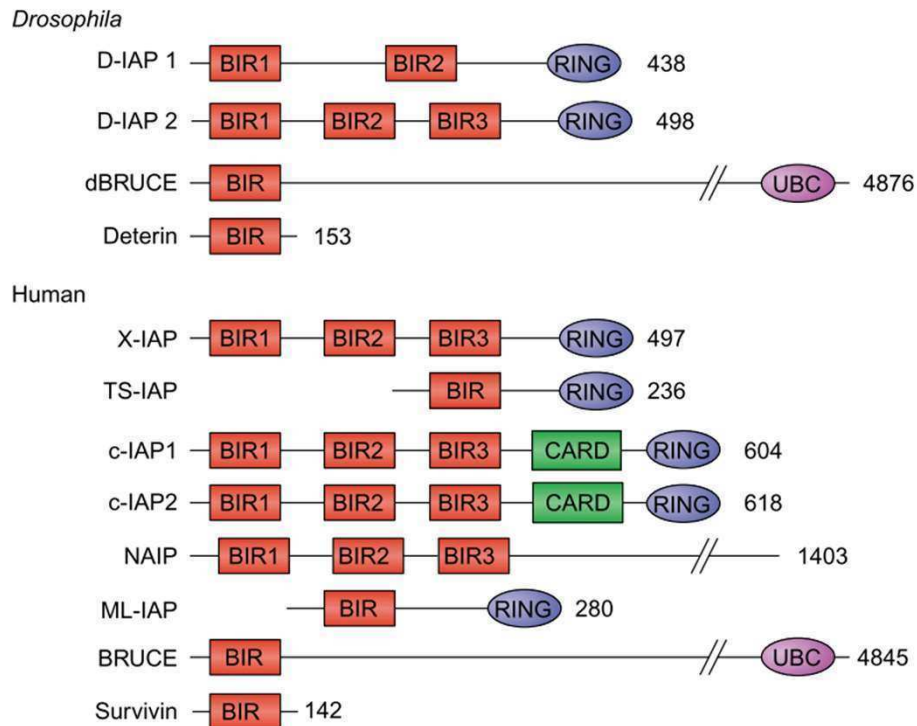


Figure 19. La structure en domaines des IAPs de drosophile et humaines.

Les IAPs sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine BIR et beaucoup contiennent un domaine RING qui est toujours situé à l'extrémité C-terminale. Les protéines BRUCE et dBRUCE possèdent un domaine UBC au lieu d'un domaine RING. Enfin, on note la présence d'un domaine CARD (caspase recruitment domain) dans les c-IAP1 et c-IAP2 humaine.

Issu de: Bergmann *et al.*, 2003

Les quatre caspases restantes de drosophile (*drICE*, *Dcp-1*, *Decay* et *Damm*) ne possèdent pas de long pro-domaine et sont donc assimilées à des caspases effectrices. *drICE* est le principal effecteur de l'apoptose chez la drosophile et est un analogue fonctionnel de la caspase-3 de mammifère (Fraser and Evan, 1997; Fraser, McCarthy and Evan, 1997). Les mutants nuls de *drice* présentent une forte diminution de l'apoptose mais n'ont pas des phénotypes aussi sévères que les mutants nuls pour *dronc* (Kondo *et al.*, 2006; Muro *et al.*, 2006). De plus, *drICE* joue un rôle dans l'individualisation des spermatides (Kondo *et al.*, 2006). *Dcp-1* est un homologue fonctionnel de la caspase-3 et de *drICE*. Pour autant, il semble moins important que cette dernière, les mutants ne présentant pas de phénotypes forts particuliers. Cependant les doubles mutants *drice/dcp-1* montrent une inhibition de l'apoptose plus importante que les mutants simples de *drice*. Ce phénotype est proche de celui observé chez les mutants de *dronc* (Xu *et al.*, 2006). Nous avons donc une caspase initiateur principale *Dronc* qui clive principalement la caspase *drICE* avec une redondance grâce à *Dcp-1*. Ainsi activées, ces caspases effectrices clivent leurs substrats (Hawkins *et al.*, 2000).

Enfin, les deux dernières caspases à court pro-domaine, *Decay* et *Damm*, n'affichent pas de grande utilité dans l'apoptose développementale (Loretta Dorstyn *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 2001). *Decay* est fortement exprimée au cours de la mort cellulaire de l'intestin larvaire mais le knockdown ou l'inhibition du gène la codant n'affecte pas ce processus (Denton *et al.*, 2009). Son rôle dans ces cellules reste à élucider mais les indices laissent à penser qu'elle aurait un rôle redondant vis-à-vis de la voie apoptotique classique (Leulier *et al.*, 2006). Le rôle de *Damm* semble réduit, pour sa part, à l'organisation de l'œil mais son importance dans l'apoptose reste à démontrer (Leulier *et al.*, 2006).

b. Les IAPs (Inhibitors of Apoptosis)

Les protéines de la famille IAP sont caractérisées par la présence d'un à trois motifs spécifiques en tandem d'environ 70 acides aminés appelés BIRs (Baculovirus IAP repeat) localisés à l'extrémité N-terminal de la protéines (Birnbaum, Clem and Miller, 1994) (Figure 19). Ces BIRs sont principalement constituées d'un motif riche en Cys/His interagissant avec un ion zinc. Cela leur permet d'obtenir deux types de structures tertiaires, spécifiques à un type d'interaction chacun. Les BIRs de type I se lient à un certain nombre de protéines principalement impliquées dans les voies de signalisation cellulaire (Samuel *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Mace *et al.*, 2010). Les BIRs de type II forment un sillon hydrophobe de surface se

liant à un motif tetrapeptide conservé appelé IBM (IAP binding motif). Ce motif est retrouvé aux extrémités N-terminal de certaines caspases et dans les antagonistes des IAPs. L'exposition des IBMs étant nécessaire à la reconnaissance et à la liaison par les BIRs, les IAPs ne peuvent interagir qu'avec des caspases activées (Liu *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2001).

Le second motif conservé important pour l'activité anti-apoptotique des IAPs est le domaine RING en doigt de zinc C-terminal. Ce domaine à activité E3-ubiquitine ligase permet la conjugaison covalente à une lysine d'une protéine ciblée, d'une protéine NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8) ou d'un Ub (ubiquitine) seul ou en chaîne (Broemer *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2013). IAP peut d'ailleurs s'homodimériser pour réguler elle-même son activité (Silke *et al.*, 2005; Rajalingam *et al.*, 2006). Les IAPs de mammifère présentent d'autres domaines spécifiques comme le domaine CARD.

Il existe au moins 4 membres de la famille IAP chez la drosophile : dIAP1 (drosophila IAP 1), dIAP2, Deterin et dBRUCE (drosophila BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating). dIAP1 est essentielle pour garantir la survie cellulaire. Elle contient deux domaines BIRs et un domaine RING lui donnant une activité E3-Ub-ligase. L'absence de dIAP1 suffit à induire une létalité embryonnaire précoce due à une apoptose massive (Wang *et al.*, 1999). De plus, dIAP1 inhibe l'apoptose induite par la suppression de Dronc ou drICE, appuyant l'idée que dIAP1 peut agir au niveau des caspases initiateuses et effectrices de la voie canonique (Kaiser, Vucic and Miller, 1998; Meier *et al.*, 2000). En interagissant via son domaine BIR2 (Hawkins *et al.*, 2000), dIAP1 ubiquitine Dronc conduisant ainsi à son inhibition (Wilson *et al.*, 2002). Les conséquences de cette conjugaison restent encore peu claires puisque l'on a pu observer une dégradation par plusieurs processus, faisant ou non intervenir le protéasome (Muro, Hay and Clem, 2002; Shapiro *et al.*, 2008; T. V Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016). Des résultats récents montrent que Dronc est mono-ubiquitylé dans son domaine CARD. Bien que l'utilisation de mutants nuls hétérozygote pour *diap1* semble indiquer celui-ci comme responsable, l'impossibilité de produire des mutants homozygote empêche de conclure réellement (Kamber Kaya *et al.*, 2017). De plus, la présence de dIAP1 permet d'induire un clivage de Dark par Dronc elle-même, inhibant, de ce fait, la formation de l'apoptosome (Shapiro *et al.*, 2008). Alors que cette inhibition de Dronc n'est pas restreinte à sa forme active, l'interaction avec drICE se faisant grâce au domaine BIR1 de type II, il est nécessaire que drICE soit clivée pour permettre la liaison de dIAP1 (Kaiser, Vucic and Miller, 1998; Zachariou *et al.*, 2003). drICE n'est pas la

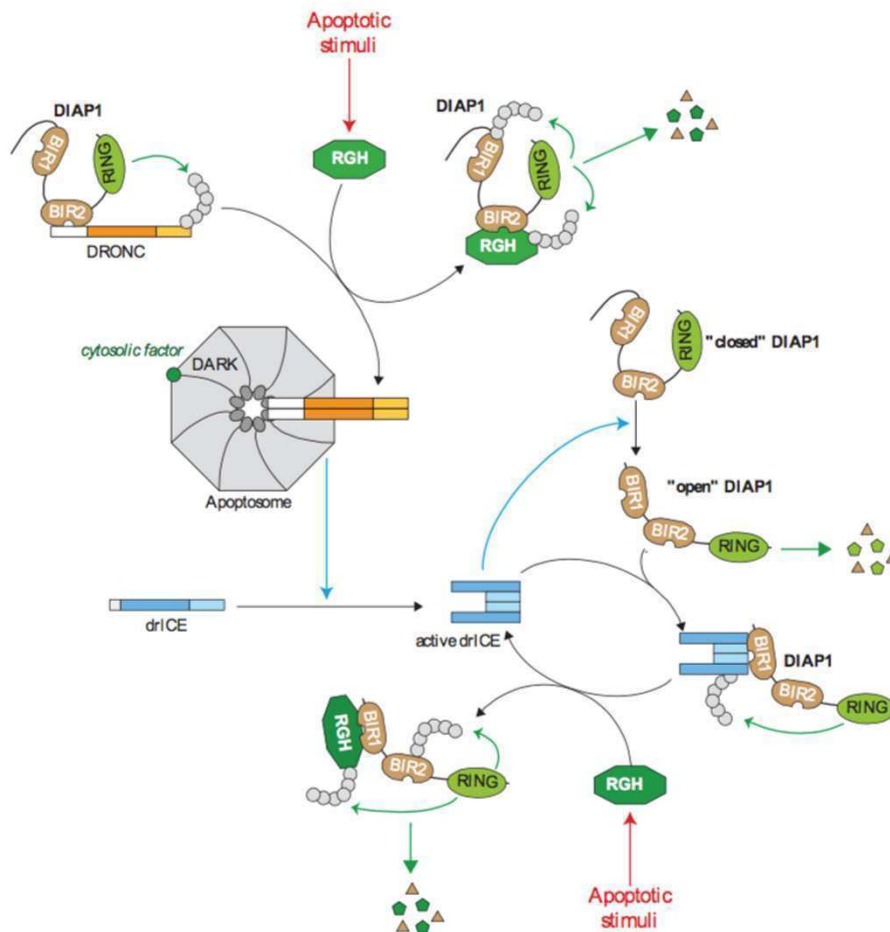


Figure 20. Régulation de l'activité des caspases par les IAPs chez la drosophile.

Dans les cellules vivantes, l'activité des caspases est maintenu sous contrôle par l'interaction direct entre les caspase et dIAP1. Le domaine BIR2 lie le prodomaine de la caspase initiateur Dronc alors que le domaine RING induit son ubiquitination. Les caspases effectrices peuvent venir « ouvrir » la conformation de dIAP1 en dégradant son extrémité N-terminale ce qui a pour effet d'exposer le domaine BIR1. dIAP1 peut alors réguler ces caspases effectrices par ubiquitination ou neddylation. Des stimuli apoptotiques induisent l'expression des RHGs qui viennent se lier à dIAP1 pour la neutraliser. Cette interaction facilite l'autoubiquitination et la dégradation de dIAP1.

Issu de: Berthelet and Dubrez, 2007

seule protéine à nécessiter un clivage puisque, dIAP1 aussi nécessite une coupure par drICE pour permettre l'exposition du domaine BIR1 (Tenev *et al.*, 2007; Li, Wang and Shi, 2011). Le mécanisme de régulation de drICE, lorsque l'interaction est enfin possible, reste peu clair bien que l'implication d'une ubiquitination ou d'une neddylation soit proposée (Ditzel *et al.*, 2008; Broemer *et al.*, 2010) (Figure 20).

dIAP2 possède trois domaines BIRs et un domaine RING. Pour autant, elle est dédiée au système immunitaire inné, de par son interaction avec Dredd, donnant notamment à la drosophile la capacité de résister aux bactéries gram-négatives (Huh *et al.*, 2007; Meinander *et al.*, 2012). dBruce possède un domaine BIR et un domaine UBC en C-terminal caractéristiques des enzymes de conjugaison de l'Ub. Il est quant à lui restreint à une activité dans la spermatogenèse, la mutation de *dbruce* induisant une stérilité masculine (Kaplan *et al.*, 2010).

Enfin, la Deterin, homologue de la Survivin de mammifère, ne possède qu'un domaine BIR et pas de domaine RING. Elle est exprimée très précocement au cours du développement de la drosophile mais son rôle n'a pour le moment pas été réellement déterminé (Jones *et al.*, 2000).

c. Les protéines Rpr, Hid et Grim (RHGs)

Les IAPs de drosophile sont principalement régulées par des gènes localisés dans une région très précise du génome de drosophile. Le laboratoire de H. Steller a observé chez les mutants présentant la délétion chromosomique *H99* une perte de la faculté de déclencher l'apoptose au cours du développement (Abbott and Lengyel, 1991; White *et al.*, 1994). L'étude des mutations de *hid* (head involution defective) a permis de mettre en évidence une famille de protéines capables d'induire l'apoptose en inhibant les IAPs. L'étude plus approfondie de la région de la délétion a révélé la présence de deux autres gènes à l'activité proche de *hid*, *rpr* (reaper) (White *et al.*, 1994) et *grim* (P. Chen *et al.*, 1996). Les protéines codées par ces gènes ont un mode d'action similaire à celui de Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) aussi appelée Diablo, une protéine de mammifère. Elles peuvent fixer le domaine BIR des IAPs grâce à la présence d'un domaine IBM (aussi appelé RHG dans cette famille) localisé à leur extrémité N-terminal (Goyal *et al.*, 2000) (Figure 21).

L'activité pro-apoptotique des protéines RHG réside dans cette interaction avec les IAPs qui finalement empêche par compétition que les IAPs se lient aux caspases. Alors que Rpr

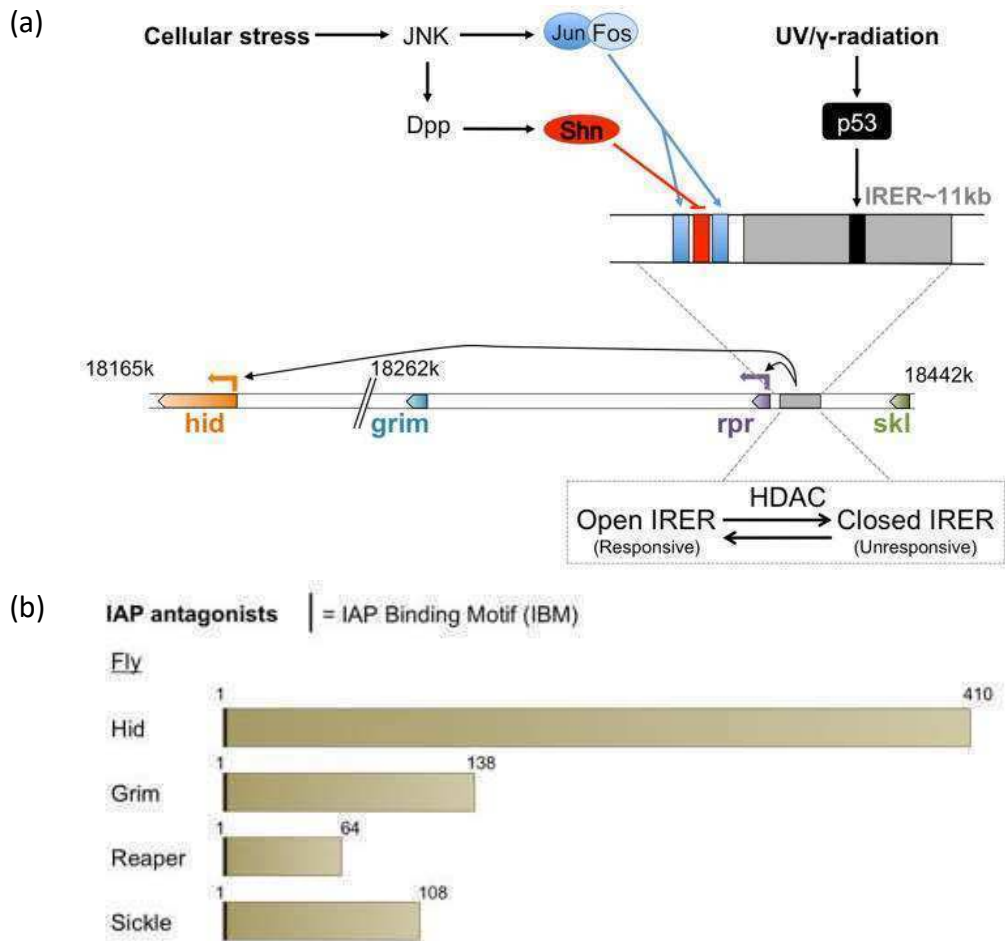


Figure 21. Diagramme schématique de la régulation des RHGs au locus H99 et carte des domaines protéiques des RHGs et de leurs homologues mammifères.

(a) Le locus H99 situé sur le bras chromosomique 3L contient les gènes *reaper* (*rpr*), *hid*, *grim* et *sickle* (*skl*) codant quatre antagonistes aux IAPs. Une région de 12 kpb située en amont de la séquence de *rpr* est le centre principal de régulation transcriptionnelle de *rpr* et *hid*. Il contient une région de réponse aux irradiations (IRER) qui est un site important de fixation de p53 en cas d'apoptose induite par irradiation. Cette région est fortement régulée épigénétiquement au cours du développement par des HDAC et des méthylases. Les régions promotrices en amont de *rpr* contiennent des sites de fixation de plusieurs facteurs de transcription capable d'induire une apoptose dépendante de JNK.

(b) La plupart des antagonistes aux IAPs contiennent une séquence IBM à leur extrémité N-terminale. Située juste après la méthionine, celle-ci est clivée pour permettre l'exposition de ce domaine permettant la liaison aux IAPs.

Issu de: Vasudevan and Ryoo, 2015

et Grim peuvent interagir avec les deux types de domaines BIR, Hid ne peut le faire qu'avec un BIRs de type II (Chai *et al.*, 2003; Zachariou *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004). Celle-ci ne peut donc pas lever l'inhibition des caspases effectrices contrairement aux premières. En plus de l'inhibition des IAPs par compétition, les membres de la famille RHG déclenchent l'auto-ubiquitination de dIAP1 ainsi que son ubiquitination par des enzymes E2-Ub ligases comme Morgue (Modifier of reaper and grim ubiquitously expressed) et UbcD1 (Ryoo *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2002; Yoo, 2005). De plus, la protéine DCAF12 (DDB1 and CUL4 associated factor 12) a récemment été mise en évidence pour son rôle dans le clivage de dIAP1 (Hwangbo *et al.*, 2016). L'action des RHGs passe aussi par une inhibition générale de la traduction qui empêche notamment la néo-synthèse des IAPs tout en affectant peu les caspases qui sont déjà là en attente d'activation (Holley *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2002). Les ARNm codant les RHG qui comportent des séquences IRES (internal ribosome entry site) ne sont pas affectés par cette baisse globale de la traduction, (Hernández *et al.*, 2004; Vazquez-Pianzola *et al.*, 2007).

Rpr et Grim possèdent par ailleurs un motif commun appelé GH3 (Grim helix 3) (Claveria *et al.*, 2002). Ce domaine est nécessaire à l'activité pro-apoptotique de ces protéines et est même suffisant pour induire de l'apoptose. De plus, il permet une localisation mitochondriale de Rpr et Grim. Cette localisation est essentielle dans leur activité. Hid, qui ne possède pas GH3, présente tout de même une séquence de localisation mitochondriale à son extrémité C-terminal (Sandu, Ryoo and Steller, 2010).

Les trois gènes, de cette famille de la même famille, présentent une faible similarité de leur séquence. Cela se traduit d'ailleurs par une faible redondance fonctionnelle. Les domaines RHG sont même fonctionnellement différents, le remplacement de celui de Grim par celui de Rpr, par exemple, ne permettant pas à Grim d'induire efficacement l'apoptose (Wing, Schwartz and Nambu, 2001). Cette spécificité est d'ailleurs observée dans l'apoptose de certains tissus comme celle des cellules inter-ommatidiales de l'œil en développement (Yu *et al.*, 2002) ou des cellules polaires au cours de l'ovogenèse (Khammari *et al.*, 2011). Cela n'empêche pas que leur activité combinée soit nécessaire à l'apoptose d'autres types tissulaires (Robinow, Draizen and Truman, 1997; Wing, Schwartz and Nambu, 2001).

Il existe d'autres membres de la famille RHG qui furent découverts plus tard et dont le mode d'action est bien moins décrit. Sickie, Jafrac2 et dOmi/Htra2 (High temperature requirement A2) possèdent tous la séquence RHG. *sickle (skl)* est localisé dans la région *H99*

dans laquelle sont réunis les gènes RHGs décrits précédemment. Il partage avec ceux-ci la capacité d'induire l'apoptose en inhibant dIAP1 et présente une expression régulée au cours du développement (Srinivasula *et al.*, 2002). Jafrac2 fut d'abord identifiée comme peroxiredoxine, une protéine interagissant avec les EAO pour détoxifier la cellule (Rodriguez *et al.*, 2000). Outre ce domaine à activité peroxydase, la protéine possède une séquence d'adressage au réticulum endoplasmique. Elle possède toujours la capacité à induire l'apoptose interagissant avec dIAP1 (Tenev *et al.*, 2002). Enfin, dOmi/Htra2 est l'homologue de la protéine de mammifère Omi/Htra2. Elle est localisée au niveau de l'espace intermembranaire mitochondriale. Suite à des signaux apoptotiques, elle sort de la mitochondrie où, tout en restant proche de la membrane, elle est capable d'inhiber dIAP1 pour induire l'apoptose (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007).

La régulation des RHGs est principalement transcriptionnelle. Rpr et Grim ne sont produites que dans les cellules destinées à mourir tandis que Hid est aussi produite dans les cellules survivantes (White *et al.*, 1994; P. Chen *et al.*, 1996; Robinow, Draizen and Truman, 1997; Bangs, Franc and White, 2000). En fonction de l'environnement et du développement, la transcription de *rpr* et *grim* est stimulée, induisant ainsi l'apoptose (Robinow, Draizen and Truman, 1997; Bergmann *et al.*, 1998; Kurada and White, 1998; Kang *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2015). Une régulation négative peut aussi avoir lieu au niveau post-transcriptionnel (Brennecke *et al.*, 2003) et post-traductionnel, dIAP1 pouvant induire l'ubiquitination de Rpr lors de leur interaction (Olson, Holley, Yoo, *et al.*, 2003). La protéine Hid quant à elle a son activité contrôlée par la voie EGF/Ras (Bergmann *et al.*, 1998).

d. Evènements mitochondriaux

Le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose de cellules de mammifère n'est plus à démontrer depuis longtemps. Dans ces organismes, la voie d'apoptose intrinsèque nécessite des remaniements majeurs de la mitochondrie pour permettre le relargage d'éléments très importants dans le cytosol tels que le cytochrome *c* (permettant la formation de l'apoptosome) et Smac/DIABLO. J'ai abordé les évènements mitochondriaux induits au cours de l'apoptose dans la partie traitant de cet organe au paragraphe (A.d).

Chez *D. melanogaster*, ce rôle est très débattu au sein de la communauté. Les premiers résultats obtenus dans l'étude de l'apoptose chez cet organisme semblent indiquer une

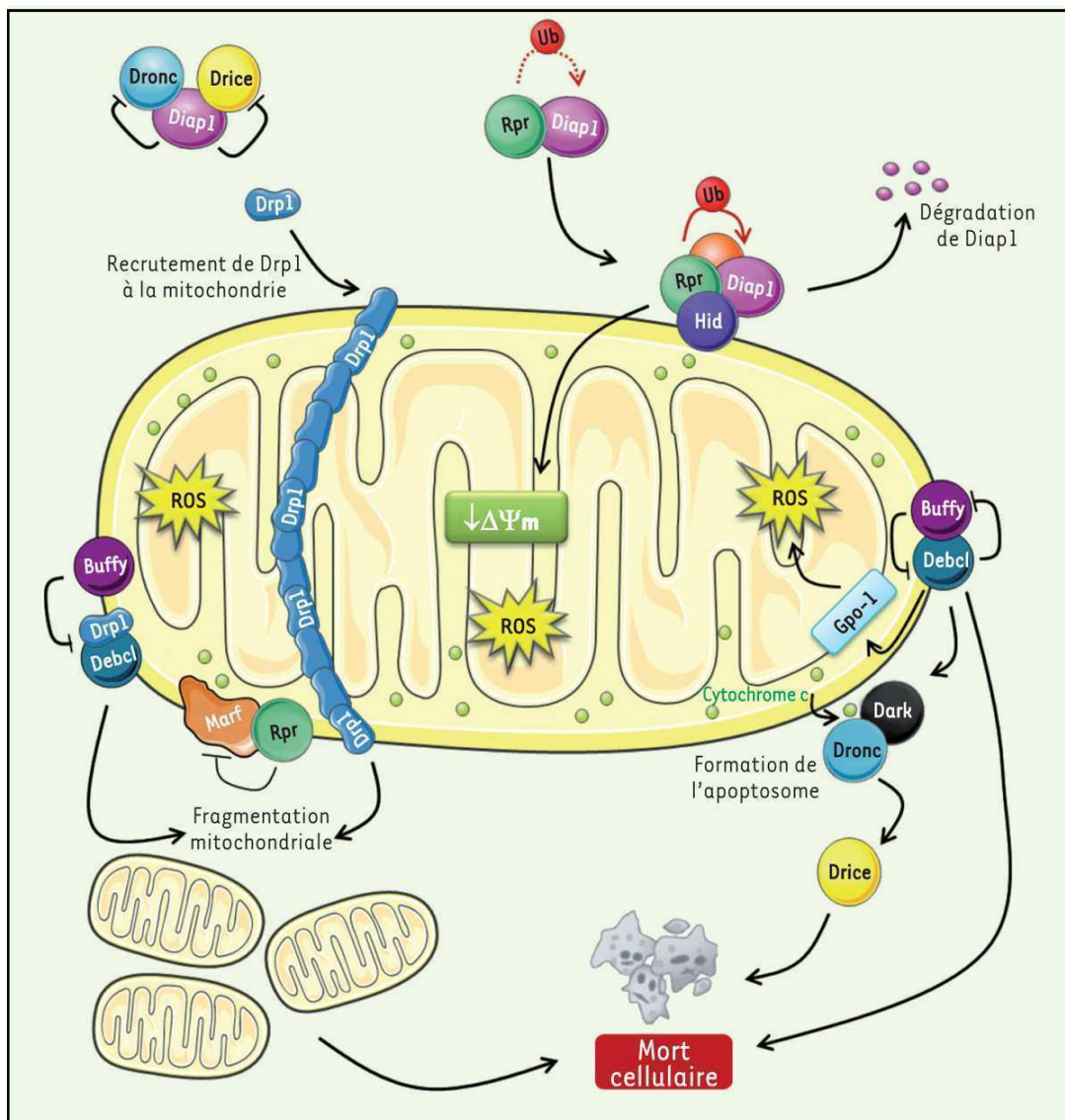


Figure 22. Voie de mort mitochondriale chez la drosophile.

Le cytochrome c est exposé à la surface mitochondriale en réponse à un stimulus apoptotique. Cette exposition favoriserait la formation d'un apoptosome à proximité de la mitochondrie. Debc1 et Buffy, toutes deux mitochondriales, jouent un rôle dans la mort induite par un stress. Gpo-1 (glycérophosphate oxydase-1) participe à la mort cellulaire induite par Debc1 en favorisant l'accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Les RHG sont recrutés à la mitochondrie en réponse au stimulus apoptotique. Cette localisation mitochondriale accroît la capacité de Rpr d'induire la dégradation de dIAP1. Rpr peut également altérer le potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). En outre, Rpr favorise la fragmentation mitochondriale en inhibant la protéine pro-fusion Marf (mitochondrial assembly regulatory factor). Debc1 induit également une fragmentation mitochondriale en interagissant avec la protéine pro-fission Drp1 (dynamamin-related protein1). Cette fragmentation mitochondriale est requise pour une mort cellulaire efficace. Ub : ubiquitination
 Issu de: Clavier *et al.*, 2016

absence de diffusion de cytochrome *c* dans le cytosol (Dorstyn *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2002; Means, Muro and Clem, 2006). Celui-ci semblait donc rester associé à la mitochondrie et n'interviendrait pas dans l'assemblage de l'apoptosome (Varkey *et al.*, 1999). Il n'apparaît donc pas nécessaire à l'apoptose comme cela avait été décrit chez les mammifères (Li *et al.*, 1997). Des résultats plus récents qui vont à l'encontre de ces premières observations, ont permis de mettre en évidence que certains événements mitochondriaux sont bien communs aux mammifères et à la drosophile bien qu'ils soient moins prépondérants chez cette dernière et semble survenir à une phase tardive du processus. Ont ainsi été conservés la perméabilisation de la membrane et le relargage de dOmi/HtrA2 (Abdelwahid *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007) (Figure 22).

En fait, la mitochondrie semble d'avantage avoir une fonction de « point de rendez-vous » pour un certain nombre de facteurs pro-apoptotique. En effet, l'activité des protéines Rpr et Hid nécessitent une localisation mitochondriale dans le processus d'obtention de leur activité apoptotique (Claveria *et al.*, 2002; Olson, Holley, Gan, *et al.*, 2003).

L'étude de l'apoptose chez la drosophile est particulièrement intéressante pour ce qu'elle apporte dans la compréhension de celle de cellules de mammifère. Le nombre de protéines impliquées est largement moindre comparé aux mammifères, simplifiant les interactions entre chacune. De plus, le changement dans l'importance des régulateurs permet la mise en évidence de phénomènes qui sont difficilement observables chez les mammifères. Ces simplifications permettront ensuite d'élaborer des hypothèses solides à tester chez ces derniers. D'un point de vu plus global, la drosophile permet une approche *in vivo* très utile à la compréhension des phénomènes de réponse d'un tissu à l'apoptose de certaines de ses cellules. C'est ainsi que la prolifération compensatoire a pu être mise en évidence puis étudiée grâce à la drosophile (Haynie and Bryant, 1977; Fan and Bergmann, 2008).

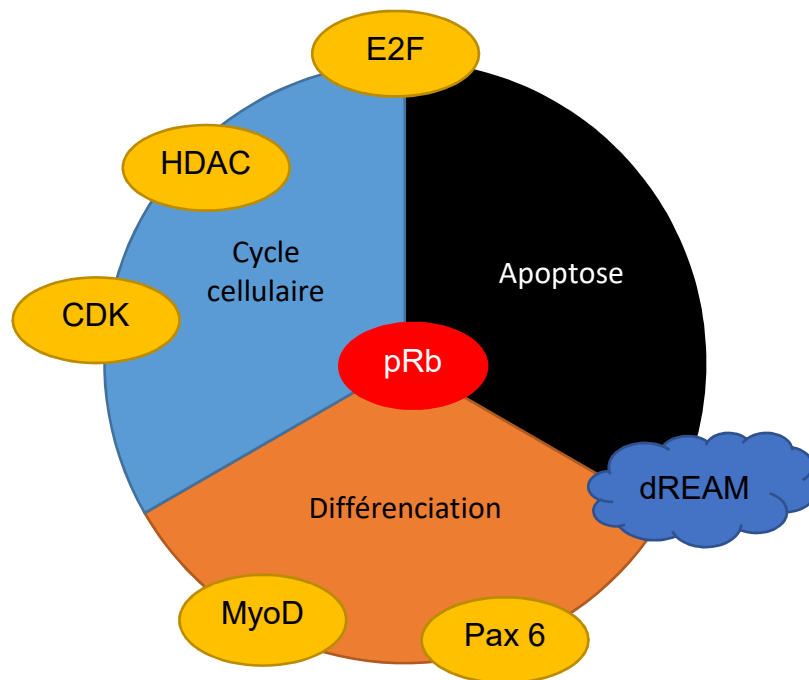


Figure 23. pRb est impliqué dans trois grands processus cellulaire.

Certain de ses partenaires sont impliqués dans un processus en particulier (e. g. les CDKs pour le cycle cellulaire). D'autres sont d'avantage centraux tels que les membres de la famille E2F.

C. Rbf1

Le gène *rb* est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié chez l'Homme. Une mutation touchant *rb* a ainsi été découverte dans un cas de rétinoblastome, une tumeur intraoculaire de l'enfant mettant en jeu le pronostic vital. Par la suite, son implication directe ou indirecte a été démontrée dans la quasi-totalité des cancers (Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr and McCormick, 2002; Gordon and Du, 2011; Viatour and Sage, 2011) pour lesquels une répression transcriptionnelle de *rb*, des mutations affectant le gène *rb* directement ou des gènes codant des régulateurs de *rb* ont été mis en évidence. L'inactivation de la fonction de *rb* peut également dépendre de protéines virales (Feinberg and Tycko, 2004).

Pour exercer son activité, pRb, la protéine codée par *rb*, interagit principalement avec des protéines nucléaires capables de se lier à l'ADN. Cette interaction peut mener à une activation ou une inhibition de l'activité de pRb (Morris and Dyson, 2001) qui régule de nombreux processus biologiques cellulaires tels que la prolifération (Chellappan *et al.*, 1991; Henley and Dick, 2012), la différenciation (Korenjak and Brehm, 2005; Julian and Blais, 2015), l'apoptose (Hickman, Moroni and Helin, 2002) ou la stabilité génétique (Knudsen, Sexton and Mayhew, 2006). Chacune de ces fonctions sera détaillée par la suite (Figure 23).

Le rôle de ce gène est donc central pour la bonne régulation du devenir cellulaire. Cela se traduit par une très bonne conservation de ce gène et de ses fonctions au cours de l'évolution. La régulation de ces différentes fonctions passe par une interaction avec des partenaires particulièrement nombreux chez les mammifères. Chez la drosophile, un homologue de *rb* appelé *rbf1*, et des homologues codant les partenaires de la protéine pRb, ont été mis en évidence. La drosophile en tant qu'organisme modèle a été utilisé tant pour la diversité des outils génétiques disponibles que pour la faisabilité des études *in vivo* qu'il permet. La variété des fonctions dans lesquelles *rbf1* est impliquée rend la recherche dans ce modèle particulièrement intéressante, ce que confirme la littérature fournie sur ce sujet.

1. Les protéines à poches

La protéine pRb fait partie de la famille des « protéines à poche » (Figure 24). Cette famille est constituée de trois protéines différentes chez les mammifères : pRb, p107 et p130

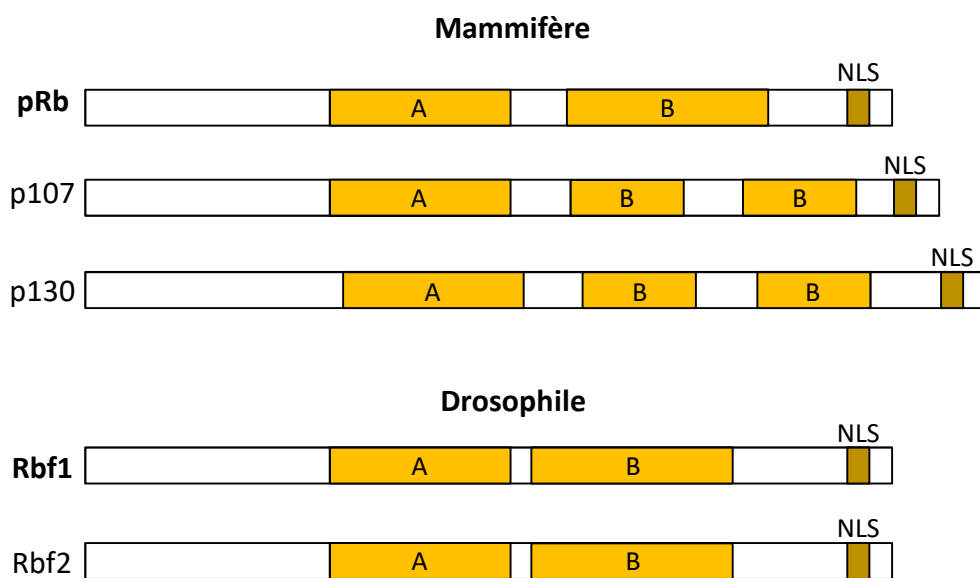


Figure 24. Les protéines « à poche ».

La famille des protéines à poche est constituée de trois membres chez les mammifères tandis que seulement deux sont retrouvés chez la drosophile. Ceux-ci sont d'ailleurs plus proches entre eux que ne le sont les représentants des mammifères.

(Claudio, Tonini and Giordano, 2002; Dyer and Bremner, 2005; Liban *et al.*, 2016). Les représentants de cette famille ont en commun d'avoir un effet inhibiteur sur la progression dans le cycle cellulaire (Cobrinik, 2005; Henley and Dick, 2012) cependant des mutations sur les gènes codant p107 et p130 ont moins été fréquemment répertoriées. Cela fait de *rb*, le gène de « protéine à poche » le plus étudié (Classon and Dyson, 2001).

Le niveau d'expression des gènes codant pour ces protéines est très variable au cours du développement. En accord avec la première pathologie dans laquelle l'implication d'une perte de fonction du gène a été démontrée, *rb* est fortement exprimé dans les cellules du cristallin et les cellules ganglionnaires de la rétine avant et pendant la différenciation. On le retrouve aussi exprimé de manière importante au cours de la neurogenèse, de l'hématopoïèse et de la myogenèse. De son côté, *p107* est exprimé dans le cœur, le poumon, le rein et l'intestin. Enfin, les deux gènes sont co-exprimés dans le système nerveux central et le foie. Pour sa part, *p130* ne semble pas fortement exprimé pendant l'embryogenèse quel que soit le tissu (Jiang *et al.*, 1997).

a. Structure protéique des protéines à poche

Les protéines à poche sont définies par la présence de deux domaines A et B ressemblant fortement au domaine hélicoïdal des cyclines (Kim and Cho, 1997; Lee, Russo and Pavletich, 1998). Ces domaines interagissent entre eux pour former une « petite poche » (ou « poche A/B ») fortement conservée (Claudio, Tonini and Giordano, 2002). Elle permet l'interaction avec des partenaires comme les membres de la famille E2F et d'autres facteurs de transcription. Ce domaine possède aussi une forte affinité pour le motif LxCxE porté notamment par des enzymes de remodelage de la chromatine et certaines protéines virales comme l'antigène T du virus SV40 (Lee, Russo and Pavletich, 1998).

pRb est une protéine de 928 acides aminés partageant des caractéristiques avec les autres protéines à poches mais qui comporte également des spécificités. Ainsi il a été mis en évidence à son extrémité N-ter une région appelée « RbN » permettant une liaison à une cycline et à son extrémité C-ter, une séquence spécifique de 150 acides aminés appelée « RbC » (Rubin *et al.*, 2005; Hassler *et al.*, 2007) contenant une séquence d'adressage au noyau (NLS) (Zacksenhaus *et al.*, 1993). Cette région RbC peut interagir avec la petite poche pour former la « grande poche » et est nécessaire et suffisante pour inhiber le cycle cellulaire (Qin *et al.*, 1992; Hiebert, 1993). Les complexes Cycline-cyclin-dependent kinase (CDK)

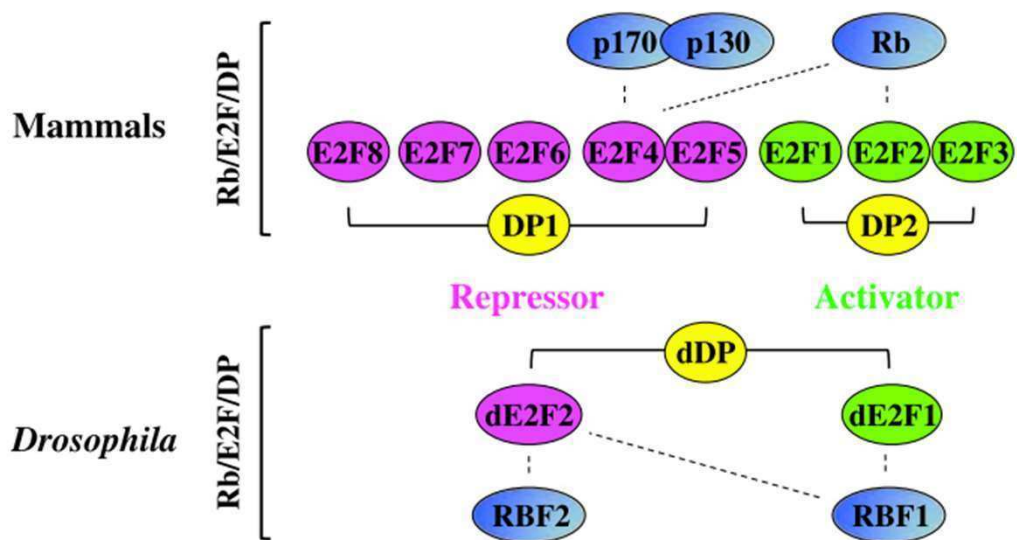


Figure 25. Interactions fonctionnelles entre les facteurs E2F/ DP et les protéines à poche chez les mammifères et la drosophile.

Les partenaires des protéines à poche sont plus variés chez les mammifères que chez la drosophile. Cette variété donne lieu à des redondances rendant l'étude de pRb moins évidente que son homologue de drosophile, Rbf1.

Issu de : Tsuda et Lim, 2014

interagissent avec pRb grâce à RbC (Adams *et al.*, 1999). Les séquences de liaison entre les domaines sont très importantes pour la régulation de l'activité de pRb puisque s'y trouvent les sites de phosphorylation ciblés par les complexes Cycline-CDK nécessaires à son inactivation (Burke *et al.*, 2010).

Chez *D. melanogaster*, Rbf1 est une protéine de 95kDa comportant 845 acides aminés. Elle possède les domaines A et B qui permettent l'interaction avec les membres de la famille E2F présents chez la drosophile ainsi que des domaines RbN et RbC. RbN intervient dans la liaison avec d'autres partenaires tels que ORC2, appartenant au complexe de réplication, et Squid, protéine de liaison aux ARNs (Ahlander, Chen and Bosco, 2008; Ahlander and Bosco, 2009). Le domaine en C-terminal ne possède pas de séquence similaire à la séquence NLS (Nuclear Localization Signal) présente dans pRb chez les mammifères mais l'absence des 59 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine entraîne la perte la localisation nucléaire de celle-ci (Acharya *et al.*, 2010) (Figure 25).

b. Mode d'action des protéines à poche

Pour remplir ses fonctions, pRb interagit avec les protéines des familles E2F et DP. Le rôle de DP (Differentiation-regulated transcription factor polypeptide) est important pour la liaison des protéines E2F à l'ADN mais n'est pas déterminant dans le type de régulation qu'exercera le complexe sur le gène cible (Girling *et al.*, 1993). Les trois membres appartenant à cette famille peuvent remplir cette fonction sans qu'il ne soit observé de grande différence d'action entre les uns et les autres.

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont au nombre de 8 chez les mammifères. Ils possèdent tous un DBD (DNA-binding domain) et un domaine de dimérisation. On peut les classer en trois groupes :

Les E2F1, 2 et 3 ont une activité activatrice sur la transcription. Ces protéines contiennent un site de liaison aux CDKs, une NLS à l'extrémité N-terminale et un site de liaison à pRb du côté C-terminal. Elle induit notamment l'expression des gènes impliqués dans la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

Les E2F4 et 5 répriment la transcription. Elles possèdent un site de liaison à pRb du côté C-terminal mais, contrairement au premier groupe, ne possèdent pas de NLS. Par contre on trouve une NES (nuclear export signal) dans leur séquence. La formation d'un complexe

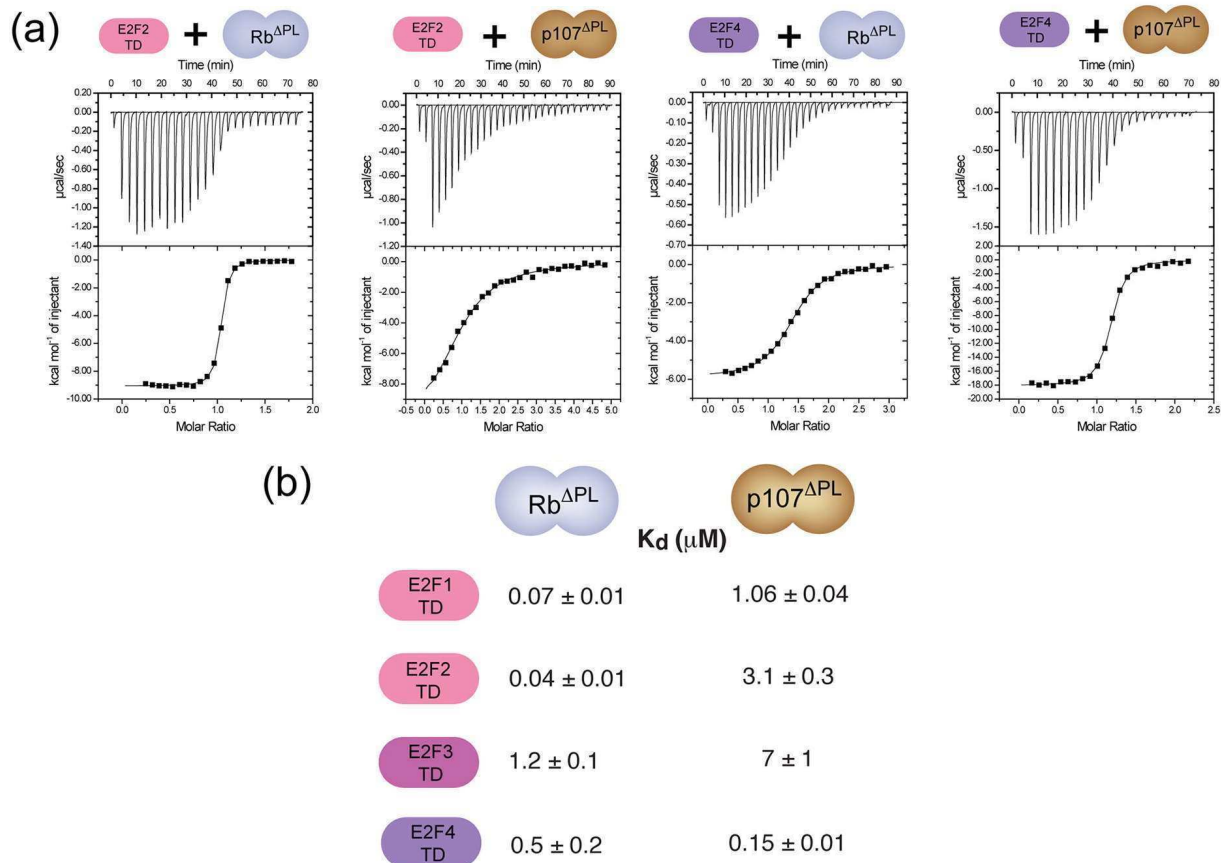


Figure 26. Mesure de l'affinité entre les protéines à poche à les protéines E2F.

(a) La spécificité des protéines à poches vis-à-vis des facteurs de transcription de la famille E2F peut être mise en évidence par des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC). Les graphiques représentent les mesures ayant permis de calculer les constantes d'associations présentées en (b).

(b) L'affinité de pRb et p107 pour les protéines E2F1, -2, -3 et -4 est mesurée par ITC et résumé dans le tableau.

Issu de : Liban *et al.*, 2016

entre pRb et E2F4 ou 5 permet leur translocation dans le noyau au cours des phases G0 et G1 (Müller *et al.*, 1997; Verona *et al.*, 1997).

Les protéines E2F6 à 8, qui constituent le dernier groupe, fonctionnent, elles aussi, comme des répresseurs de la transcription mais n'ont pas de site de liaison à aux protéines à poche.

L'interaction entre pRb et les E2Fs activatrices de la transcription bloque la capacité de ces E2F à induire l'expression de leurs cibles. Par leur interaction avec les E2F inhibitrices, les protéines à poches permettent le recrutement d'enzymes modificatrices de la chromatine au niveau des sites de liaison aux E2Fs pour induire le silence des gènes à proximités. La régulation négative de pRb par phosphorylations successives va permettre de lever cette interaction libérant les E2Fs activatrices. Les capacités de liaison entre les membres de la famille E2F et les protéines à poche ne sont pas exactement redondantes. Alors que pRb est capable de se lier aux facteurs E2F1 à 4, p107 et p130 se lient à E2F4 et 5. Le plus large spectre d'interaction de pRb peut en partie expliquer son impact plus important sur le processus oncogénique (Figure 26).

Les différentes approches utilisées pour établir la liste des cibles spécifiques de pRb donnent une image particulièrement complexe de son action. De nombreuses cibles varient en fonction de l'état prolifératif, quiescent ou sénescence des cellules. Il est pour le moment difficile de déterminer la liste des *loci* contrôlés spécifiquement par pRb (Wells *et al.*, 2003; Chicas *et al.*, 2010).

Chez la drosophile, il n'existe que deux membres de la famille E2F. dE2F1 est un facteur activateur de la transcription tandis que dE2F2 agit généralement comme un répresseur de la transcription. Rbf1 présente le même type de fonctionnement concernant son interaction avec dE2F1 puisque celle-ci inhibe l'activité de ce dernier en l'empêchant de se lier à l'ADN.

pRb a un autre mode d'action permettant la répression des gènes régulés par E2F : l'induction de modifications de la chromatine affectant son organisation. Dans cette forme d'inhibition active, la protéine induit le recrutement de complexes protéiques tels que SWI/SNF dont l'action sur les histones va mener à des modifications de l'accessibilité à l'information génétique. L'effet peut être activateur si les modifications apportées induisent un relâchement de la chromatine. Dans ce cas-là, les inducteurs et les effecteurs de la transcription auront des facilités à se lier aux gènes localisés dans cette région du génome. Pour un effet inhibiteur, les modifications apportées aux histones vont mener à une

compaction de l'ADN. Les protéines responsables de la transcription ont alors plus de mal à accéder aux séquences avec lesquelles elles doivent interagir.

L'interaction entre le complexe E2F/pRb et le complexe SWI/SNF comprenant la protéine Brm et/ou BRG1 (Brm-related gene 1) a un effet inactivateur (Strobeck *et al.*, 2002). Elle est d'ailleurs impliquée dans l'effet inhibiteur du cycle cellulaire induit par pRb. Le recrutement du complexe SWI/SNF passe par le recrutement de Brm ou BRG1 via leur domaine LxCxE. Leur activité ATPase, en association à des enzymes de modification des histones, est alors utilisée pour changer la structure des nucléosomes et compacter la chromatine (Uchida, 2016).

L'acétylation des histones induit une décompaction de l'ADN ce qui favorise la transcription. L'interaction de pRb avec HDAC1 (Histone deacetylase 1) induit donc une inhibition de la transcription. Il n'est pas encore défini si cette interaction était directe ou indirecte mais il est prouvé qu'elle requière le domaine d'interaction de pRb avec le domaine LxCxE porté par HDAC (Dahiya *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001). De manière étonnante, il est observé que les HDACs sont surexprimées dans de nombreux cancers. D'ailleurs, des inhibiteurs de HDACs ont été identifiés comme ayant un effet anti-cancéreux (Ropero and Esteller, 2007). Les HDACs ayant de nombreuses cibles qui ne sont pas forcément des histones, il est toutefois possible que cette observation soit due à des effets indépendants de E2F/pRb sur la survie cellulaire.

Les phénomènes de méthylation/dé-méthylation des histones constituent un autre moyen de réguler la structure chromatinienne. Ce mode d'action fait partie des modes d'actions de pRb pour moduler l'activité de ses cibles. L'interaction de pRb avec Suv39h1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1) induit les tri-méthylation (me3) ou di-méthylation (me2) de H3K9 (Histone H3 lysine 9). Elles sont considérées comme des marquages d'histones à effet répressif (« repressive histone mark ») (Rea *et al.*, 2000). Ces méthylations sont reconnues par HP1 (heterochromatin protein 1), une protéine capable, par ailleurs, d'interagir directement avec pRb (Bannister *et al.*, 2001; Vandell *et al.*, 2001). Le complexe HP1-pRb augmente alors le recrutement de Suv39h1 au niveau de l'ADN ce qui conduira à la formation d'hétérochromatine fortement compactée (Schotta *et al.*, 2002). Ce phénomène est même renforcé par la capacité de HDAC à recruter Suv39h1 et Suv39h1 lui-même à recruter HP1 directement (Vaute *et al.*, 2002). L'ensemble des modifications apportées par ces protéines à

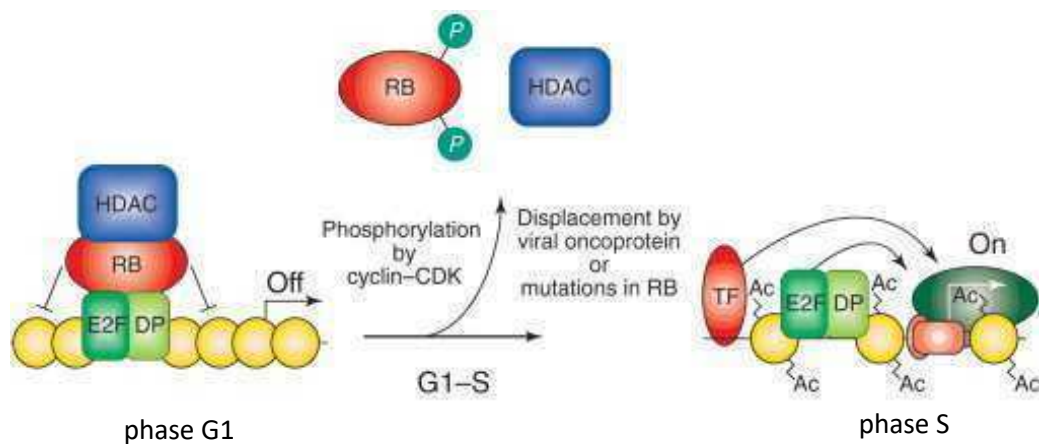


Figure 27. Répression de la chromatine induite par pRb au cours du cycle cellulaire.

Un complexe impliquant pRb et HDAC se lie aux promoteurs de gènes spécifique de la phase S. HDAC agit sur la chromatine environnante favorisant une conformation fermée ce qui réprime la transcription. La phosphorylation de pRb par les CDK entraîne la dissociation du complexe. L'état de compaction de la chromatine n'est plus maintenu et les gènes sont de nouveau accessibles pour leur transcription.

Issu de : Brehm and Kouzarides, 1999

la chromatine vont dans le même sens : la répression de l'expression des gènes situés à proximité (Uchida, 2016).

pRb peut aussi interagir avec les dé-méthylases LSD1 (lysine demethylase 1) et RBP2 (Retinoblastoma Binding Protein 2) induisant les retraits respectifs des me1/2 et me3 de H3K4 (Christensen *et al.*, 2007; Chau *et al.*, 2008). Contrairement aux méthylations précédentes, celles-ci sont considérées comme des marquages des histones à effet activateur (« active histone mark »). En induisant la dé-méthylation, ces enzymes participent à la répression des gènes à proximité. Contrairement au recrutement des autres protéines impliquées dans la modulation de la chromatine, pRb interagit avec ces protéines malgré qu'elles ne possèdent pas de domaine LxCxE. De plus, l'interaction avec LSD1 nécessite que pRb ne soit pas liée à E2F (Chau *et al.*, 2008). Alors que le fonctionnement de LSD1 dans la répression dépendante de E2F-pRb reste peu clair pour le moment, l'activité de RBP2 est principalement démontrée dans la différenciation (Lopez-Bigas *et al.*, 2008).

Enfin, pRb interagit avec DNMT1 (DNA methyl transferase 1) qui, comme son nom l'indique, induit la méthylation de l'ADN. Cette protéine est capable de s'associer à HDAC *in vivo* (Robertson *et al.*, 2000) ce qui révèle son implication dans les événements d'acétylation et de méthylation décrits précédemment (Fuks *et al.*, 2000, 2003). Toutes ces modulations induisent une répression efficace de la transcription (Ling *et al.*, 2004).

Chez la drosophile, des mécanismes similaires ont pu être observés. Rbf1 est capable d'interagir avec dE2F2 et dMyb pour former le cœur du complexe dREAM (Drosophila RB, E2F, and Myb) qui comprend d'autres partenaires. Ce complexe est responsable du recrutement de HDAC au niveau des séquences ciblées entraînant la dé-acétylation des histones proches. De cette façon, dREAM inhibe l'expression de certaines cibles du couple dE2F2/Rbf1. Il permet aussi le recrutement de E(Z), une méthyl-transférase qui induit la di-méthylation de la lysine 27 des histones H3 (H3K27me2). Cette méthylation est observée sur les gènes réprimés mais semble être indépendante de l'état d'acétylation (Lee *et al.*, 2010). Enfin, on trouve le même type de méthylation de l'arginine 8 de l'histone H3 (H3K9) qui est observée chez les mammifères (Schotta *et al.*, 2002) (Figure 27).

Tout d'abord identifié chez la *drosophile* et chez *C. elegans*, le complexe dREAM a aussi été mis en évidence chez les mammifères sous le nom de complexe DREAM ou LINC. A ce jour, pRb n'a pas été retrouvé au sein de ce complexe à la différence des protéines p107 or p130. Alors que chez la drosophile il semble d'avantage axé sur la régulation de gènes impliqués

dans le développement, le rôle de dREAM chez l'homme semble centré sur la régulation du cycle cellulaire (Georgette *et al.*, 2007; Litovchick *et al.*, 2007). L'importance de ces mécanismes est bien établie dans le cycle cellulaire et moins dans la différenciation et l'apoptose.

Au-delà de son rôle dans la régulation de gènes spécifiques, *rb* est important dans le maintien de l'intégrité de la chromatine. Un mutant dont il manque le domaine d'interaction avec LxCxE sur pRb induit la formation de structures anormales de chromatine, une décondensation chromatinienne et l'obtention de chromosomes « en papillon » (*butterfly chromosomes*) au moment de la mitose (Gonzalo *et al.*, 2005).

c. Mécanismes de régulation

rb est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire. Ce gène possède plusieurs sites d'initiation et aucune « boîte TATA » de régulation n'est observé dans la région promotrice. Celle-ci est par ailleurs riche en GC permettant la fixation et l'activation de la transcription du gène par les facteurs de transcription Sp1 (specificity protein 1) et ATF2 (activating transcription factor 2) (Hong *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1994). Cette absence de zone régulatrice forte fait de *rb* un gène de ménage (Claudio, Tonini and Giordano, 2002). Le produit transcriptionnel du gène *rb* peut par contre être régulé puisque certains microARNs sont décrits pour leur capacité à inhiber l'expression de ce gène en diminuant les quantités d'ARNm. C'est par exemple le cas des miR-106b, miR-622 ou miR-675 (Tsang *et al.*, 2010; Cai, Wang and Bao, 2011; Ma *et al.*, 2015). On trouve des exemples comparables pour *p130* avec le miR-106a (Liu *et al.*, 2013) et pour *p107* avec le miR-888 (Lewis *et al.*, 2014).

Ce sont les modifications post-traductionnelles des protéines à poche qui sont, parmi les modes de régulations de cette famille, les mieux observées et les plus largement décrites dans la littérature (Munro, Carr and La Thangue, 2012; Rubin, 2013). On trouve, en particulier, de nombreux sites de phosphorylation dans la séquence de pRb. Les phosphorylations à ces sites sont la plupart du temps inactivatrices en induisant un changement de conformation défavorable aux interactions avec ses partenaires (Lamber *et al.*, 2013; Rubin, 2013; Burke *et al.*, 2014). Chez la drosophile, les phosphorylations régulant *rbf1* sont aussi bien décrites (Zhang *et al.*, 2014). Ces phosphorylations multiples sont nécessaires au rôle de pRb dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire (Lundberg and Weinberg, 1998). Chacune des formes mono-phosphorylées existantes au début de la phase G1 peut aboutir à la forme

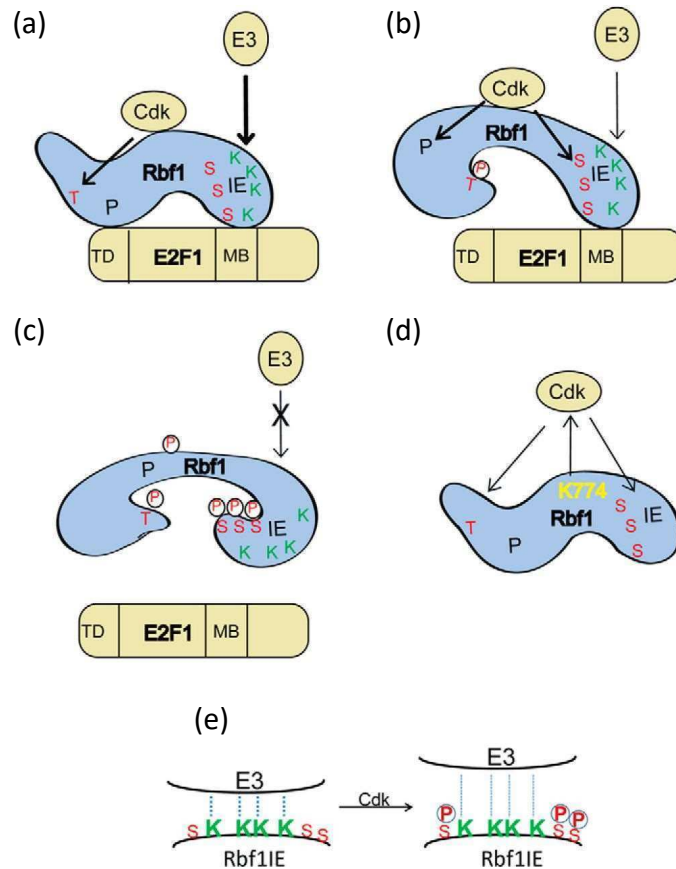


Figure 28. Modèle pour l'inactivation fonctionnelle et la stabilisation de Rbf1 par phosphorylation.

- (a) Rbf1 non-phosphorylé se lie à E2F1 au niveau des domaines de transactivation (TD) et de d'une séquence d'interaction avec son domaine C-terminal (MB).
- (b) La phosphorylation de Thréonine 356 par Cdk induit un changement de conformation partiel qui initiera les autres évènements de phosphorylation.
- (c) Quand son extrémité C-terminal est phosphorylée, l'interaction entre Rbf1 et E2F1 ainsi que celle avec la ligase E3 sont inhibées. Cela mènera à l'inactivation de Rbf1.
- (d) La Lysine 774 proche de l'extrémité N-terminale influence le ciblage des sites de phosphorylation de CDK.
- (e) Modèle de l'influence des phosphorylations au niveau de l'extrémité N-terminale sur l'interaction Rbf1/E3 ligase. Cette interaction est fortement affaiblit en présence de résidus Sérine phosphorylés.

Issu de : Zhang *et al.*, 2014

hyper-phosphorylée observée en fin de phase (Narasimha *et al.*, 2014). Des résultats récents ont montré que la phosphorylation peut aussi avoir un effet protecteur vis-à-vis des phosphorylations inactivatrices. Ainsi, la SAPK p38 (p38 stress-activated protein kinase) phosphoryle l'extrémité N-terminal de pRb pour insensibiliser celle-ci aux phosphorylations générées par les complexes Cycline-CDK (Joaquin, de Nadal and Posas, 2017).

Des modifications post-traductionnelles par acétylation et méthylations ont aussi pu être observées au niveau du domaine RbC (Munro, Carr and La Thangue, 2012). Le co-activateur transcriptionnel p300 acétyle pRb au niveau de deux lysines contigües. L'acétylation empêche la phosphorylation par les complexes Cycline-CDK, le changement de conformation du domaine RbC induisant une perte de son affinité avec ces complexes (Chan *et al.*, 2001). L'acétylation par Tip60, une autre acétyl-transférase, semble pour sa part induire la dégradation de pRb par le protéasome (Leduc *et al.*, 2006). L'acétylation induite par p300 est réversible. En effet, SIRT1 (sirtuin 1) peut interagir avec pRb pour la dé-acétyler au niveau de RbC (Wong and Weber, 2007) (Figure 28).

La méthyl-transférase Set7/9 peut méthyler pRb au niveau de résidus lysines présents dans le domaine RbC (Munro *et al.*, 2010). L'une d'elle va permettre l'interaction de pRb avec HP1 décrite précédemment. La seconde a lieu au niveau d'une séquence consensus de liaison pour les CDKs et est très proche de deux sites de phosphorylation. Elle a un effet inhibiteur sur la phosphorylation de pRb pour ces sites-là en particulier mais aussi pour des sites plus éloignés (Carr *et al.*, 2011). Enfin, une méthylation par SMYD2 (SET and MYND domain-containing 2) a été recensée dans le domaine RbC. Cette méthylation induit l'apparition d'un domaine de liaison avec une protéine L(3)MBTL1 (Saddic *et al.*, 2010).

Des événements d'ubiquitination et de sumoylations permettent aussi la régulation de pRb. Mdm2, une E3 Ub-ligase, permet à cette ubiquitination d'avoir lieu dans la région C-terminale bien que le résidu ciblé reste à établir. En adressant pRb au protéasome, son activité est inhibée et la progression dans le cycle est favorisée (Uchida *et al.*, 2005). D'autres ubiquitinations ont lieu sur pRb mais restent peu étudiées. SUMO (small ubiquitin-related modifier) est une modification post-traductionnelle réversible. Cette modification est observée dans le domaine B de pRb, au niveau du site d'interaction avec les séquences LxCxE. Elle induit une inhibition de l'interaction avec E2F1, favorisant donc, comme l'ubiquitination, la progression dans le cycle cellulaire (Ledl, Schmidt and Müller, 2005) (Figure 29).

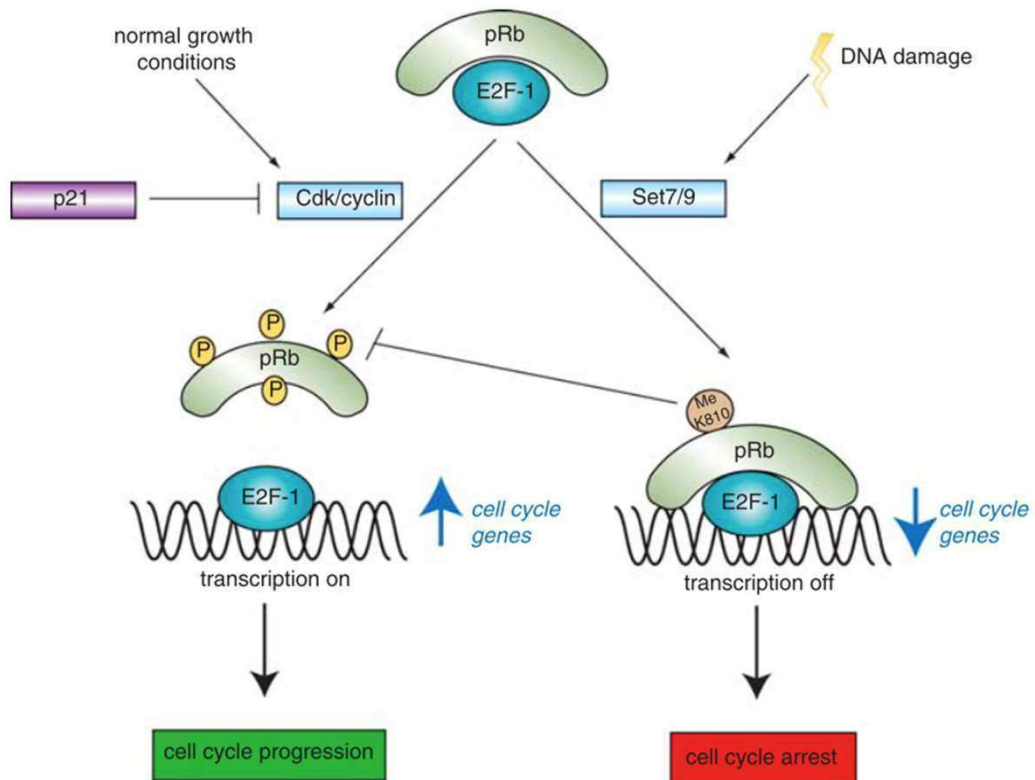


Figure 29. Modèle décrivant la balance entre la méthylation sur la lysine 810 et la phosphorylation.

La phosphorylation de pRb par CDK entraîne un arrêt du cycle cellulaire en facilitant l'expression des gènes cibles de E2F1. En condition de dommages à l'ADN, la méthylation de pRb par Set7/9 maintient pRb en état hypophosphorylé en empêchant à la CDK d'accéder aux sites de phosphorylation. L'inhibition de E2F1 est maintenu et l'expression des gènes permettant la progression dans le cycle cellulaire n'est pas déclenchée.

Issu de : Munro *et al.*, 2012

Pour finir, pRb peut être la cible de caspases qui induiront son clivage au niveau de trois sites spécifiques. Les différents clivages aux sites LEND (267-270), DSID (346-349) et DEAD (883-886) génèrent respectivement les formes pRb^{p76} (Lemaire *et al.*, 2005), pRb^{p68} et pRb^{p48} (An and Dou, 1996), et pRb^{p100} à laquelle il manque les 42 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminal (Jänicke *et al.*, 1996). L'effet de ces clivages est difficile à définir comme nous le verrons dans le chapitre consacré à l'apoptose.

Chez la drosophile, le patron d'expression des gènes *rbf1* et *rbf2* montre qu'il existe une régulation transcriptionnelle tissu-spécifique plus importante pour le second. Alors que *rbf1* reste exprimé relativement uniformément, l'expression de *rbf2* est très forte en début de développement puis elle décroît jusqu'à ne plus être détectable chez l'adulte (Stevaux *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2005). Des travaux sur la régulation de l'expression de *rbf1* ont montré l'implication des complexes Polycomb dans ce phénomène (Oktaba *et al.*, 2008).

Les mécanismes de phosphorylation particulièrement importants pour la régulation du cycle cellulaire sont conservés par rapport aux mammifères (Xin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014). Sept sites de phosphorylation de Rbf1 ont été répertoriés. De même, les événements d'ubiquitination, outre leur implication dans la dégradation de Rbf1 par la voie du protéasome, augmentent l'activité inhibitrice de Rbf1 sur certains gènes tel que *PCNA* (Raj *et al.*, 2012). Au laboratoire, il a par ailleurs été étudié l'effet de l'expression d'une forme mutante de Rbf1 dont la capacité à être clivée en position 273 a été abolie. Ainsi, une mutation du motif équivalent au motif LEND de pRb n'entraîne pas de diminution de sa capacité pro-apoptotique mais conduit à de fortes altérations de l'homéostasie tissulaire (Milet *et al.*, 2014).

D'autres mécanismes ont aussi été décrits bien que semblant beaucoup moins importants que ceux affectant la transcription. pRb peut ainsi être adressé à la mitochondrie dans le cas spécifique de l'apoptose. Elle y active directement Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, responsable de la perméabilisation mitochondriale. Cette action est indépendante de son activité nucléaire (Hilgendorf *et al.*, 2013).

2. Fonctions cellulaires

a. Le cycle cellulaire

Comme vous avez pu le voir en filigrane dans les descriptions des modes d'action et de régulation de pRb, la fonction décrite la plus importante est son rôle dans le cycle cellulaire.

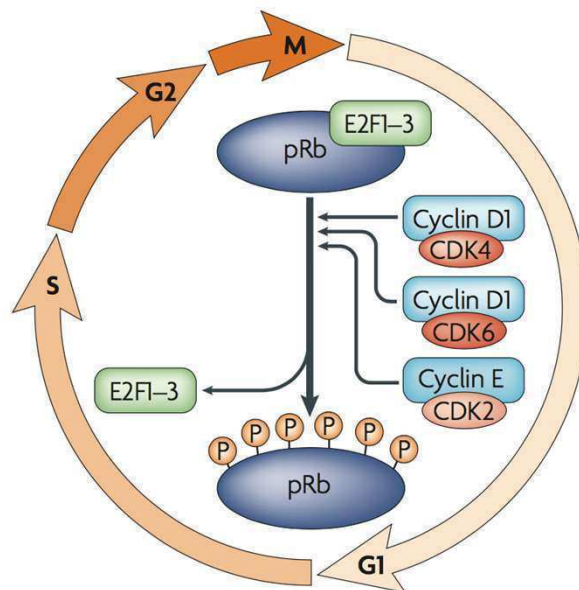


Figure 30. L'implication de pRb dans le cycle cellulaire.

L'entrée dans la phase S est caractérisée par la phosphorylation de pRb par les complexes Cycline D1/CDK4, Cycline D1/CDK6 et Cycline E/CDK2. Cette phosphorylation est associée avec la libération des facteurs de transcription E2F1 à 3, leur permettant d'activer les gènes requis pour la progression dans le cycle cellulaire.

Issu de : Collier, 2007

pRb est retrouvée active dans les cellules en quiescence, au cours de la phase G1 contrôlant ainsi l'entrée en phase S. L'hyper-phosphorylation de la protéine par les couples cycline/CDK inactive pRb et entraîne la transition de la cellule vers la phase S. Les cibles des membres de la famille E2F, principalement inhibées lorsque celle-ci est liée à pRb, sont des gènes impliqués dans la progression dans la phase S du cycle cellulaire. La levée d'inhibition induit donc les évènements nécessaires à cette progression (Figure 30).

Par ailleurs, pRb agit dans la dynamique de dégradation de p27, un inhibiteur des CDKs. En effet, celle-ci est la cible de l'ubiquitine-ligase de type E3, Skp2. pRb est capable de bloquer cette interaction en se liant elle-même avec l'extrémité N-terminale de Skp2. De cette façon, p27 n'est pas ubiquitinée puis dégradée (Ji *et al.*, 2004; Binné *et al.*, 2007). Certaines phosphorylations sont favorables à l'activité de pRb comme celle induite par la SAPK (stress-activated protein kinase) p38, la rendant insensible aux CDKs (Joaquin, de Nadal and Posas, 2017).

Par ailleurs, la mutation de *rb* peut entraîner une altération de la capacité à sortir définitivement du cycle cellulaire au moment de la différenciation cellulaire comme cela a été bien décrit dans l'œil en développement de drosophile. Cette sortie nécessite l'inhibition de *dE2F1* ou *cdk2*, leur double inhibition se potentialisant (Buttitta *et al.*, 2007).

b. La différenciation

pRb est impliquée dans la différenciation de certains tissus : le tissu adipeux, les neurones, le muscle et l'os (Gu *et al.*, 1993; P. L. Chen *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2002). La mutation de *rb* induit des perturbations importantes pour ce processus. L'étude moléculaire de cette activité a permis de mettre en évidence la variété des évènements régulés par pRb ainsi que la spécificité de celle-ci dans chacun de ces tissus. Les voies d'actions de pRb pour induire la différenciation sont très variées et dépendent, bien entendu du type cellulaire considéré (Korenjak and Brehm, 2005). La compréhension de ces voies n'étant pas primordiale pour mon sujet d'étude, je ne ferai qu'évoquer quelques principes qui les articulent dans la majorité des cas. On peut cependant noter que c'est principalement une capacité indépendante de la famille E2F. pRb est alors un co-activateur de facteurs de transcriptions, spécifique de la transformation. Par exemple, elle interagit avec MyoD, facteur majeur de la myogenèse. Ensemble, elles induisent la répression directes ou

indirectes d'un certain nombre de cibles permettant la sortie du cycle cellulaire et la transformation en cellule musculaire (Rajabi, Takahashi and Ewen, 2014).

Chez la drosophile, le rôle inhibiteur de Rbf1 sur dE2F1 est primordial pour expliquer son importance dans la régulation de la prolifération et la différenciation au cours du développement (Du, 2000). Par ailleurs, le disque imaginal d'œil est un très bon modèle pour l'étude de l'implication de *rbf1* dans la différenciation des photorécepteurs. En effet, au cours du 3ème stade larvaire, les cellules du disque imaginal d'œil se différencient en photorécepteurs, cellules faisant partie du système nerveux. Cette différenciation a lieu au cours de la traversée du sillon morphogénétique depuis le côté postérieur du disque imaginal vers le côté antérieur. Avant le passage du sillon, les cellules sont asynchrones et prolifératives. À leur entrée dans le sillon morphogénétique, les cellules se synchronisent en phase G1 du cycle cellulaire. Certaines cellules se différencient en photorécepteurs R8, alors que le reste des cellules entre dans un second cycle de division synchrone (second mitotique wave). Se produit ensuite une différenciation séquentielle des autres photorécepteurs en R2/R5, R3/R4, R1/R6 et enfin R7 (Ready, Hanson and Benzer, 1976). L'intérêt de l'étude du disque imaginal d'œil est qu'elle offre la possibilité d'observer chacun des stades de différenciation.

Dans ce modèle, Rbf1 permet l'expression de Delta, ligand de la voie Notch, permettant la régulation de la différenciation des cellules en photorécepteurs R8 (Steele *et al.*, 2009). De plus, Rbf1, en parallèle et indépendamment de Rno (Rhinoceros), induit l'expression d'intermédiaires clés de la voie de signalisation EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) permettant le bon fonctionnement de la différenciation (Sukhanova *et al.*, 2011). L'activité moléculaire de Rbf1 a même pu être investiguée et on observe alors le rôle prépondérant du complexe dREAM dans la régulation des gènes de la différenciation. Le complexe, en recrutant des modificateurs chromatinien, induit des acétylations et méthylation pouvant éteindre de manière définitive l'expression de gènes du cycle cellulaire (Dimova, 2011; Lee *et al.*, 2012).

c. L'apoptose

Le rôle de pRb est d'avantage controversé en ce qui concerne la régulation de l'apoptose. Les résultats de plusieurs études indiquent que la perte de *rb* induit de l'apoptose. Ces résultats prêteraient donc un rôle anti-apoptotique à pRb. Pour autant, l'étude des

modifications transcriptionnelles induites par pRb montre également qu'elle régule positivement la transcription de gènes pro-apoptotiques. Ces dernières observations correspondent mieux à son rôle de suppresseur de tumeur.

L'effet anti-apoptotique de *rb* a d'abord été étudié chez la souris. Les embryons de souris (*rb*^{-/-}) meurent précocement au cours développement. L'analyse histologique de leurs tissus révèle un excès de prolifération et d'apoptose dans de nombreux types cellulaires comme le système nerveux central ou hématopoïétique (Clarke *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1992). Des analyses plus approfondies montrent que lorsque les annexes embryonnaires sont sauvages et que seul l'embryon est *rb*^{-/-}, l'apoptose est nettement diminuée notamment dans le système nerveux. L'apoptose observée est en partie due à un effet non- autonome cellulaire de pRb (de Bruin *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2007).

Cette apoptose n'est pourtant pas constatée dans tous les tissus comme le cristallin où elle s'accompagne d'excès de prolifération. Une explication a été proposée concernant cette observation : les cellules reçoivent des signaux de différenciation qui sont perturbées par l'activation de la prolifération permise par la levée d'inhibition de E2F. L'intégration conflictuelle de ces signaux divergents entrainerait l'entrée en apoptose des cellules (Chau and Wang, 2003). Cette apoptose est donc une conséquence indirecte de l'incapacité des cellules à arrêter leur cycle cellulaire due à la perte de *rb*. La capacité de pRb à réguler le cycle cellulaire semble aussi être impliquée dans l'apoptose observée dans d'autres tissus tels que les myoblastes. Au cours de la différenciation myogénique l'inactivation de pRb induit de l'apoptose pendant la différenciation mais cela n'a pas d'impact sur la survie des myoblastes une fois leur différenciation achevée (Huh *et al.*, 2004). Dans les poumons, la peau ou l'intestin, d'autres travaux ont montré que la perte de fonction de *rb* induit de la prolifération ectopique mais pas d'apoptose. Au regard de ces différents exemples, il semblerait que l'activité anti-apoptotique de pRb dépende de l'état prolifératif des cellules et de leur niveau de différenciation.

D'autres mécanismes plus directs pourraient aussi être impliqués dans le déclenchement de l'apoptose induite par l'inactivation de pRb. Comme cela a déjà été évoqué, pRb inhibe le facteur de transcription E2F1. Or les facteurs E2F régulent positivement un grand nombre de gènes parmi lesquels des gènes impliqués dans l'apoptose tels que *apaf-1* (Furukawa *et al.*, 2002) ainsi que ceux codant pour des protéines de la famille des BH3-only *puma*, *noxa* et *bim* (Hershko and Ginsberg, 2004) ou les caspases-8,-9,-3 et-7 (Nahle *et al.*,

2002). En accord avec ces observations, l'inactivation d'*apaf-1* permet la suppression du phénotype apoptotique induit par l'absence de *rb* (Guo *et al.*, 2001).

De manière apparemment contradictoire, la protéine pRb peut aussi participer à l'activation du processus apoptotique. Cette propriété est notamment mise en évidence dans des cellules tumorales humaines présentant un gène *rb* non-fonctionnel. Pour celles-ci, l'ajout d'une copie fonctionnelle de *rb* a un effet sensibilisateur sur la mort induite par irradiation (Bowen, Spiegel and Gelmann, 1998). Plus tard, il a pu être révélé que pRb qui est largement décrit comme inhibiteur du facteur de transcription E2F1 peut aussi le lier pour activer la transcription de gènes pro-apoptotique. pRb est capable de lier le facteur de transcription E2F1, non plus pour l'inhiber mais pour activer la transcription de gènes pro-apoptotiques comme ceux codant la caspase-7 ou p73. Cet effet a été observé en condition oncogénique dans différentes lignées tumorales humaines et *in vivo* dans l'épithélium intestinal de souris (Ianari *et al.*, 2009). Ce rôle pro-apoptotique est davantage en accord avec son rôle suppresseur de tumeur.

Des études plus récentes montrent même que pRb peut avoir une action directe à la mitochondrie, permettant le déclenchement de l'apoptose par la voie mitochondriale. Pour cela, la protéine est capable d'aller directement à la mitochondrie (Ferecatu *et al.*, 2009). Elle y interagit physiquement avec Bax pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale ce qui déclenche l'apoptose (Hilgendorf *et al.*, 2013). Cette activité extranucléaire très surprenante vient compléter l'arsenal déjà bien fourni de pRb.

Selon le contexte cellulaire, pRb peut donc avoir une activité anti-apoptotique en réprimant les gènes codant des effecteurs de la cascade apoptotique, mais aussi pro-apoptotique en participant au complexe activant la transcription des gènes pro-apoptotiques.

Chez la drosophile, l'étude du rôle de Rbf1 dans le contrôle de l'apoptose a été réalisée en contexte de perte de fonction pour *rbf1*. Comme l'observation d'embryon de drosophile nous le montre, celle-ci est souvent associée à l'apparition d'apoptose (Du and Dyson, 1999). La génération de clones *rbf1*^{-/-} dans différents tissus montrent une augmentation de l'apoptose au niveau du sillon morphogénétique du disque imaginal d'œil (Moon, Di Stefano and Dyson, 2006; Tanaka-Matakatsu *et al.*, 2009) mais aussi dans les disques imaginaires d'ailes (Moon *et al.*, 2005). Comme chez les mammifères, la perte d'inhibition de dE2F1 permet l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *reaper*, *hid*, *dark* ou encore de la caspase *dcp-1* (Asano, Nevins and Wharton, 1996; Zhou and Steller, 2003; Moon *et al.*, 2005). Cependant,

cette perte d'inhibition n'est pas délétère dans toutes les cellules du disque imaginal d'œil puisque les clones *rbf1*^{-/-} ne présentent de l'apoptose que s'ils sont dans le sillon précisément. La capacité à résister des cellules postérieures au sillon est à mettre sur le compte de la voie EGFR qui est activée une fois que les cellules sont engagées dans la différenciation. Cette voie compense l'induction de *hid* en phosphorylant le produit de ce gène, rendant la protéine inactive (Moon, Di Stefano and Dyson, 2006).

Rbf1 n'est pas la seule protéine à réguler dE2F1. La voie Tor (Target of Rapamycin) est impliquée dans le contrôle de la production de ce facteur de transcription au niveau traductionnel. Dans le disque imaginal d'œil, la perte de fonction de *tor* ou de *rheb* (Ras homolog enriched in brain), activateur de *tor*, conduit à une inhibition de la production de E2F1 alors que la perte de fonction de *tsc1* (tuberous sclerosis complex1, un inhibiteur de Tor) a l'effet opposé. Ainsi, l'apoptose induite par la perte de fonction de *rbf1* est supprimée par la perte de fonction de *rheb* (Hsieh *et al.*, 2010). Ces résultats montrent bien que l'action de *rbf1* s'inscrit dans un ensemble de régulation permettant une intégration des signaux de croissance.

Il a aussi été montré que l'interaction de Rbf1 avec dE2F1 peut aussi mener à l'inhibition de certaines de ses cibles, dont *hid*, dans des types cellulaires spécifiques. C'est le cas pour celles de l'inter-veine du disque imaginal d'aile qui sont stoppées en phase G1 ou G2 du cycle cellulaire (Moon *et al.*, 2005).

Au-delà de son rôle anti-apoptotique, des cas sont décrits dans lesquels Rbf1 se comporte comme un facteur pro-apoptotique (Neufeld *et al.*, 1998). Notre équipe a démontré que la surexpression de *rbf1* dans des cellules en prolifération, comme celles composant le disque imaginal d'aile, avait un effet pro-apoptotique (Milet *et al.*, 2010). Comme chez les mammifères, cet effet est bien plus en accord avec son rôle de suppresseur de tumeur.

D. Situation du sujet

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, le gène *rb* joue un rôle important dans le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Que ce soit dans le cycle cellulaire ou dans la différenciation, le rôle de pRb est très bien décrit. Son rôle dans l'apoptose, est bien établi mais beaucoup moins bien compris. Alors qu'il était plutôt décrit comme un gène anti-apoptotique de prime abord, ce rôle a été depuis, remis en question.

Cette première conclusion était basée sur l'observation d'un taux d'apoptose élevé dans les tissus ou cellules en culture pour lesquelles *rb* était inactivé. Cependant, il est probable que ce soit la dérégulation de processus importants pour la survie cellulaire qui soit à l'origine du déclenchement indirect de la mort cellulaire. De plus, l'apoptose observée à la suite de l'inactivation de *rb* est, au moins en partie, due à un effet non- autonome cellulaire. Des travaux postérieurs prêtent à pRb une activité pro-apoptotique, plus en accord avec son rôle de suppresseur de tumeur. Cette activité nécessite cependant d'être mieux caractérisée car, dans le contrôle de l'apoptose, les gènes que cible pRb en tant que facteur de transcription, ainsi que ses partenaires, sont peu connus. Les évènements moléculaires et cellulaires de la voie de signalisation aboutissant à la mort cellulaire sont aussi à définir distinctement.

Pour répondre à cette problématique, le groupe « Apoptose chez la drosophile » du LGBC que j'ai rejoint au début de ma thèse, s'intéresse depuis plusieurs années à l'activité de Rbf1, homologue de pRb chez *Drosophila melanogaster*, sur l'homéostasie tissulaire et l'apoptose. Sous la direction d'Isabelle Guénal, cette équipe a pu mettre en évidence qu'au cours du développement, Rbf1 pouvait avoir un rôle différent vis-à-vis de l'apoptose en fonction du contexte cellulaire. En utilisant un modèle permettant la surexpression tissu-spécifique de Rbf1, le laboratoire a pu mettre en évidence que cette protéine a un effet pro-apoptotique dans les cellules en prolifération constituant en grande partie le disque imaginal d'aile, alors qu'elle protège de l'apoptose dans les cellules différenciées du disque imaginal d'œil (Milet *et al.*, 2010). Cette ambivalence observée chez la drosophile souligne la complexité des processus dépendants de pRb et de ses homologues concernant la mort cellulaire.

Centrant ses recherches sur l'étude de l'activité pro-apoptotique de Rbf1, l'équipe a pu détailler un certain nombre des évènements moléculaires impliqués dans ce processus. D'une part, cette apoptose dépend bien des caspases puisqu'elle est supprimée par l'expression ectopique de leur inhibiteur p35. L'activation des caspases est, quant à elle, induite par les RHG *via* l'inhibition de DIAP1. Cette activation des RHG est induite par la voie JNK, elle-même déclenchée par des évènements mitochondriaux incluant de la fission et l'accumulation d'EAO (Clavier *et al.*, 2015, 2016).

L'équipe a montré que cette apoptose était médiée d'une part par l'activation transcriptionnelle du gène *how* et d'autre part par la répression de la transcription de *buffy*, le seul membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Clavier *et al.*, 2014). La protéine How, quant à

elle, régule l'apoptose indirectement puisqu'elle agit en déstabilisant l'ARNm de l'inhibiteur de caspase *diap1*. (Clavier *et al.*, 2014). La régulation transcriptionnelle de ces deux gènes est assurée par le complexe dREAM.

Mon travail de thèse s'articule en deux volets : d'une part, la caractérisation des événements mitochondriaux ayant lieu au cours de l'apoptose induite par Rbf1 dans les cellules en prolifération (Clavier, Ruby *et al.*, 2015) ; d'autre part, l'étude du lien entre l'apoptose induite par Rbf1 et l'appareil traductionnel notamment constitué de la PABP (Poly-Adenylate Binding Protein), travail débuté par Angéline Moriéras que j'ai complété afin d'aboutir à une publication.

Résultats

A. Évènements mitochondriaux impliqués dans l'apoptose induite par Rbf1

1. Contexte scientifique

Comme présenté en introduction, la protéine de mammifère pRb possède des activités en lien avec l'apoptose. Cependant, les évènements cellulaires et moléculaires permettant cette activité sont encore mal compris et pourraient être mieux identifiés. Des études menées au laboratoire ont montré que Rbf1, homologue de drosophile de pRb, possède aussi une activité apoptotique dépendante de l'état prolifératif des cellules au cours du développement. Elle est notamment pro-apoptotique dans les cellules prolifératives du disque imaginal d'aile (Milet *et al.*, 2010). En tant que co-facteur de transcription, Rbf1 régule l'activité des membres de la famille E2F, représentés chez la drosophile par dE2F1 et dE2F2 qui possèdent eux-mêmes des fonctions pouvant être apoptotiques (Moon *et al.*, 2005).

Afin de déterminer les intermédiaires nécessaires à Rbf1 pour induire l'apoptose, ses cibles transcriptionnelles ont été recherchées. Les travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence une régulation négative indirecte de *dIAP1* induite par Rbf1 et dépendante de dE2F2. Rbf1 et E2f2 sont aussi capables d'inhiber l'expression de *buffy*, un gène codant pour une protéine membre de la famille Bcl-2 (Clavier *et al.*, 2014). La protéine Buffy, a généralement une activité anti-apoptotique. Elle inhibe l'apoptose induite par les RHG mais aussi celle induite par l'autre membre de la famille Bcl-2 chez la drosophile, Debcl. Elles seraient d'ailleurs capables d'interagir directement et Debcl est localisée à la mitochondrie tandis que Buffy est localisée au RE (Brachmann *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2003).

La mise en évidence de l'implication d'une protéine capable de se localiser à la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 a poussé notre équipe à rechercher quel pouvait être le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1. En effet, cet organe n'est pas aussi central dans le processus apoptotique chez la drosophile en comparaison aux mammifères, le relargage du cytochrome c n'étant pas nécessaire à l'apoptose intrinsèque (Dorstyn *et al.*, 2002; Abdelwahid *et al.*, 2007). Cette particularité a largement remis en cause la place de la mitochondrie dans l'apoptose de la drosophile. Pourtant il existe bien des liens entre apoptose et mitochondrie chez la drosophile. Par exemple, le pro-apoptotique de la

famille RHG, *rpr* et la protéine de mammifère *bax* sont capables d'affecter la mitochondrie pour déclencher l'apoptose chez la drosophile (Brun *et al.*, 2002).

Dans le but de déterminer si des événements mitochondriaux étaient mis en jeu dans la voie d'induction de l'apoptose par Rbf1, des tests d'interaction génétiques ont été menés sur *debcl*, autre gène de la famille Bcl2 présent chez la drosophile, puis des gènes connus pour leur interaction avec *buffy* et *debcl*.

Une première partie de mon travail présenté ici est la mise en évidence du rôle de Debcl dans le recrutement de Drp1, une protéine responsable de la fission mitochondriale, au cours de l'apoptose induite par Rbf1. Ces éléments ont permis de mettre en évidence le rôle central de la dynamique mitochondriale sur l'apoptose induite par Rbf1. Ils sont présentés dans un article publié en 2015 dans « *Journal of Cell Science* ».

La deuxième partie des travaux présentés dans cette section concerne la poursuite de cette étude et fait l'objet de résultats complémentaires non publiés. Nous nous sommes intéressés à d'autres protéines partenaires potentielles pouvant établir des liens entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose induite par Rbf1. Ces travaux ont permis la mise en évidence du rôle de MARF, non pas comme acteur important dans la fission mitochondriale, mais plus probablement, suite à sa phosphorylation par PINK1, comme facteur nécessaire au recrutement de Parkin. Comme décrit plus haut, ces protéines sont connues pour leur implication dans la mitophagie.

2. Rb1 induit une apoptose mitochondriale dépendante de Debcl et Drp1

a. Résumé

Des études menées au laboratoire ont montré que Rbf1, homologue de drosophile de pRb, possède une activité apoptotique dépendante de l'état prolifératif des cellules au cours du développement. La surexpression de *rbf1* est notamment pro-apoptotique dans les cellules prolifératives du disque imaginal d'aile (Milet *et al.*, 2010). Rbf1, en tant que co-facteur de transcription de dE2F2, régule la transcription spécifique de gènes tels que *buffy* et *how* (Clavier *et al.*, 2014). Il s'agit d'une répression dans le cas de *buffy*, membre de la famille Bcl-2 connu pour son activité principalement anti-apoptotique (Quinn *et al.*, 2003). L'activité de Buffy est souvent associée à celle de Debcl, l'autre seul membre de la famille Bcl-2 présent chez la drosophile, principalement pro-apoptotique (Colussi *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Doumanis, Dorstyn and Kumar, 2007). Bien que les deux protéines soient souvent antagonistes et décrites comme étant localisées à la mitochondrie (en partie pour Buffy), les bases moléculaires de leur activité restent encore à explorer.

Rbf1 inhibant l'expression de *buffy*, nous avons dans un premier temps cherché à savoir si son partenaire privilégié de la protéine qu'il code, Debcl, était aussi impliqué. Des tests d'interaction génétique nous ont permis de mettre en évidence que Debcl est requis, en aval de Buffy. La protéine Debcl étant une protéine de la famille Bcl2 localisée principalement à la mitochondrie suggère que cet organite pourrait avoir un rôle dans la voie d'apoptose induite par la surexpression de *rbf1* dans les cellules prolifératives.

L'apoptose chez la drosophile est très souvent associée à des événements de fragmentation mitochondriale (Frank *et al.*, 2001; Abdelwahid *et al.*, 2007). A l'aide d'un marqueur permettant l'observation des mitochondries par fluorescence, nous avons pu mettre en évidence qu'une fragmentation mitochondriale a bien lieu au cours de l'apoptose induite par Rbf1. Cette fragmentation est dépendante de Debcl et implique Drp1 qui est l'effecteur principale de la fission mitochondriale chez la drosophile. Il s'agit d'une GTPase cytosolique apparentée aux dynamines ayant la capacité, lorsqu'elle est recrutée à la membrane externe mitochondriale, de s'oligomériser. L'oligomérisation de la protéine force alors une courbure et une constriction des membranes mitochondriales conduisant à la division de l'organite. Nous avons pu montrer que Drp1 est requis pour l'apoptose induite par

Rbf1. Des données obtenues par fractionnement cellulaire révèlent que la protéine est recrutée à la mitochondrie de manière dépendante à Debcl en cas de surexpression de Rbf1. De plus, nous avons observé que ce recrutement est associé à une interaction physique entre Debcl et Drp1 qui est inhibée par Buffy.

Cette étude est complétée par l'observation d'une augmentation de la production d'espèces activées de l'oxygène au niveau de la mitochondrie en réponse à la surexpression de *rbf1*. Cette augmentation est dépendante de Debcl et Drp1 et est nécessaire à l'activation de la voie JNK, intermédiaire indispensable au déclenchement de l'apoptose.

Les données que je viens de décrire sont détaillées dans un article publié par « Journal of Cell Science » en 2015. Elles mettent en évidence le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 et continue de d'expliquer l'activité moléculaire du couple Buffy/Debcl dans la régulation de l'apoptose.

b. Article

RESEARCH ARTICLE

The *Drosophila* retinoblastoma protein, Rbf1, induces a *Debcl*- and *Drp1*-dependent mitochondrial apoptosis

Amandine Clavier^{1,2}, Vincent Ruby¹, Aurore Rincheval-Arnold¹, Bernard Mignotte^{1,2} and Isabelle Guénaï^{1,*}

ABSTRACT

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

KEY WORDS: Apoptosis, Mitochondrial dynamics, *Debcl*, *Rbf1*, *Drp1*

INTRODUCTION

The retinoblastoma susceptibility gene (*Rb*) is a tumor suppressor gene mutated in a large variety of cancer (Di Fiore et al., 2013). Its tumor suppressive activity is at least partially dependent on its ability to induce cell cycle arrest. However, the role of pRb in cancer is not limited to cell cycle regulation and appears to be more complex. Indeed, pRb can be pro-apoptotic (Bowen et al., 1998; Hilgendorf et al., 2013; Ianari et al., 2009) or anti-apoptotic (Biasoli et al., 2013; Morgenbesser et al., 1994; Tsai et al., 1998), and the regulation of these opposite roles of pRb towards apoptosis remains poorly understood. The ability of pRb to induce apoptosis fits with its tumor suppressor function. Deciphering the molecular mechanisms involved in pRb pro-apoptotic activity could provide important clues for a better understanding of pRb roles in cancer suppression. *Drosophila* allows us to characterize *in vivo* the properties of *Rbf1*, the *Rb* homologue, in the control of apoptosis. As with pRb, *Rbf1* can be either pro- or anti-apoptotic depending on the cellular context. For instance, *Rbf1* overexpression leads to apoptosis in proliferating cells but not in post-mitotic cells (Milet

et al., 2010). Moreover, we have recently shown that *Rbf1* induces cell death by reducing the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family gene *Buffy* (Clavier et al., 2014) which encodes a mitochondrial protein, suggesting the existence of a mitochondrial death pathway in *Rbf1*-induced apoptosis.

Mitochondria have a pivotal role in apoptosis regulation in vertebrates (Estaquier et al., 2012; Green et al., 2014; Tait and Green, 2013). Intermembrane space proteins, such as cytochrome *c*, are released in the cytosol to promote caspase activation. This process requires mitochondrial outer membrane permeabilization, which is tightly regulated by Bcl-2 family proteins (García-Sáez, 2012; Hardwick and Soane, 2013). In *Drosophila*, this family contains only two members: *Buffy* (Quinn et al., 2003) and *Death executioner Bcl-2 homologue (Debcl)* (Brachmann et al., 2000; Colussi et al., 2000; Igaki et al., 2000; Zhang et al., 2000). Although *Debcl* is not required for most of developmental cell death, it is necessary for apoptosis in specific contexts, such as pruning cells and embryonic cell death (Galindo et al., 2009; Senoo-Matsuda et al., 2005) or DNA-damage-induced apoptosis (Sevrioukov et al., 2007). Moreover, ectopic expression of *Debcl* induces apoptosis (Brachmann et al., 2000; Colussi et al., 2000; Igaki et al., 2000; Zhang et al., 2000). Thus, the mitochondrial protein *Debcl* displays a pro-apoptotic activity in flies. Buffy can act as an anti-apoptotic protein by physically interacting with *Debcl* to suppress *Debcl*-induced cell death (Quinn et al., 2003), whereas *Debcl* is required to inhibit *Buffy* in DNA-damage-induced apoptosis (Sevrioukov et al., 2007). Nevertheless, the mode of action of the *Drosophila* Bcl-2 proteins remains elusive.

Although early studies did not emphasize a crucial role of mitochondria during apoptosis in fly (Dorstyn et al., 2004; Means et al., 2006; Zimmermann et al., 2002), more recent data show that this organelle has a more substantial role. First, key players of *Drosophila* apoptosis are localized to mitochondria, including the caspases *Dronc* and *Drice* (Dorstyn et al., 2002) or the pro-apoptotic proteins *Reaper* (Freel et al., 2008; Olson et al., 2003; Thomenius et al., 2011), *Hid* (Abdelwahid et al., 2007; Morishita et al., 2013) and *Grim* (Claveria et al., 2002). For some of these proteins, the loss of mitochondrial localization is associated with a reduction of the pro-apoptotic function (Abdelwahid et al., 2007; Freel et al., 2008; Olson et al., 2003; Sandu et al., 2010). Second, caspases can be activated *in vitro* by mitochondria from apoptotic S2 cells (Varkey et al., 1999), suggesting that some mitochondrial proteins are required for apoptosis. Such proteins include *Omi* (also known as *HtrA2*) (Challa et al., 2007) and the *Drosophila* translocator protein (*TSPO*) (Lin et al., 2014), which are involved in irradiation-induced apoptosis, and cytochrome *c* and *d*, which are necessary for developmental cell death in the eye (Mendes et al., 2006).

Interestingly, an increase in mitochondrial fragmentation can be observed during apoptosis in *Drosophila*. Dynamin-related protein 1 (*Drp1*), a large GTPase of the dynamin family, is required for mitochondrial fission, whereas the homologue of mitofusin 2,

¹Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-le-Bretonneux 78180, France. ²Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-le-Bretonneux 78180, France.

*Author for correspondence (isabelle.guenaï@uvsq.fr)

Mitochondrial assembly regulatory factor (Marf) and Optic atrophy 1 (Opa1) are respectively required for outer and inner mitochondrial membrane fusion. Knockdown of *Drp1* using genetic mutants or RNA interference (RNAi) leads to apoptosis inhibition (Abdelwahid et al., 2007; Goyal et al., 2007), highlighting the role of mitochondrial dynamics in fly cell death. Interestingly, recent data indicate that Reaper induces mitochondrial fragmentation by binding and inhibiting the pro-fusion protein Marf. This decrease in mitochondrial fusion allows caspase activation and eventually apoptosis (Thomenius et al., 2011). However, the precise mechanisms involved in the *Drosophila* mitochondrial cell death pathway remain to be uncovered. For example, a potential link between Bcl-2 family proteins and mitochondrial fission remains to be elucidated.

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

RESULTS

Debcl is required downstream of *Buffy* for Rbf1-induced apoptosis

We have previously shown that the Bcl-2 anti-apoptotic gene *Buffy* counteracts Rbf1-induced apoptosis (Clavier et al., 2014). To determine whether *Debcl*, the second Bcl-2 gene in *Drosophila*, is involved in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. As previously shown, *Rbf1* overexpression at the dorso-ventral frontier of wing imaginal discs using the UAS-Gal4 system with the *vestigial* (*vg*) Gal4 driver induced notches along the

wing margin. The number of notches correlates with the amount of apoptosis in wing imaginal discs of third-instar larvae (Milet et al., 2010). Wing phenotypes were classified into four categories according to the number of notches: wild type (no notch), weak, intermediate and strong (Fig. 1A). When *Rbf1* was overexpressed in a heterozygous background for the loss-of-function mutant *Debcl^{E26}*, a significant shift of the distribution toward weaker phenotypes was observed as compared to overexpression of *Rbf1* only (Fig. 1B), showing that *Debcl* participates in the notched wing phenotype induced by Rbf1. TUNEL staining quantification of third-instar larval wing imaginal discs confirmed that the shift of phenotypic distribution was related to variation in the amount of apoptosis in larvae. Indeed, many cells were TUNEL-labeled in *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/+* wing discs but we observed a significant decrease in the TUNEL-labeled cell percentage when *Rbf1* was overexpressed in a *Debcl^{E26}* background (Fig. 1C). These results indicate that *Debcl* has a pivotal role in Rbf1-induced apoptosis.

Because Rbf1 transcriptionally represses *Buffy*, we hypothesized that *Buffy* inhibition might indirectly activate *Debcl* in Rbf1-induced apoptosis. To determine the epistatic relationship between *Buffy* and *Debcl* in Rbf1-induced apoptosis, we performed genetic interaction tests. When *Rbf1* was overexpressed in a *Buffy^{H37}* loss of function heterozygous background, distribution of the phenotypes significantly shifted toward stronger phenotypes as compared to expression of *Rbf1* alone (Fig. 1B). Interestingly, in a *Debcl^{E26}* heterozygous background, *Buffy^{H37}* loss of function could not anymore induce a phenotypic aggravation (*vg-gal4/Debcl^{E26}; UAS-Rbf1/+* compared with *vg-gal4/Debcl^{E26} Buffy^{H37}; UAS-Rbf1/+*; Wilcoxon test, $n=343$, $\alpha=1.6 \times 10^{-3}$, $W_s=3.2$). Thus, *Buffy* needs *Debcl* to counteract Rbf1-induced loss of tissue. Similar results were obtained in *Debcl^{E26}* and *Buffy^{H37}* homozygous backgrounds (supplementary material Fig. S1). Consistent with these results, the number of apoptotic cells was not significantly different

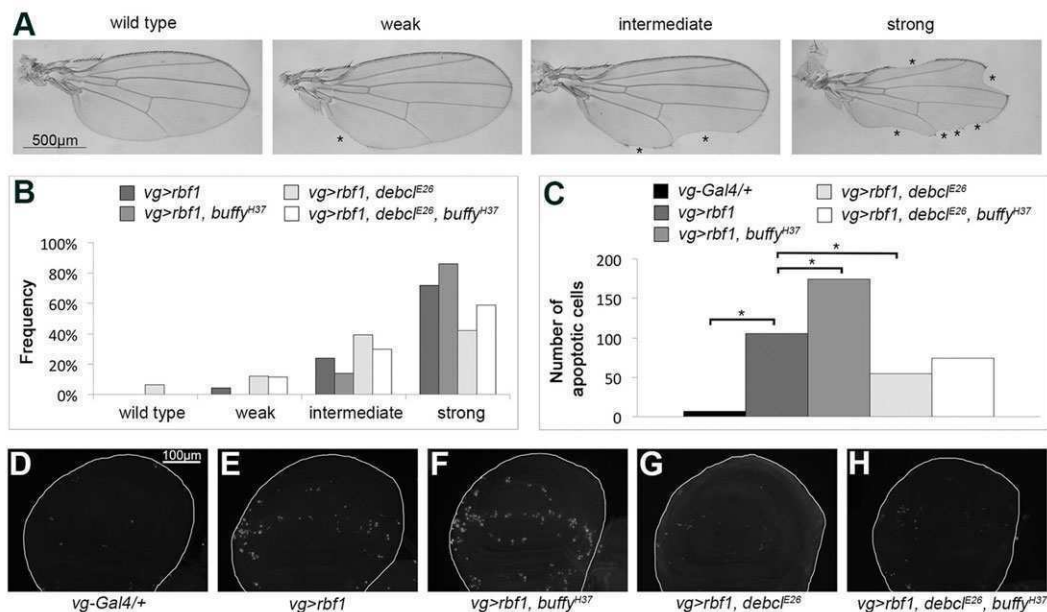


Fig. 1. Rbf1-induced *Debcl*-dependent apoptosis. (A) Fly wings are classified into four categories (wild-type, weak, intermediate and strong) according to the number of notches observed on their margin (asterisks) (Clavier et al., 2014). (B) Distribution of notch wing phenotypes in (1) *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/+*; (2) *vg-Gal4/ Buffy^{H37}; UAS-Rbf1/+*; (3) *vg-Gal4/Debcl^{E26}; UAS-Rbf1/+* and (4) *vg-Gal4/ Buffy^{H37}; Debcl^{E26}; UAS-Rbf1/+*. Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests: *Debcl^{E26}*, $n=305$, $\alpha=4.25 \times 10^{-8}$, $W_s=-5.56$; *Buffy^{H37}*, $n=349$, $\alpha=6.53 \times 10^{-4}$, $W_s=3.40$; *Debcl^{E26}; Buffy^{H37}*, $n=364$, $\alpha=4.63 \times 10^{-3}$, $W_s=-2.82$. Each experiment was independently performed three times. A representative experiment is shown. (C) Quantification of apoptotic cells in the wing imaginal discs pouch visualized by TUNEL staining from the genotypes described previously. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $\alpha < 0.05$). (D–H) Apoptotic cells were visualized by TUNEL staining (white dots) of wing imaginal discs of the genotype indicated at the bottom of the image.

between these two genetic backgrounds (Fig. 1C–H). Therefore, *Debc1* is required downstream of *Buffy* in Rbf1-induced apoptosis.

Rbf1 overexpression triggers mitochondrial ROS production in a *Debc1*-dependent manner

We have previously shown that the JNK pathway activation is required to trigger apoptosis in response to *Rbf1* overexpression (Milet et al., 2014). To determine the importance of *Debc1* in the JNK pathway activation, we quantified the mRNAs of two target genes of the JNK signaling pathway, *mmp1* and *puc*, by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). When *Rbf1* was overexpressed under *vg* control, both *mmp1* and *puc* mRNA levels were significantly increased as compared with the *vg-Gal4/+* control (Fig. 2A). Consistent with this, when *Rbf1* was overexpressed with *RNAi-hep* in order to decrease *hep* expression, the amount of *mmp1* and *puc* mRNAs was similar to the amount observed for the *vg-Gal4/+* control. These data confirm that Rbf1 induces JNK pathway activation. When *Rbf1* was overexpressed in a *Debc1^{E26}* heterozygous background (Fig. 2A), *puc* and *mmp1* mRNA levels decreased compared to overexpression of *Rbf1* in a wild-type background. An immunostaining against Mmp1 in these different genetic backgrounds confirmed these data (supplementary material Fig. S2A–D). Thus *Debc1* is required for Rbf1-induced JNK pathway activation in wing imaginal discs.

The JNK pathway can be activated by a wide variety of stimuli, such as receptor–ligand interactions or cellular stresses. In particular, ROS have been reported to activate the JNK pathway (Son et al., 2013). Interestingly, *Debc1* is localized in mitochondria, which are known to be the major site of ROS production in cells. Therefore, we asked whether *Rbf1* overexpression induces mitochondrial ROS production, which could be responsible for JNK pathway activation. We measured mitochondrial superoxide

production with MitoSOX fluorescence by flow cytometry. *Rbf1* overexpression increased the percentage of MitoSOX-positive cells as compared to the *vg-gal4/+* control (Fig. 2B). Superoxide dismutase 2 (*Sod2*) is a mitochondrial antioxidant enzyme which detoxifies superoxide. Consistent with this, when *Rbf1* and *Sod2* were co-overexpressed, the percentage of MitoSOX-positive cells decreased when compared to overexpression of *Rbf1* alone. We also observed a significant decrease in MitoSOX-positive cells when *Rbf1* was overexpressed in a *Debc1^{E26}* heterozygous background, thus indicating that *Debc1* is required for Rbf1-induced ROS production. Then, we assessed *GstD1* expression, which is a marker of mitochondrial oxidative stress, in these different genetic backgrounds. An increase in *GstD1* mRNA levels was observed when *Rbf1* was overexpressed in a wild-type background (supplementary material Fig. S2E). By contrast, *Rbf1* overexpression in a *Debc1^{E26}* heterozygous background did not affect the level of *GstD1* mRNA when compared to the control (supplementary material Fig. S2E). All these data confirm that Rbf1 triggers ROS production in a *Debc1*-dependent manner. In order to precisely identify the implication of ROS in Rbf1-induced apoptosis, we studied the impact of modifying ROS levels on the adult phenotypes observed in a context of *Rbf1* expression. We used a *Sod2^{Δ02}* loss-of-function mutant and flies overexpressing *Sod2*. When *Rbf1* was overexpressed in a *Sod2^{Δ02}* heterozygous background, the distribution of the wing phenotypes shifted towards stronger phenotypes as compared to overexpression of *Rbf1* alone (Fig. 2C). Conversely, when *Rbf1* and *Sod2* were co-overexpressed, the distribution of wings shifted towards weaker phenotypes. The variation of the phenotypic distribution between these different genetic backgrounds correlated with the variation of apoptotic cell numbers in wing imaginal discs (Fig. 2D). Thus, *Sod2* limits Rbf1-induced apoptosis, which suggests that ROS mediate this cell death.

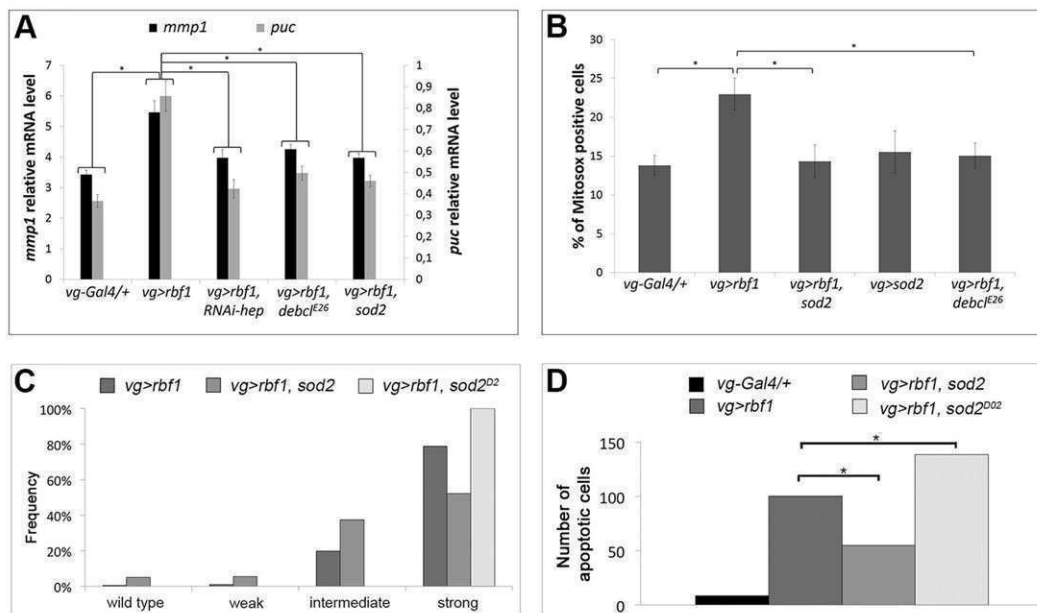


Fig. 2. Rbf1 triggers ROS-dependent JNK activation and apoptosis. (A) Quantification of *mmp1* and *puc* mRNA levels by qRT-PCR on wing imaginal discs from (1) *vg-Gal4/+*, (2) *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/+*, (3) *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/UAS-RNAi-hep*, (4) *vg-Gal4/Debc1^{E26}; UAS-Rbf1/+* and (5) *vg-Gal4/UAS-Sod2; UAS-Rbf1/+* larvae. (B) Quantification by flow cytometry of MitoSOX staining (a mitochondrial superoxide indicator) in wing imaginal discs from (1) *en-Gal4/+*; (2) *en-Gal4/+; UAS-Rbf1/+*; (3) *en-Gal4/UAS-Sod2; UAS-Rbf1/+*; (4) *en-Gal4/UAS-Sod2* and (5) *en-Gal4/Debc1^{E26}; UAS-Rbf1/+* larvae. (C) Distribution of notched wing phenotypes in (1) *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/+*, (2) *vg-Gal4/UAS-Sod2; UAS-Rbf1/+* and (3) *vg-Gal4/Sod2^{Δ02}; UAS-Rbf1/+*. Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests: *Sod2*, $n=423$, $\alpha=3.37 \times 10^{-9}$, $W_s=-6.03$; *Sod2^{Δ02}*, $n=269$, $\alpha=5.3 \times 10^{-4}$, $W_s=3.46$. Each experiment was independently performed three times. A representative experiment is shown. (D) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining in wing imaginal discs from the previously described genotypes. Error bars are the s.e.m. Asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $\alpha < 0.05$).

We then wondered whether ROS are involved in JNK pathway activation, which could explain their role in Rbf1-induced cell death. When *Rbf1* and *Sod2* were co-overexpressed, Mmp1 protein (supplementary material Fig. S2D) and mRNA levels (Fig. 2A) decreased when compared to overexpression of *Rbf1* alone. Hence, *Sod2* inhibits Rbf1-induced JNK pathway activation, which suggests that ROS are required to activate this signaling pathway. Taken together, these data show that *Rbf1* overexpression induces a *Debc1*-dependent mitochondrial ROS production, thereby leading to JNK pathway activation and finally to cell death.

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

Mitochondrial fission, which can occur during apoptosis in mammals and *Drosophila* cells (Desagher and Martinou, 2000; Goyal et al., 2007), can regulate ROS generation (Park et al., 2013; Qi et al., 2013). Interestingly, apoptosis can be blocked with a dominant-negative mutation or specific RNAi-mediated knockdown of the pro-fission gene *Drp1* (Abdelwahid et al., 2007; Arnoult et al., 2005; Breckenridge et al., 2003; Frank et al., 2001). Several studies have highlighted the role of Bcl-2 family proteins in the control of mitochondrial dynamics during apoptosis in mammalian cells (Brooks et al., 2007; Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2004, 2002; Rolland and Conradt, 2010; Sheridan et al., 2008; Wasiak et al., 2007). Therefore, we assessed the impact

of *Rbf1* overexpression on mitochondrial dynamics. To visualize the mitochondrial network, we used a Streptavidin Alexa Fluor[®] 488 conjugate. As expected, *vg-Gal4/+* control disc cells had a typical filamentous mitochondrial network (Fig. 3A), whereas we observed punctuate units in response to *Rbf1* overexpression (Fig. 3B). This punctiform staining is a hallmark of mitochondrial fragmentation. Of note, when *Rbf1* was overexpressed in a *Drp1^{KG03815}* heterozygous loss-of-function background (Fig. 3D), the mitochondrial network appeared more filamentous than when *Rbf1* was overexpressed alone. These data suggest that Rbf1-induced mitochondrial fragmentation is due to an increase in mitochondrial fission that involves Drp1. Interestingly, we also observed a rescue of this fragmentation when *Rbf1* was overexpressed in a *Debc1^{E26}* heterozygous background (Fig. 3E) or when *Rbf1* and *Buffy* were co-overexpressed (Fig. 3F). Thus, *Debc1* is required for Rbf1-induced mitochondrial fission, whereas *Buffy* prevents this fragmentation.

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

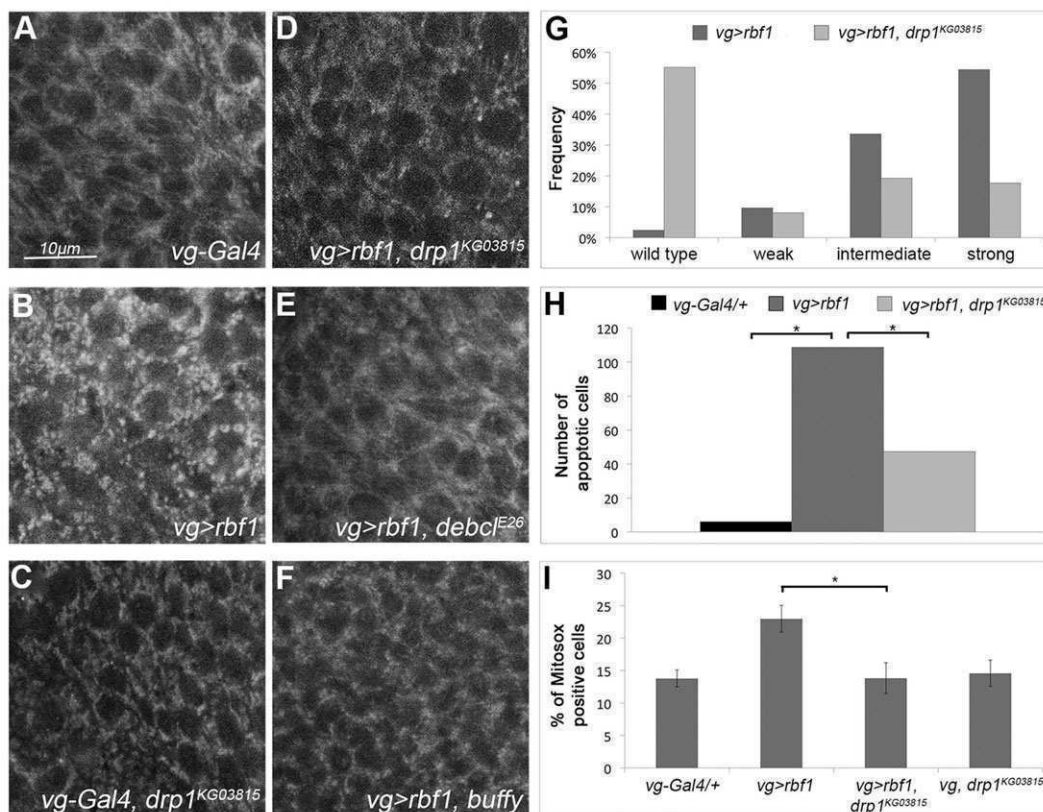


Fig. 3. Rbf1-induced apoptosis requires Drp1-mediated mitochondrial fission. (A–F) Mitochondrial morphology was observed by Alexa-Fluor-488-coupled streptavidin in wing imaginal discs from *vg-Gal4/+* (A); *vg-Gal4/+;UAS-Rbf1/+* (B); *vg-Gal4/Drp1^{KG03815}* (C); *vg-Gal4/Drp1^{KG03815};UAS-Rbf1/+* (D); *vg-Gal4/Debc1^{E26};UAS-Rbf1/+* (E); and *vg-Gal4/UAS-Buffy;UAS-Rbf1/+* (F) larvae. Scale bar: 10 μ m. (G) Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4/+;UAS-Rbf1/+* and *vg-Gal4/Drp1^{KG03815};UAS-Rbf1/+*. $n=312$, $\alpha<10^{-30}$ and $W_s=-9.52$. Each experiment was independently performed three times. A representative experiment is shown. (H) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining of wing imaginal discs from (1) *vg-Gal4/+*; (2) *vg-Gal4/+;UAS-Rbf1/+* and (3) *vg-Gal4/Drp1^{KG03815};UAS-Rbf1/+* flies. (I) Quantification by flow cytometry of MitoSOx staining (a mitochondrial superoxide indicator) in wing imaginal discs from *vg-Gal4/+*; *vg-Gal4/+;UAS-Rbf1/+*; *vg-Gal4/Drp1^{KG03815};UAS-Rbf1/+* and *vg-Gal4/Drp1^{KG03815}* larvae. Error bars are the s.e.m. Asterisks indicate a significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $\alpha<0.05$).

In addition, we observed a significant decrease in the proportion of Mitosox-positive cells when *Rbfl* was overexpressed in a *Drp1^{KG03815}* heterozygous background (Fig. 3I) compared to overexpression of *Rbfl* alone, indicating that Drp1 is required for Rbfl-induced ROS production. Furthermore, we verified that *Drp1* loss of function decreased Rbfl-induced JNK pathway activation (supplementary material Fig. S3). Taken together, these results show that *Rbfl* overexpression induces a *Debc1*- and *Drp1*-dependent mitochondrial fragmentation that promotes ROS production, JNK pathway activation and eventually cell death.

Debc1 induces mitochondrial fragmentation to trigger ROS production and cell death

Our data indicate that *Debc1* plays a key role in *Rbfl*-induced apoptosis. We assessed whether the cascade of events (mitochondrial fragmentation, ROS production and JNK pathway activation) characterized in *Rbfl*-induced apoptosis occurs in a similar fashion in *Debc1*-induced apoptosis. Indeed, *Debc1* has been

previously described as a pro-apoptotic protein. For instance, overexpression of *Debc1* using the UAS-Gal4 system with the *patched-Gal4* (*ptc-Gal4*) driver induces apoptosis along the antero-posterior frontier (Colin et al., 2014). To determine whether *Debc1*-induced apoptosis is associated with an altered mitochondrial network, we used a Streptavidin Alexa Fluor[®] 488 conjugate.

In *ptc-Gal4/+* control discs, the mitochondrial network was filamentous, whereas punctuated staining appeared in response to *Debc1* overexpression (Fig. 4A,B). Thus, *Debc1*, as *Rbfl* does, induces a mitochondrial fragmentation in wing discs. When *Debc1* was overexpressed in a loss-of-function *Drp1^{KG03815}* heterozygous background (Fig. 4C), the mitochondrial network appeared more filamentous than when *Debc1* was overexpressed in a wild-type background. These data suggest that *Debc1*-induced mitochondrial fragmentation results from an increase in mitochondrial fission.

We performed genetic interaction tests between *Debc1* and *Drp1^{KG03815}* loss of function to determine the implication of mitochondrial fission in *Debc1*-induced apoptosis. In the adult wing,

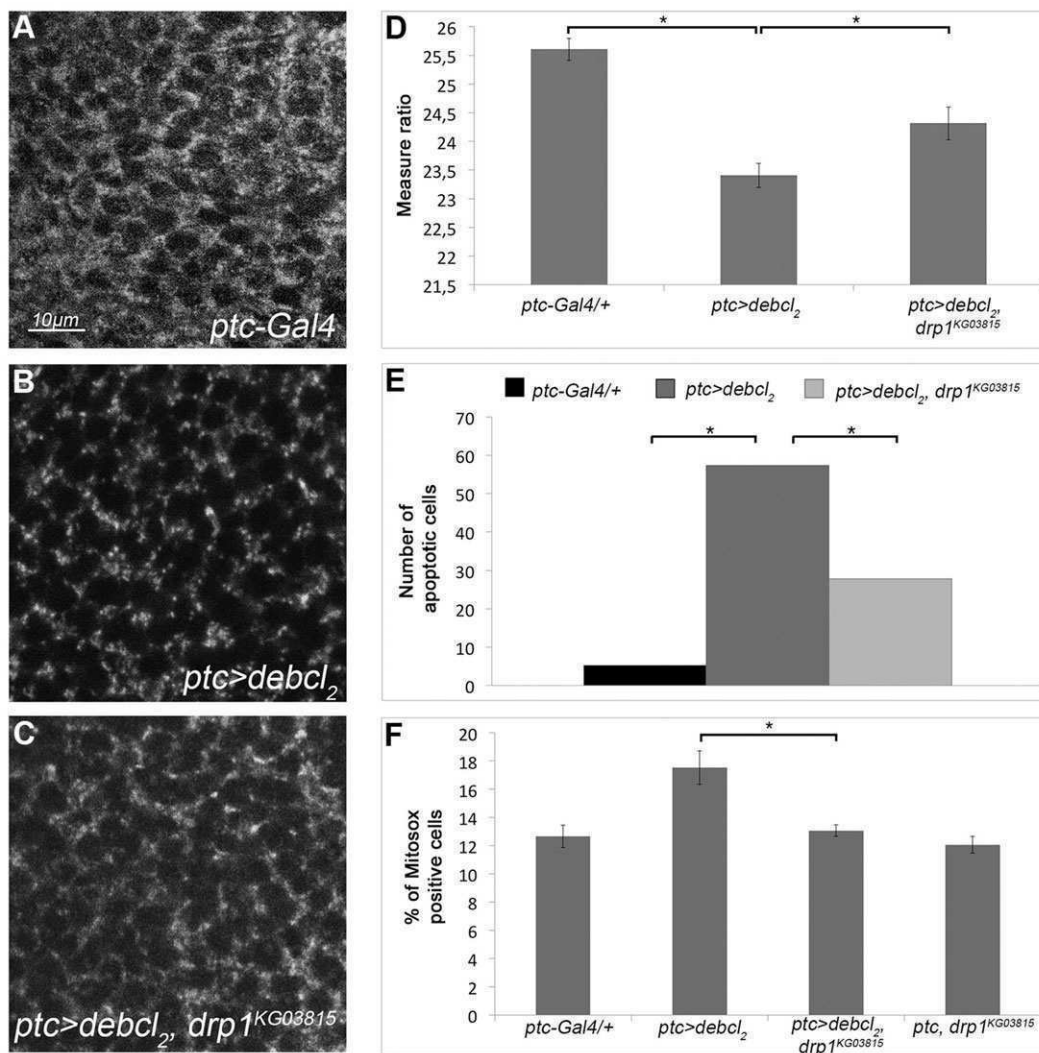


Fig. 4. *Debc1*-induced apoptosis requires Drp1 mediated mitochondrial fission. (A–C) Mitochondrial morphology observed by Alexa-Fluor-488-coupled streptavidin in wing imaginal discs from *ptc-Gal4/+* (A); *ptc-Gal4,UAS-Debc1/+;UAS-Debc1/+* (B) and *vg-Gal4,UAS-Debc1/Drp1^{KG03815};UAS-Debc1/+* (C) larvae. Scale bar: 10 μ m. (D) Measure of relative distance between the L3 and L4 veins of the previously described genotypes. (E) Quantification of apoptotic cells visualized by TUNEL staining of wing imaginal discs from the previously described genotypes. (F) Quantification by flow cytometry of MitoSOx staining (a mitochondrial superoxide indicator) in wing imaginal discs from *ptc-Gal4/+*; *ptc-Gal4/+;UAS-Rbfl/+*; *ptc-Gal4/Drp1^{KG03815};UAS-Rbfl/+* and *ptc-Gal4/Drp1^{KG03815}* larvae. Error bars are the s.e.m. Asterisks indicate a significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $\alpha < 0.05$).

this apoptosis led to a decrease in the distance between veins L3 and L4 (Fig. 4D; Colin et al., 2014). When *Debcl* was overexpressed in a *Drp1^{KG03815}* heterozygous background, we observed a rescue of the wing loss of tissue (Fig. 4D) as well as a decrease in the amount of apoptosis in wing imaginal discs (Fig. 4E) as compared to overexpression of *Debcl* in a wild-type background. Thus, Drp1 is required for *Debcl*-induced apoptosis, which suggests that mitochondrial fission plays a key role in *Debcl*-induced cell death.

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

These results highlight that *Debcl* overexpression induces a *Drp1*-dependent mitochondrial fragmentation leading to ROS production and thus to cell death. Therefore, *Debcl* overexpression is sufficient to recapitulate the mitochondrial events induced by Rbfl.

Debcl physically interacts with Drp1 *in vivo*

Drp1 plays a key role both in Rbfl- and *Debcl*-induced apoptosis. In mammals, in the absence of apoptotic stimuli, Drp1 is mostly cytosolic, whereas it becomes stabilized when it is bound to mitochondria in apoptotic cells (Wasiak et al., 2007). Because *Debcl* is a mitochondrial protein, we wondered whether Drp1 and *Debcl* physically interact during apoptosis. We used transgenic larvae expressing *Debcl*-HA and/or FLAG-HA-Drp1 to perform immunoprecipitations with an anti-FLAG antibody. When FLAG-HA-Drp1 was immunoprecipitated, we observed a co-immunoprecipitation of *Debcl*-HA (Fig. 5A), suggesting that Drp1 and *Debcl* physically interact *in vivo*. By contrast, the innocuous mitochondrial protein Tom40 did not co-immunoprecipitate, proving the specificity of *Debcl* and Drp1 interaction. Interestingly, when *Buffy* was overexpressed, the co-immunoprecipitation of *Debcl*-HA was lost (Fig. 5A), suggesting that *Buffy* inhibits the physical interaction between *Debcl* and Drp1. We assessed the occurrence of this physical interaction *in vivo* by using a proximity ligation *in situ* assay (Fig. 5B). White dots are specifically observed in the *ptc* domain when *Debcl* is overexpressed, indicating that *Debcl* and Drp1 colocalize within 40 nm. This approach confirmed that the two proteins can interact together *in vivo*. Because we do not have antibodies against *Debcl*, we were unable to test whether this interaction occurs during Rbfl-induced apoptosis without *Debcl*-HA overexpression. Nevertheless, we observed a significant increase in FLAG-HA-Drp1 proteins in the mitochondrial-enriched fraction when *Rbfl* was overexpressed compared to upon expression of the *vg-Gal4, FLAG-HA-Drp1* control (Fig. 5C,D). Consistent with this, the quantity of FLAG-HA-Drp1 significantly decreased in the cytosolic fraction. Interestingly, *Debcl^{E26}* heterozygous loss of function impeded both Drp1 mitochondrial accumulation and Drp1 cytosolic depletion (Fig. 5C,D). This result indicates that *Debcl* is required for Drp1 mitochondrial enrichment and argues for an interaction between *Debcl* and Drp1 during Rbfl-induced apoptosis.

Taken together, these results indicate that *Debcl* and Drp1 are part of the same protein complex. This complex formation facilitates Drp1 mitochondrial localization which might trigger the mitochondrial fragmentation observed following *Debcl* or *Rbfl* overexpression.

DISCUSSION

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

During Rbfl-induced apoptosis, the mitochondrial network is fragmented. Rbfl-induced mitochondrial fragmentation and cell death depend on *Drp1*. Thus our data suggest that Rbfl triggers mitochondrial fission, which in turns induces cell death. However, we have not fully shown that Drp1 pro-apoptotic activity relies on its capacity to induce mitochondrial fission. Of note, other data support this idea. Indeed, blocking mitochondrial fusion in wing imaginal discs with an RNAi directed against *marf* causes apoptosis (Thomenius et al., 2011). Moreover, Thomenius et al. have demonstrated that Reaper induces mitochondrial fragmentation by binding to and inhibiting Marf, which in turn leads to caspase activation and cell death (Thomenius et al., 2011). Thus a growing number of studies point out the importance of mitochondrial dynamics in apoptosis regulation. Because Drp1 is involved in Rbfl-induced mitochondrial ROS production, it is conceivable that Rbfl-induced mitochondrial fragmentation affects the mitochondrial respiratory chain function and increases the electron leakage, which could explain the increase in mitochondrial ROS production. In this case, the role of Drp1 in cell death would be closely related to its function in mitochondrial fission.

A number of studies on mammals support the link between pro-apoptotic Bcl-2 proteins and the mitochondrial fusion and fission machinery (Rolland and Conradt, 2010). During apoptosis, mitochondrial fragmentation occurs simultaneously with Bax relocation to mitochondria. Bax colocalizes with Drp1 and Mitofusin 2 at fission sites (Karbowski et al., 2002). Bax plays a crucial role in mitochondrial fragmentation during apoptosis (Brooks et al., 2007; Frank et al., 2001). By contrast, Mitofusin2 opposes Bax-induced apoptosis (Neuspiel et al., 2005). Thus pro-apoptotic Bcl-2 proteins cause mitochondrial fragmentation by activating fission and/or blocking fusion. Here, we show for the first time in *Drosophila*, that *Debcl* and *Buffy* control mitochondrial dynamics to regulate cell death induction. Indeed, we show that *Debcl* is required for the mitochondrial fragmentation observed during *Rbfl*-induced apoptosis. Galindo et al. have shown that mitochondrial morphology remains unaffected by *Debcl* loss of function (Galindo et al., 2009). Taken together, these results indicate that *Debcl* has a role in mitochondrial dynamics, but only in specific contexts such as in apoptotic conditions. Interestingly, *Debcl* also modulates mitochondrial density and activity, independently of apoptosis, in neuronal processes (Tsubouchi et al., 2009). The role of *Debcl* in mitochondrial dynamics during apoptosis involves a physical interaction between *Debcl* and Drp1. This interaction might be responsible for Drp1 activation and

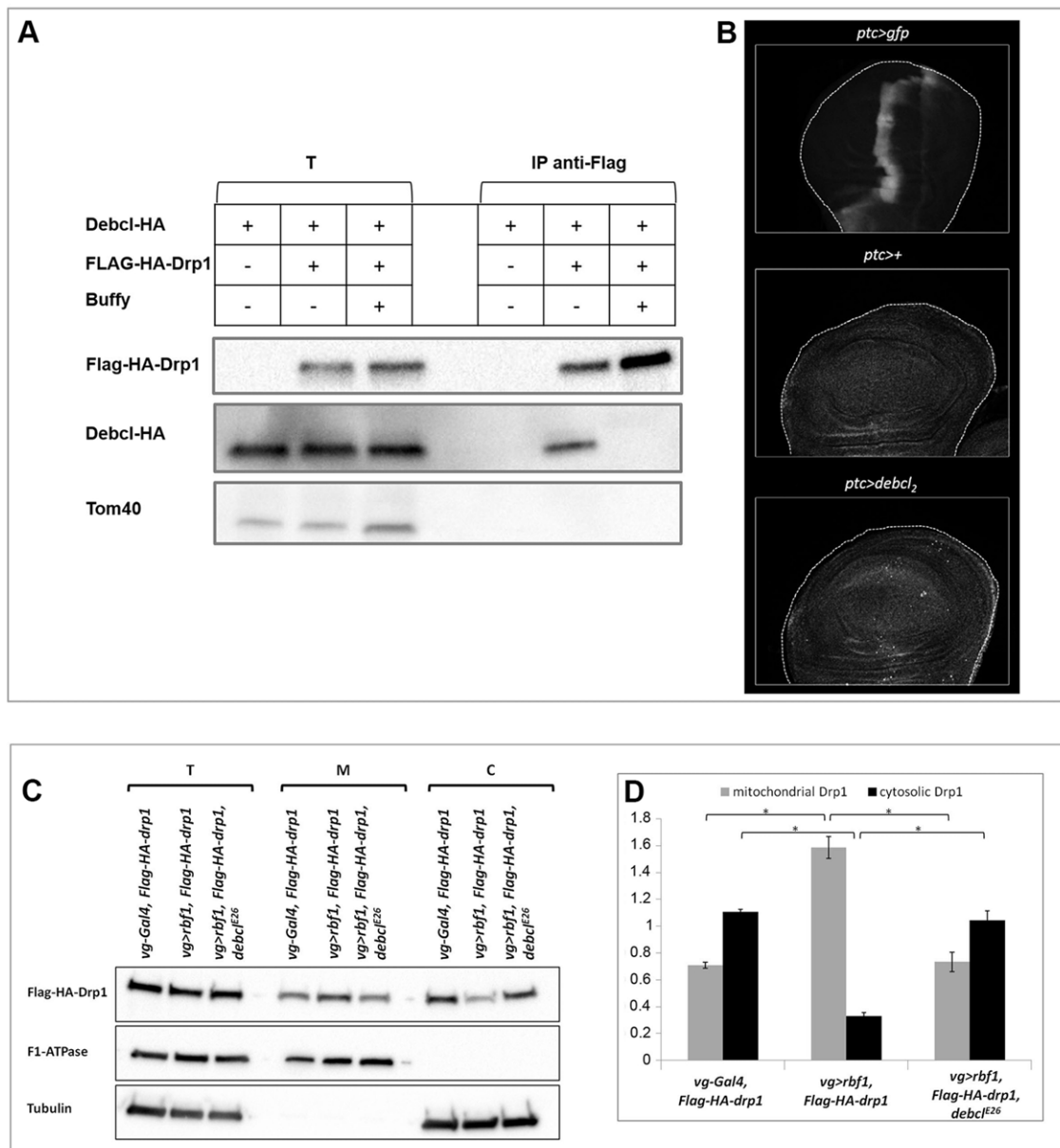


Fig. 5. Debc1 physically interacts with Drp1. (A) Immunoprecipitation assays were performed with an anti-Flag antibody on cell extracts from (1) *ptc-Gal4/+; UAS-Debc1-HA/+*; (2) *ptc-Gal4/+; UAS-Debc1-HA/FLAG-HA-Drp1* and (3) *ptc-Gal4/UAS-Buffy; UAS-Debc1-HA/FLAG-HA-Drp1* larvae. Western blotting on total extract (T) and immunoprecipitates (IP) were analyzed with anti-Flag (Drp1), anti-HA (Debc1) or anti-TOM40 antibodies. (B) Duolink[®] staining (white dots) against Drp1 and Debc1-HA in wing imaginal discs from *ptc-Gal4/+* and *ptc-Gal4,UAS-Debc1-HA/+; UAS-Debc1-HA/+* larvae. The control for expression domain of *ptc* is *ptc-Gal4/+; UAS-eGFP/+* (top). All discs are shown with posterior to the left. (C) Cell fractionation was performed on cell extracts from (1) *vg-Gal4/+; FLAG-HA-Drp1/+*; (2) *vg-Gal4/+; UAS-Rbf1/FLAG-HA-Drp1* and (3) *vg-Gal4/Debc1^{E26}; UAS-Rbf1/FLAG-HA-Drp1* larvae. Total extract (T), the mitochondrial fraction (M) and the cytosolic fraction (C) were subjected to immunoblot analysis with anti-HA (Drp1), anti-F1-ATPase (β subunit) and anti-Tubulin antibodies. (D) Quantification of the immunoblot staining against FLAG-HA-Drp1 presented in C. Error bars are the s.e.m. Asterisks indicate a significant difference between two genotypes (Student's *t*-test, $\alpha < 0.05$).

therefore for mitochondrial fission. There is no evidence for a physical interaction between Drp1 and a pro-apoptotic member of Bcl-2 family in mammals. However, Bax participates in Drp1 activation by other means. During apoptosis, Bax stimulates Drp1 sumoylation and thus promotes the stable association of Drp1 to mitochondrial membranes. Moreover, outer mitochondrial membrane permeabilization mediated by Bax allows the release of DDP (also known as TIMM8a). This protein physically interacts with Drp1 (Arnoult et al., 2005), which stabilizes Drp1 at mitochondria where it can induce mitochondrial fragmentation.

Our study also provides a better definition of Rbf1 pro-apoptotic activity. Indeed, our results indicate that Rbf1 can activate Debc1 through a transcriptional regulation of *Buffy*. This regulation plays a crucial role in cell death commitment. In mammals, regulation of Bcl-2 family proteins by pRb are usually transcriptional regulations mediated by pRb and E2F (Bertin-Ciftci et al., 2013; Bracken et al., 2004; Hao et al., 2007; Hershko and Ginsberg, 2004; Morales et al., 2011; Zhao et al., 2005). However, a recent study has demonstrated that pRb induces apoptosis directly at the mitochondria where pRb binds and conformationally activates Bax (Hilgendorf et al., 2013). Thus, the role

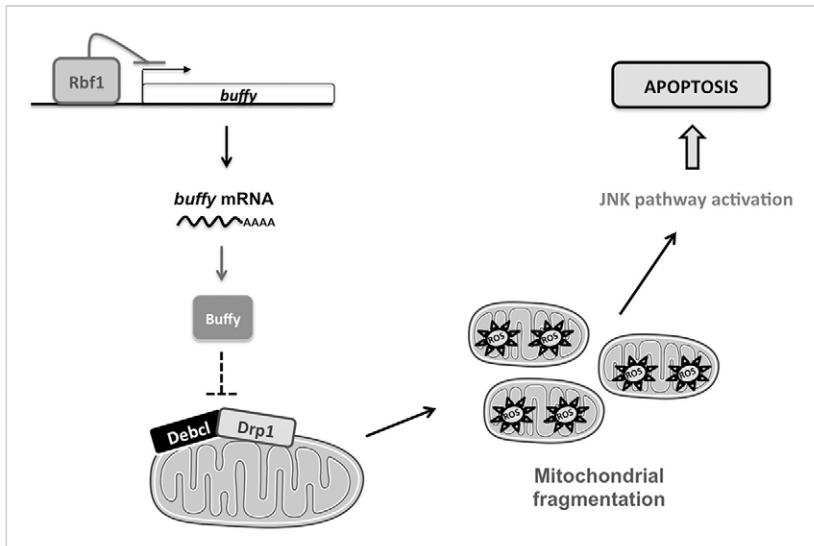


Fig. 6. Rbf1 triggers apoptosis through mitochondrial events in a Debcl-dependent fashion. Rbf1 inhibits *Buffy* expression. The decrease in *Buffy* level results in *Debcl* activation. Thus, *Debcl* interacts with *Drp1* at mitochondria, which leads to mitochondrial fragmentation. *Drp1* and *Debcl*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

of the Bcl-2 family in the control of apoptosis by pRb seems to be conserved between species although operating in different ways.

Our data indicate that *Rbf1* overexpression induces a mitochondrial death pathway involving mitochondrial fragmentation and ROS production in a *Debcl*-dependent manner. Interestingly a role of the *Rbf1* and *Drosophila* E2F (dE2F) pathway in the regulation of mitochondrial function has been reported (Ambrus et al., 2013). Indeed *Rbf1* and dE2F control the expression of genes encoding mitochondrial proteins. This regulation is crucial for normal induction of apoptosis in response to irradiation. In mammals, pRb at mitochondria activates Bax and mitochondrial apoptosis in response to diverse stimuli (Hilgendorf et al., 2013), which is in agreement with the role of pRb as a tumor suppressor. Thus mitochondria seem to play an important role in the death process induced by *Rbf1* or its counterpart pRb. Our data highlight an important role for *Drp1* in *Rbf1*-induced apoptosis. In mammals, some data indicate that Bax and *Drp1* colocalize at mitochondria during apoptosis (Karbowski et al., 2002) and that Bax and pRb interact *in vivo* (Hilgendorf et al., 2013). Therefore, it would be interesting to test the role of *Drp1* in pRb-induced apoptosis.

There is increasing evidence that key oncogenes and tumor suppressors modulate mitochondrial dynamics (Boland et al., 2013), which might be significant for tumorigenesis. Therefore, it is possible that regulating mitochondrial dynamics might be a useful therapeutic modality to induce cell death especially in *Rb*-deficient tumors. According to this idea, BIRO1, a cell permeable BH3 peptide, promotes mitochondrial fragmentation in retinoblastoma cells, which leads to cell death (Allaman-Pillet et al., 2015). Understanding how tumor suppressors modulate mitochondrial dynamics could be a major area of research in order to improve cancer treatment.

MATERIALS AND METHODS

Fly stocks

Flies were raised at 25°C on a standard medium. The *UAS-Rbf1* and *vg-Gal4* strains were generous gifts from Joel Silber (Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Paris, France). The *en-Gal4* and *ptc-gal4* strains were kindly provided by Laurent Théodore (Neuroscience Paris-Saclay Institute, Université Paris Sud, Orsay, France). The *UAS-Debcl* flies were generously provided by Helena Richardson (Research Division, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia) (Colussi et al., 2000). The following strains were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington, IN): *Buffy*^{H37} (27340), *UAS-Buffy* (32059), *Debcl*^{E26}

(27342), *Debcl*^{E26} *Buffy*^{H37} (27338), *UAS-Sod2* (24494), *Sod2*^{A02} (27643), *Drp1*^{KG03815} (13510) and *FLAG-FLAsH-HA-Drp1* (42208). *Buffy*^{H37}, *Debcl*^{E26}, *Sod2*^{A02} and *Drp1*^{KG03815} are null mutations (Sevrioukov et al., 2007; Verstreken et al., 2005). The *UAS-RNAi-hep* strain (4353R2) was from the National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Japan). We used a *w*¹¹¹⁸ fly stock as the reference strain.

Test of phenotype suppression in the wing

To test the involvement of candidate genes in *Rbf1*-induced apoptosis, the severity of the notched wing phenotype induced by *UAS-Rbf1* overexpression from the *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. For each gene, we verified that the alteration of gene expression level (overexpression or mutation) did not induce any wing phenotype. *vg-Gal4>UAS-Rbf1* *Drosophila* females were crossed with males bearing a loss-of function mutation for the different genes or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing margin. Wilcoxon tests were performed as described previously (Brun et al., 2002). We considered the difference to be significant when $\alpha < 10^{-3}$. To test the implication of *Drp1* in *Debcl*-induced apoptosis, the severity of wing tissue loss induced by *UAS-Debcl* overexpression led by *ptc-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. *ptc-Gal4>(UAS-Debcl)*₂ *Drosophila* females were crossed with wild-type males or males bearing a loss-of function mutation for *Drp1*. The distance between L3 and L4 veins was measured perpendicularly to the sixth sensilla of the dorsal row of the anterior wing margin and plotted against the distance between the extremity of veins L4 and L5 for the progenies of all crosses. Student's *t*-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha < 5\%$.

TUNEL staining of imaginal discs

Third-instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS with 3.7% formaldehyde, washed three times for 10 min in PBT (1× PBS, 0.5% Triton X-100). Discs were then dissected and TUNEL staining was performed according to the manufacturer's instructions (ApopTag Red *in situ* apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Discs were mounted in CitifluorTM (Biovalley, Marne-La-Vallée, France) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). White patches in the wing pouch (for *Rbf1* experiments) or in *ptc* area (for *Debcl* experiments) were counted for at least 30 wing imaginal discs per genotype. Student's *t*-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha < 5\%$.

Immunostaining

Third-instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS with 3.7% formaldehyde. Discs were labeled by overnight incubation at 4°C with anti-

Mmp1 antibody (mouse monoclonal, 1:25, 5H7B11, DSHB, IA) in PBT with FCS (PBS, 0.3% Triton X-100, 10% fetal calf serum). Incubation with anti-mouse-IgG secondary antibody (Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-mouse-IgG (H+L) Antibody, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or with a Streptavidin Alexa Fluor® 488 conjugate (1:50, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was carried in PBT with FCS for 2 h at room temperature. After washing in PBT, wing discs were finally mounted in Citifluor™ (Biovalley) and observed with a Leica SPE upright confocal microscope.

ROS measurement

As described previously (Bergeaud et al., 2013), MitoSOX (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was used to measure the mitochondrial production of superoxide. Briefly, 20 wing imaginal discs were dissected in Schneider's *Drosophila* medium (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Graffenstaden, France), then cells were trypsinized. 5 µM MitoSOX were added to the cells, which were incubated at 37°C. Red fluorescence was then measured by flow cytometry by analyzing 2000 events per experimental condition. Flow cytometric measurements were performed using a BD LSRFortessa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Fluorescence was induced by the yellow-green laser (561 nm). Red fluorescence was collected with a phycoerythrin detector (emission, 578 nm).

RNAs extraction and qRT-PCR

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

Real-time PCR analysis was performed using the ABI Prism 7700 HT apparatus (Applied Biosystems). Briefly, PCR was performed with the Absolute blue qRT-PCR SYBR Green ROX mix (Abgene), using 11 ng of cDNA per RT. Data were normalized against *rp49*. Three independent room temperature experiments were performed and the s.e.m. was calculated from these three independent samples.

Immunoprecipitation

Five third-instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, crushed in lysis buffer [Tris-HCl pH 8, 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1% (NP40), protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA free, Roche, Boulogne-Billancourt, France)]. Cuticles were removed after centrifugation for 10 min at 240 g at 4°C. An additional centrifugation was performed for 15 min at 6000 g at 4°C in order to eliminate membrane fragments. The supernatant (total extracts) was recovered and 75 µl were incubated with 15 µl of anti-FLAG antibody attached to agarose beads (Anti-FLAG® M1 Agarose Affinity Gel, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) overnight at 4°C on a rotating wheel. Immune complexes were then washed five times with lysis buffer and resuspended in loading buffer. Samples were boiled for 5 min and proteins were subjected to western blotting as described below.

Cell fractionation

Ten third-instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, crushed in 400 µl of fractionation buffer (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 10 mM, sucrose 0.32 M), protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA free, Roche). Cuticles were removed after centrifugation for 5 min at 60 g at 4°C. 15 µl (total extracts) were kept. An additional centrifugation was realized for 10 min at 2650 g at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was recovered. The pellet (mitochondrial fraction) was washed once with fractionation buffer and was then resuspended in 350 µl of fractionation buffer. Samples were boiled for 5 min and proteins were subjected to western blotting as described below.

SDS-PAGE electrophoresis and western blot

Proteins were separated in 4–20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels according to the manufacturer's instructions (BIO-RAD, Hercules, CA) and transferred onto PVDF membrane (Millipore, Darmstadt, Germany). Blots were incubated with primary antibodies [(anti-HA

antibody, 1:1000, ab9110, Abcam, Cambridge, UK), anti-Flag.M2 antibody (1:500, Agilent, Santa Clara, CA), anti-Tubulin (1:500, clone B-5-1-2, Sigma) and anti-F1-ATPase (1:1000, β-subunit MS503, MitoScience/Abcam, Cambridge, UK), anti-Tom40 (1:200, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, TX)] overnight at 4°C and were then incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-mouse-IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Immunoreactive bands were detected by Immobilon Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), visualized and quantified using ChemiDoc XRS+ system (BIO-RAD).

In situ proximity ligation assay

ptc>+ and *ptc>Debel2* third-instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS with formaldehyde 3.7%, washed three times for 5 min in PBT (PBS, 0.3% Triton X-100). Wing imaginal discs were then dissected and incubated in PBT with FCS (PBS, 0.3% Triton X-100, 10% FCS) at room temperature during 20 min. *In situ* PLA was performed using the Duolink® kit (Olink Bioscience) essentially according to manufacturer's instructions. Briefly, wing imaginal discs were stained with primary antibodies overnight at 4°C. The antibodies used for Duolink assays and their corresponding dilutions are: anti-HA antibody (ab9110, Abcam, 1:200) and anti-DLP1 antibody (BD Transduction Laboratories, 1:200). After washing, wing imaginal discs were incubated with the secondary oligonucleotide-linked antibodies (PLA probes, anti-mouse PLUS and anti-rabbit MINUS) provided in the kit. The oligonucleotides bound to the antibodies were hybridized, ligated, amplified and detected using a fluorescent probe (Detection Kit 563). Discs were mounted in Citifluor™ (Biovalley) and observed with a Leica SP2 upright confocal microscope.

Acknowledgements

We are grateful to Sébastien Szuplewski, Sébastien Gaumer and Frédéric Canal for their critical readings of the manuscript. Confocal microscopy was performed at the CYMAGES imaging facility (University of Versailles/Saint-Quentin-en-Yvelines). We thank Jérôme Estaquier, Mireille Laforge and Nathalie Le Floch for generously providing anti-Drp1 or -Tom40 antibodies. We also acknowledge Vincent Rincheval and Elisabeth Delmas for their help concerning flow cytometry. qRT-PCR experiments were performed in the UMR 1198 'Biologie du Développement et Reproduction' (INRA, Jouy-en-Josas).

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

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

Funding

This research was supported by the Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and the Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE). A.C. and V.R. were the recipient of a doctoral contract from the UVSQ. A.C. was supported by the EPHE.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.169896/-DC1>

References

- Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R. J., Balasundaram, S., Fowle, W. H. and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in *Drosophila* apoptosis. *Dev. Cell* **12**, 793–806.
- Allaman-Pillet, N., Oberson, A. and Schorderet, D. F. (2015). BIR01, a cell permeable BH3 peptide, promotes mitochondrial fragmentation and death of retinoblastoma cells. *Mol. Cancer Res.* **13**, 86–97.
- Ambrus, A. M., Islam, A. B. M. M. K., Holmes, K. B., Moon, N. S., Lopez-Bigas, N., Benevolenskaya, E. V. and Frolow, M. V. (2013). Loss of dE2F compromises mitochondrial function. *Dev. Cell* **27**, 438–451.
- Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R. G., Seeburg, D. P., Estaquier, J., Sheng, M. and Blackstone, C. (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr. Biol.* **15**, 2112–2118.
- Bergeaud, M., Mathieu, L., Guillaume, A., Moll, U., Mignotte, B., Le Floch, N., Vayssiere, J.-L. and Rincheval, V. (2013). Mitochondrial p53 mediates a

- transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Cell Cycle* **12**, 2781–2793.
- Bertin-Ciftci, J., Barré, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P. and Braun, F.** (2013). pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ.* **20**, 755–764.
- Biasoli, D., Kahn, S. A., Cornélio, T. A., Furtado, M., Campanati, L., Chneiweiss, H., Moura-Neto, V. and Borges, H. L.** (2013). Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell Death Dis.* **4**, e767.
- Boland, M. L., Chourasia, A. H. and Macleod, K. F.** (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front. Oncol.* **3**, 292.
- Bowen, C., Spiegel, S. and Gelmann, E. P.** (1998). Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res.* **58**, 3275–3281.
- Brachmann, C. B., Jassim, O. W., Wachsmuth, B. D. and Cagan, R. L.** (2000). The *Drosophila* bcl-2 family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. *Curr. Biol.* **10**, 547–550.
- Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A. and Helin, K.** (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 409–417.
- Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and Shore, G. C.** (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* **160**, 1115–1127.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J. and Dong, Z.** (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11649–11654.
- Brun, S., Rincheval, V., Gaumer, S., Mignotte, B. and Guénal, I.** (2002). reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in *Drosophila*. *Oncogene* **21**, 6458–6470.
- Challa, M., Malladi, S., Pellock, B. J., Dresnek, D., Varadarajan, S., Yin, Y. W., White, K. and Bratton, S. B.** (2007). *Drosophila* Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. *EMBO J.* **26**, 3144–3156.
- Claveria, C., Caminero, E., Martínez-A, C., Campuzano, S. and Torres, M.** (2002). GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. *EMBO J.* **21**, 3327–3336.
- Clavier, A., Baillet, A., Rincheval-Arnold, A., Coléno-Costes, A., Lasbleiz, C., Mignotte, B. and Guénal, I.** (2014). The pro-apoptotic activity of *Drosophila* Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA. *Cell Death Dis.* **5**, e1405.
- Colin, J., Garibal, J., Clavier, A., Rincheval-Arnold, A., Gaumer, S., Mignotte, B. and Guénal, I.** (2014). The *Drosophila* Bcl-2 family protein Debcl is targeted to the proteasome by the beta-TrCP homologue slimb. *Apoptosis* **19**, 1444–1456.
- Colussi, P. A., Quinn, L. M., Huang, D. C. S., Coombe, M., Read, S. H., Richardson, H. and Kumar, S.** (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *J. Cell Biol.* **148**, 703–714.
- Desagher, S. and Martinou, J.-C.** (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369–377.
- Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G. and Vento, R.** (2013). RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J. Cell Physiol.* **228**, 1676–1687.
- Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J. R., Hay, B. A. and Kumar, S.** (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Biol.* **156**, 1089–1098.
- Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y. and Kumar, S.** (2004). The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* **167**, 405–410.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L. and Mignotte, B.** (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **942**, 157–183.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 515–525.
- Freel, C. D., Richardson, D. A., Thomenius, M. J., Gan, E. C., Horn, S. R., Olson, M. R. and Kornbluth, S.** (2008). Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. *J. Biol. Chem.* **283**, 367–379.
- Galindo, K. A., Lu, W.-J., Park, J. H. and Abrams, J. M.** (2009). The Bax/Bak ortholog in *Drosophila*, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. *Development* **136**, 275–283.
- García-Sáez, A. J.** (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* **19**, 1733–1740.
- Goyal, G., Fell, B., Sarin, A., Youle, R. J. and Sriram, V.** (2007). Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* **12**, 807–816.
- Green, D. R., Galluzzi, L. and Kroemer, G.** (2014). Metabolic control of cell death. *Science* **345**, 1250256.
- Hao, H., Dong, Y., Bowling, M. T., Gomez-Gutierrez, J. G., Zhou, H. S. and McMasters, K. M.** (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* **7**, 24.
- Hardwick, J. M. and Soane, L.** (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008722.
- Hershko, T. and Ginsberg, D.** (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 8627–8634.
- Hilgendorf, K. I., Leshchiner, E. S., Nedelcu, S., Maynard, M. A., Calo, E., Ianari, A., Walensky, L. D. and Lees, J. A.** (2013). The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev.* **27**, 1003–1015.
- Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A. and Lees, J. A.** (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* **15**, 184–194.
- Igaki, T., Kanuka, H., Inohara, N., Sawamoto, K., Nunez, G., Okano, H. and Miura, M.** (2000). Drob-1, a *Drosophila* member of the bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 662–667.
- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* **159**, 931–938.
- Karbowski, M., Arnout, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* **164**, 493–499.
- Lin, R., Angelin, A., Da Settimo, F., Martini, C., Taliani, S., Zhu, S. and Wallace, D. C.** (2014). Genetic analysis of dTSP0, an outer mitochondrial membrane protein, reveals its functions in apoptosis, longevity, and Aβ42-induced neurodegeneration. *Aging Cell* **13**, 507–518.
- Means, J. C., Muro, I. and Clem, R. J.** (2006). Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system. *Cell Death Differ.* **13**, 1222–1234.
- Mendes, C. S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H. and Mollereau, B.** (2006). Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila* retina. *EMBO Rep.* **7**, 933–939.
- Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Mignotte, B. and Guénal, I.** (2010). The *Drosophila* retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* **9**, 97–103.
- Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Morieras, A., Clavier, A., Garrigue, A., Mignotte, B. and Guénal, I.** (2014). Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis. *PLoS ONE* **9**, e102902.
- Morales, A., Alvarez, A., Arvelo, F., Suárez, A. I., Compagnone, R. S. and Galindo-Castro, I.** (2011). The natural diterpene ent-16beta-17alpha-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2alpha/Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. *Apoptosis* **16**, 1245–1252.
- Morgenbesser, S. D., Williams, B. O., Jacks, T. and DePinho, R. A.** (1994). p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* **371**, 72–74.
- Morishita, J., Kang, M.-J., Fidelin, K. and Ryoo, H. D.** (2013). CDK7 regulates the mitochondrial localization of a tail-anchored proapoptotic protein, Hid. *Cell Rep.* **5**, 1481–1488.
- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. and McBride, H.** (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J. Biol. Chem.* **280**, 25060–25070.
- Olson, M. R., Holley, C. L., Gan, E. C., Colon-Ramos, D. A., Kaplan, B. and Kornbluth, S.** (2003). A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. *J. Biol. Chem.* **278**, 44758–44768.
- Park, J., Choi, H., Min, J.-S., Park, S.-J., Kim, J.-H., Park, H.-J., Kim, B., Chae, J.-I., Yim, M. and Lee, D.-S.** (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *J. Neurochem.* **127**, 221–232.
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y.-C. and Mochly-Rosen, D.** (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J. Cell Sci.* **126**, 789–802.
- Quinn, L., Coombe, M., Mills, K., Daish, T., Colussi, P., Kumar, S. and Richardson, H.** (2003). Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *EMBO J.* **22**, 3568–3579.
- Rolland, S. G. and Conrad, B.** (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 852–858.
- Sandu, C., Ryoo, H. D. and Steller, H.** (2010). *Drosophila* IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *J. Cell Biol.* **190**, 1039–1052.
- Senoo-Matsuda, N., Igaki, T. and Miura, M.** (2005). Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in *Drosophila*. *EMBO J.* **24**, 2700–2713.
- Sevrioukov, E. A., Burr, J., Huang, E. W., Assi, H. H., Monserrate, J. P., Purves, D. C., Wu, J. N., Song, E. J. and Brachmann, C. B.** (2007). *Drosophila* Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. *Genesis* **45**, 184–193.
- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S. P. and Martin, S. J.** (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol. Cell* **31**, 570–585.

- Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T. and Pae, H.-O.** (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* **528**, 27-48.
- Tait, S. W. G. and Green, D. R.** (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008706.
- Thomenius, M., Freel, C. D., Horn, S., Krieser, R., Abdelwahid, E., Cannon, R., Balasundaram, S., White, K. and Kornbluth, S.** (2011). Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate *Drosophila* programmed cell death. *Cell Death Differ.* **18**, 1640-1650.
- Tsai, K. Y., Hu, Y., Macleod, K. F., Crowley, D., Yamasaki, L. and Jacks, T.** (1998). Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol. Cell* **2**, 293-304.
- Tsubouchi, A., Tsuyama, T., Fujioka, M., Kohda, H., Okamoto-Furuta, K., Aigaki, T. and Uemura, T.** (2009). Mitochondrial protein Preli-like is required for development of dendritic arbors and prevents their regression in the *Drosophila* sensory nervous system. *Development* **136**, 3757-3766.
- Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R. and Abrams, J. M.** (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **144**, 701-710.
- Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J. T., Koh, T.-W., Zhou, Y. and Bellen, H. J.** (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* **47**, 365-378.
- Wasiak, S., Zunino, R. and McBride, H. M.** (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* **177**, 439-450.
- Zhang, H., Huang, Q., Ke, N., Matsuyama, S., Hammock, B., Godzik, A. and Reed, J. C.** (2000). *Drosophila* pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**, 27303-27306.
- Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E. T. and Yu, Q.** (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16090-16095.
- Zimmermann, K. C., Ricci, J.-E., Droin, N. M. and Green, D. R.** (2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* **156**, 1077-1087.



Special Issue on 3D Cell Biology
Call for papers
Submission deadline: January 16th, 2016
Journal of Cell Science

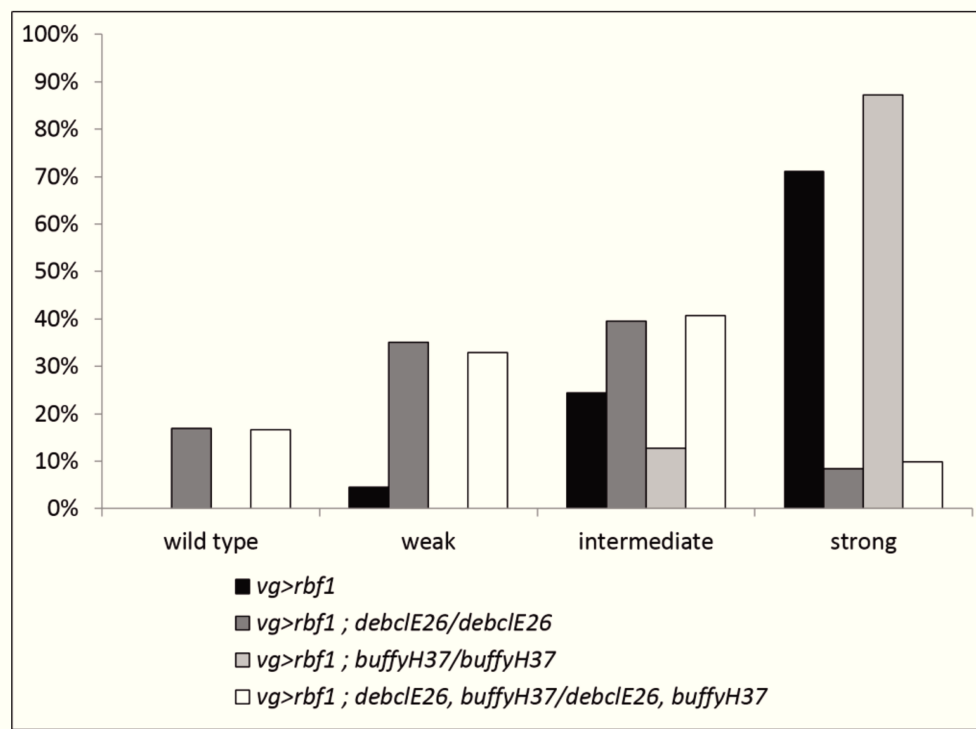


Figure S1: Rbf1-induced *debcl*-dependent loss of tissue.

Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4/+ ; UAS-rbf1/+ ; vg-Gal4/ buffy^{H37} ; UAS-rbf1/+ ; vg-Gal4/ debcl^{E26} ; UAS-rbf1/+* and *vg-Gal4/ buffy^{H37}, debcl^{E26} ; UAS-rbf1/+*.

Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests: *debcl^{E26}*: n=352, $\alpha < 10^{-30}$, $W_s = -12,73$; *buffy^{H37}*: n=411, $\alpha = 2,56 \cdot 10^{-5}$, $W_s = 4,22$; *debcl^{E26}, buffy^{H37}*: n=380, $\alpha < 10^{-30}$, $W_s = -12,80$.

Each experiment was independently performed three times; a representative experiment is shown.

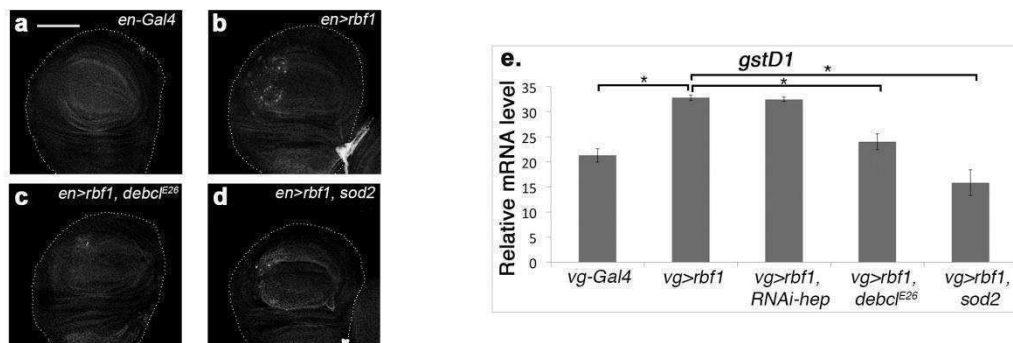


Figure S2: Rbf1 induces JNK activation and ROS production through Debcl.

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

(e) Quantification by RT-qPCR of *gstD1* mRNA in wing imaginal discs from *vg-Gal4*; *vg-Gal4>UAS-rbf1*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-RNAi-hep*; *vg-Gal4>UAS-rbf1,debcl^{E26}* and *vg-Gal4>UAS-rbf1,UAS-sod2* larvae. Data are normalized against *rp49* and the mean of three independent experiments are shown. Error bars are the S.E.M. *: Student's t-test, $P<0,05$.

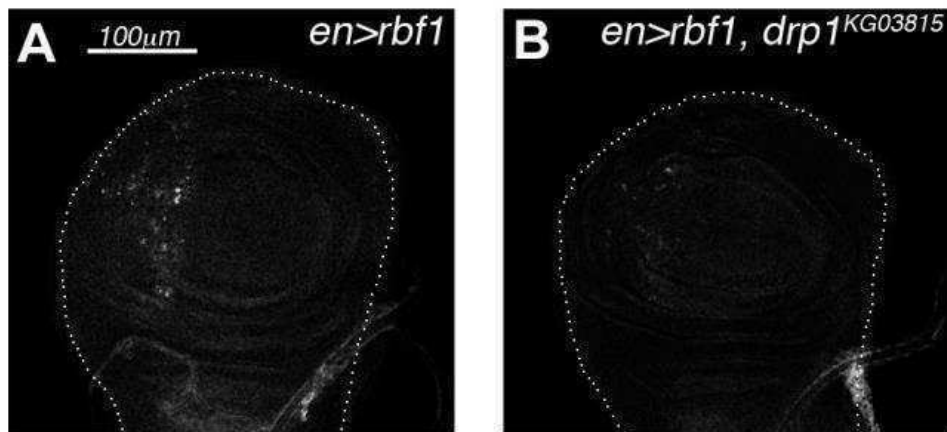


Figure S3: *drp1* is required for *rbf1*-induced JNK pathway activation.

Anti-Mmp1 immunostaining (white dots), in wing imaginal discs from *en-Gal4>UAS-rbf1* (a) and *en-Gal4>UAS-rbf1,drp1^{KG03815}* (b) larvae. All discs are shown with posterior to the left. Scale bar: 100 μm.

3. Données complémentaires sur le rôle de la dynamique mitochondriale dans l'apoptose induite par Rbf1.

Les résultats présentés dans l'article ci-dessus ont démontré l'importance de la dynamique mitochondriale dans l'apoptose induite par Rbf1. Afin de mieux comprendre la régulation de ce processus, j'ai testé si d'autres effecteurs centraux de la dynamique mitochondriale étaient impliqués dans ce phénomène. Alors que Drp1 est responsable de la fission mitochondriale chez la drosophile, les protéines en charge de la fusion des membranes externes et internes sont respectivement MARF (ou Mitofusin 2) et Opa1, il semblait donc opportun de s'intéresser à l'implication de ces protéines dans notre modèle d'étude. Afin de déterminer leur importance dans la régulation de l'apoptose mitochondriale induite par Rbf1, j'ai observé les effets de la diminution de leur quantité dans ce contexte (par expression d'ARNi spécifique de leur ARNm). Les résultats concernant la protéine MARF sont présentés ci-après. L'étude du rôle d'Opa1 s'est avérée moins évidente. En effet, la diminution de la quantité d'ARNm d'*opa1* dans l'aile induit à elle seule des phénotypes forts qui ne permettait pas d'interpréter les tests d'interactions génétiques réalisés en contexte d'une surexpression de *rbf1* dans l'aile. Il n'a donc pas été étudié davantage.

a. MARF est impliquée dans le phénotype d'aile induit par Rbf1

Nous avons montré que Drp1, responsable de la fission mitochondriale était un régulateur important dans l'apoptose induite par Rbf1. Nous avons alors testé si MARF, dont une des fonctions est d'être un effecteur de la fusion mitochondriale, avait un rôle antagoniste dans notre modèle. Pour cela, le phénotype d'aile induit par Rbf1 lorsque son gène est exprimé dans le domaine vestigial a été utilisé (comme décrit précédemment dans l'article Clavier *et al.*, 2015). Dans ce contexte des tests d'interaction génétique entre *rbf1* et *MARF* ont été effectués. Le phénotype d'aile étudié se présente sous la forme d'encoche chez l'adulte. Ces encoches sont dues à l'apoptose que déclenche la surexpression de *rbf1* dans le domaine « vestigial » au cours du développement. La force du phénotype est légèrement variable d'un individu à l'autre et la répartition des ailes de chaque descendant dans des classes allant de sauvage (pas d'encoche) à fort (au moins 4 encoches) nous permet de rendre

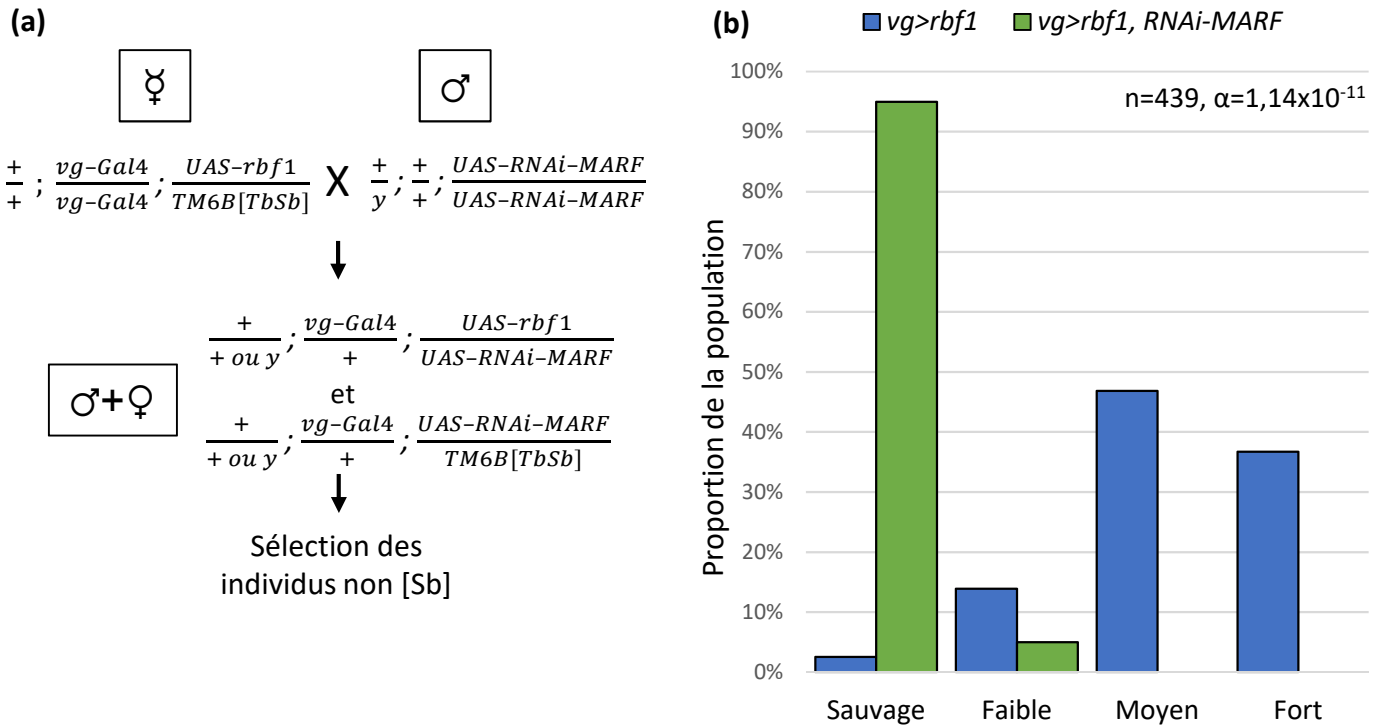


Figure 31. Une diminution du niveau de MARF supprime le phénotype d'encoche dans l'aile induit par Rbf1

(a) Schéma du croisement génétique permettant de tester l'interaction génétique entre *rbf1* et *MARF*. Une souche surexprimant *rbf1* sous contrôle du promoteur *vg-Gal4* est croisée avec une souche possédant un transgène exprimant un ARNi dirigé contre *MARF*. Les individus d'intérêt surexpriment à la fois *rbf1* et l'ARNi-*MARF*. Ils sont isolés car ils ne présentent pas les marqueurs de soies phénotype [Sb] portés par le chromosome balancier *TM6B[TbSb]*. **(b)** La surexpression de *rbf1* sous contrôle de l'inducteur *vg-Gal4* induit la formation d'encoches au niveau de la marge de l'aile. Les individus sont classés dans quatre catégories correspondant à la force du phénotype d'encoche. L'histogramme présente le pourcentage d'aile obtenu pour chaque génotype étudié ($\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{+}$ (*vg>GFP*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-RNAi-MARF}{+}$ (*vg>GFP, RNAi-MARF*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}$ (*vg>rbf1*) et $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-RNAi-MARF}{+}$ (*vg>rbf1, RNAi-MARF*)). La co-expression d'un ARNi-*MARF* (JF01650 TRIP) entraîne un décalage important de la répartition vers le phénotype de sauvage. Un test statistique de Wilcoxon a permis de vérifier la significativité de ce décalage avec un $\alpha=1,14 \times 10^{-11}$ (N=439).

compte de la proportion de mort cellulaire initiée par Rbf1 (voir Figure 1A de l'article (Clavier *et al.*, 2015)).

J'ai testé l'implication de MARF dans l'apoptose induite par Rbf1 en croisant des drosophiles exprimant Rbf1 dans le domaine vestigial (vg) grâce au système UAS-Gal4, avec des drosophiles possédant un transgène codant pour un ARN interférant inductible dirigé contre l'ARNm de *MARF* (*UAS-ARNi-MARF*). La lignée utilisée provient de la collection *Transgenic RNAi Project* (TRIP) du stock Bloomington (BL 31157). Le croisement est détaillé en figure 31a. Les individus d'intérêt (ne présentant pas le marqueur Stubble (Sb)) sont répartis dans les classes phénotypiques en fonction de la force de leur phénotype d'aile. La figure 31b présente la répartition des individus en fonction de la force du phénotype d'aile. La répartition obtenue est comparée à la répartition des phénotypes obtenus pour une population ne surexprimant que *rbf1*, établie à partir d'un croisement réalisé en parallèle, entre des parents de génotype $\frac{vg-Gal4}{vg-Gal4}$; $\frac{UAS-rbf1}{TM6B[TbSb]}$ et des parents sauvages w^{1118} . La répartition des phénotypes des individus surexprimant *rbf1* seul est centrée sur des phénotypes moyen et fort. Lorsque que *rbf1* est exprimé en présence de l'*ARNi* dirigé contre *MARF*, un décalage de cette répartition vers le phénotype sauvage est observé. Un test statistique de Wilcoxon permet de confirmer la suppression des phénotypes d'aile induit par *rbf1* en présence de l'*ARNi-MARF* (α égal à $1,14 \times 10^{-11}$, N=439). Deux autres expériences indépendantes avec la même lignée *ARNi* ont été menées et ont confirmé ces résultats, ainsi, que l'utilisation d'une lignée de la collection *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC), permettant également l'expression d'un *ARNi* dirigé contre *MARF* (KK105681). Les résultats sont résumés dans le tableau 1. Par ailleurs, il a été vérifié que l'expression de l'*ARNi-MARF* seul n'induisait pas de phénotype d'aile.

La réduction du niveau de MARF induit une suppression importante du phénotype d'aile induit par Rbf1. Les phénotypes d'aile induits par *rbf1* dépendent donc de MARF. De façon surprenante, bien que MARF et Drp1 aient des activités opposées vis-à-vis de la dynamique mitochondriale, les phénotypes induits par Rbf1 nécessite la présence de ces deux protéines. Ce résultat suggère que MARF aurait dans ce contexte un rôle différent de sa fonction liée à la fusion mitochondriale.

b. MARF est nécessaire à l'apoptose induite par Rbf1

Afin de déterminer si la suppression du phénotype d'aile en présence de l'*ARNi-MARF* était due à des modifications du niveau de l'apoptose induite par Rbf1 dans le disque d'aile,

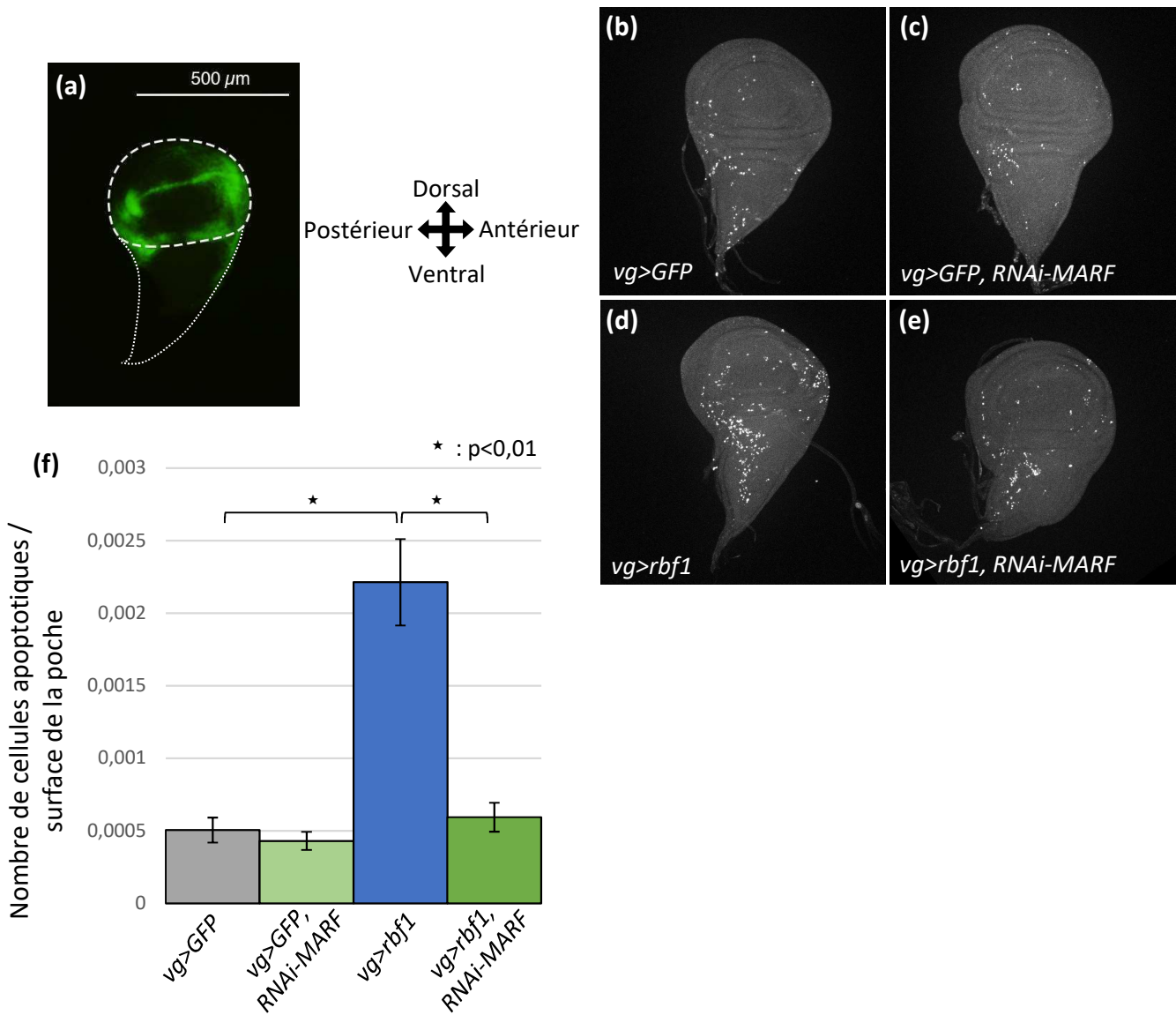


Figure 32. Une diminution du niveau de MARF inhibe l'apoptose induite par Rbf1

(a) Le domaine *vg* est observable ici par la présence des transgènes *vg-Gal4* et *UAS-GFP* dans la lignée. Comme nous pouvons le voir, *vg* étant principalement actif au niveau de la poche du disque imaginal d'aile, seule l'apoptose présente au niveau de la poche est prise. La quantification du nombre de cellule correspondant au nombre de point blanc a donc été faite en sélectionnant sur chaque disque la surface de la poche, telle qu'entouré en tirets blancs en (e). La quantité est alors rapportée à la surface du domaine sélectionné.

(b,c,d,e) Marquage TUNEL sur disques imaginaux d'ailes issus des lignées $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{+}$ (*vg>GFP*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{+}; \frac{UAS-RNAi-PINK1}{+}$ (*vg>GFP, RNAi-PINK1*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}$ (*vg>rbf1*) et $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}; \frac{UAS-RNAi-PINK1}{+}$ (*vg>rbf1, RNAi-PINK1*). Chaque point blanc correspond à une cellule apoptotique. (a) Contrôle négatif *vg>GFP* présente une apoptose basale, notamment au niveau du notum. (b) L'expression d'un RNAi dirigé contre *MARF* (*vg>GFP, RNAi-MARF*) n'entraîne pas d'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. (c) La surexpression de *rbf1* (*vg>rbf1*), conformément aux études précédentes, induit une apoptose importante. (d) La co-expression de *rbf1* et du *RNAi-MARF* (*vg>rbf1, RNAi-MARF*) restreint l'apoptose à son niveau basal.

(f) **Quantification des marquages TUNEL.** L'histogramme présente les moyennes du nombre de cellules apoptotiques dans la poche rapportée à la surface de la poche (en unité arbitraire (UA)) pour 30 disques imaginaux d'aile par génotype. L'expression du *RNAi-MARF* seul, n'induit pas d'augmentation de l'apoptose dans le domaine *vg* contrairement à la surexpression de *rbf1*. La co-expression de *rbf1* et du *RNAi-MARF* présente un niveau d'apoptose comparable au témoin. Des tests statistiques de Student ont été menés entre les génotypes comparables. Ils confirment que ces différences sont bien significatives avec un p-value < 0,01 (*).

la quantité d'apoptose a été quantifiée par la méthode TUNEL. Cette quantification a été faite dans une région spécifique du disque imaginal d'aile (domaine *vg* visualisé figure 32a). Pour cela, des disques imaginaux d'ailes issus de larves de différents génotypes ont été testés : *vg>GFP* (témoin sauvage), *vg>GFP, RNAi-MARF* (témoin d'expression de l'ARNi seul), *vg>rbf1* (témoin de l'apoptose induite par l'expression de *rbf1*) et *vg>rbf1, RNAi-MARF* (expression de l'ARNi-MARF dans un contexte d'apoptose induite par Rbf1). L'observation en microscopie à fluorescence de disques entiers nous a permis de visualiser et de quantifier le niveau d'apoptose induit pour les différents génotypes.

On observe dans la figure 32b, que le témoin (*vg>GFP*) possède un niveau d'apoptose basal correspondant à l'apoptose développemental. En figure 32c, l'expression de l'ARNi dirigé contre *MARF* dans le domaine *vg* n'induit pas d'augmentation de cette apoptose. A l'inverse, la surexpression de *rbf1* dans ce domaine (figure 32d), induit une augmentation importante de cellules en apoptose. Le nombre de cellules apoptotiques observé pour les individus exprimant *rbf1* en présence de l'ARNi-MARF est similaire au niveau d'apoptose développementale basale observée dans le contrôle (32b et 32c). L'expression de l'ARNi-MARF semble donc inhiber l'apoptose induite par Rbf1.

Cette observation qualitative a été complétée par une approche quantitative. Le domaine d'expression du promoteur *vg* est observable en vert dans la figure 32a. Seules les cellules apoptotiques présentes au niveau de la poche du disque imaginal, où est exprimé le gène *vg*, ont été comptabilisées, de façon à limiter la prise en compte de l'apoptose développementale basale présente dans le notum (figure 32a). Nous avons choisi de rapporter le nombre de cellules apoptotiques, à la surface de la poche calculées par Image J. Ce rapport correspond à une unité arbitraire utilisée pour nos calculs. La moyenne de ces rapports pour 30 disques imaginaux par génotype est présentée dans la figure 32f. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Nous pouvons voir un rapport de 5×10^{-4} pour les disques imaginaux issus du témoin négatif (*vg>GFP*). Ce rapport est sensiblement le même pour les disques imaginaux issus des larves exprimant l'ARNi-MARF (*vg>GFP, RNAi-MARF*). En revanche, il est 4,5 fois plus élevé ($2,25 \times 10^{-3}$) pour les disques imaginaux issus des larves surexprimant *rbf1* (*vg>rbf1*). Les disques imaginaux co-exprimant *rbf1* et l'ARNi-MARF sous contrôle de l'inducteur *vg-Gal4* présentent un rapport proche de 5×10^{-4} , comme le témoin négatif. Des tests statistiques de Student ont été réalisés en comparant les génotypes comparables deux à deux. Ces tests confirment que l'augmentation observée entre le témoin

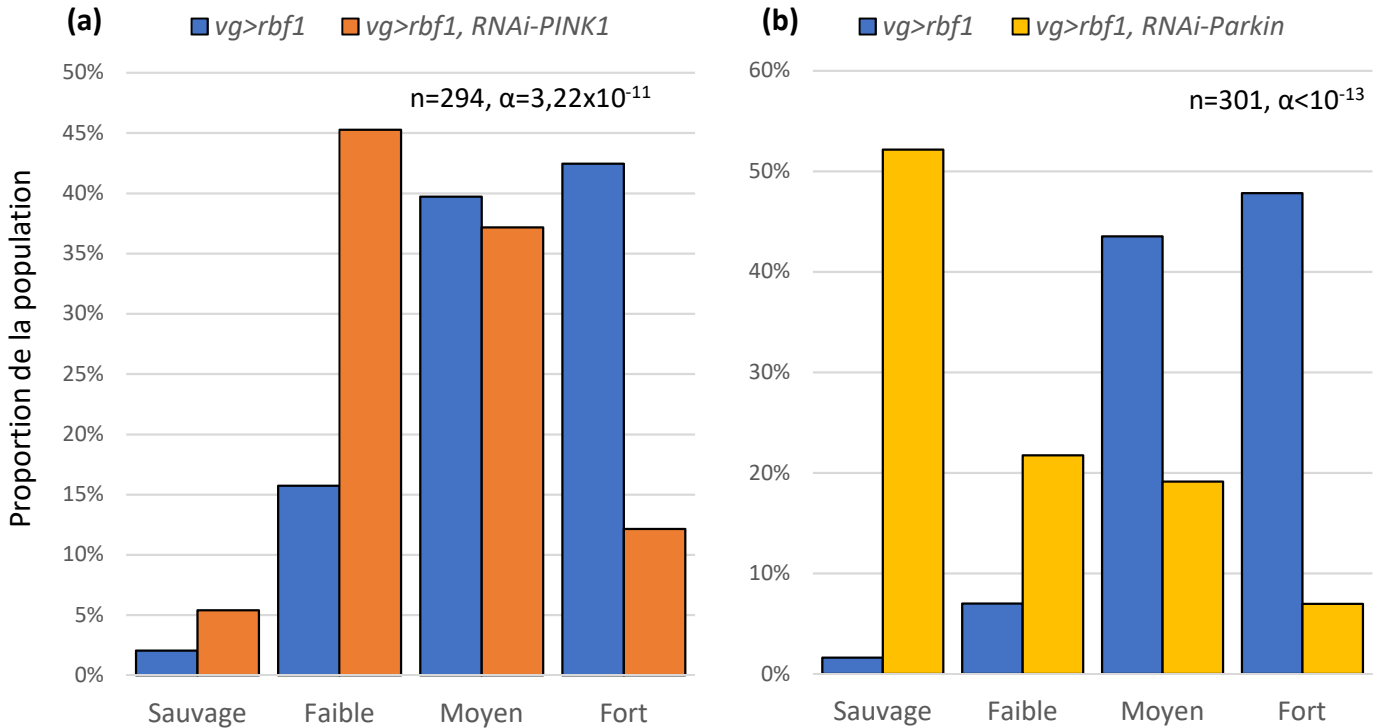


Figure 33. Une diminution du niveau de PINK1 ou de Parkin supprime le phénotype d'encoche dans l'aile induit par Rbf1

(a) L'histogramme présente le pourcentage d'aile obtenu pour chaque génotype étudié ($\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}$ ($vg>rbf1$) et $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{UAS-ARNi-PINK1}$ ($vg>rbf1, RNAi-PINK1$)). L'expression d'un *RNAi-PINK1* (JF01203 TRIP) sous contrôle de l'inducteur *vg-Gal4* en contexte de surexpression de *rbf1* induit un décalage de la répartition des phénotypes induits par *rbf1* vers les phénotypes « faible » et « moyen ». Un test statistique de Wilcoxon a permis de vérifier la significativité de ce décalage avec un $\alpha = 3,22 \times 10^{-11}$ (N=294).

(b) Une expérience identique a été menée avec les génotypes $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}$ ($vg>rbf1$) et $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{UAS-ARNi-Parkin}$ ($vg>rbf1, RNAi Parkin$) exprimant un ARNi dirigé contre *Parkin* (JF01200 TRIP). On y observe un décalage vers les phénotypes « sauvage » et « faible ». Un test statistique de Wilcoxon a permis de vérifier la significativité de ce décalage avec un $\alpha < 10^{-13}$ (N=301).

négatif *vg>GFP* et le témoin positif *vg>rbf1* est bien significative ($p < 0,01$). Il en va de même pour la diminution observée entre ce dernier et la condition testée *vg>rbf1, ARNi-MARF*. Cet effet n'est pas dû à un effet propre de l'*ARNi-MARF* puisqu'il n'est pas observé de différence entre les disques imaginaux aux génotypes *vg>GFP* et *vg>GFP, ARNi-MARF*.

Ces résultats révèlent donc que MARF est impliqué dans l'apoptose induite par Rbf1. Ce résultat est cohérent avec la suppression des phénotypes d'aile induits par Rbf1 que nous avons observé en présence d'un *ARNi-MARF*. Alors qu'une augmentation de la fission mitochondriale est observée dans l'apoptose induite par Rbf1, l'absence de MARF, une protéine pro-fusion, n'a pas un effet aggravateur mais un effet suppresseur, ce qui était innatendu. Le rôle de MARF dans l'apoptose induite par Rbf1 pourrait être lié à une autre activité de MARF indépendante de sa fonction d'activateur de la fusion membranaire mitochondriale. Une autre de ces activités est de recruter l'ubiquitine-ligase Parkin, suite à sa phosphorylation par PINK1 lors d'une chute de potentiel mitochondrial. Ces 3 protéines sont impliquées dans le processus de mitophagie que nous avons donc voulu tester dans la suite de mon étude.

c. PINK1 et Parkin sont impliquées dans phénotype d'aile induit par Rbf1

Afin de déterminer s'il existe un lien entre l'apoptose induite par Rbf1 et la mitophagie, nous avons fait des tests d'interaction génétique similaires à ceux utilisés pour étudier l'interaction génétique entre *MARF* et *rbf1*, à l'aide de lignées d'ARNi inductibles ciblant cette fois les ARNm *PINK1* et *Parkin*.

Nous avons utilisé la lignée « BL 31262 » de génotype $\frac{+}{+}; \frac{UAS-RNAi-PINK1}{UAS-RNAi-PINK1}$, permettant l'expression d'un ARNi dirigé contre *PINK1* sous le contrôle de séquences promotrices *UAS*. Les résultats de ce test génétique sont présentés en figure 33a. La répartition des phénotypes d'aile est centrée sur les classes moyen et fort pour ce qui est du témoin positif surexprimant *rbf1*. L'expression d'un *ARNi-PINK1* en présence d'une surexpression de *rbf1* induit un décalage de répartition des phénotypes vers la classe de phénotype faible. Un test statistique de Wilcoxon confirme que ce décalage est significatif avec un $\alpha = 3,22 \times 10^{-11}$ (N=294).

Afin de tester l'implication de l'ubiquitine ligase Parkin, centrale dans le processus de mitophagie, nous avons utilisé la lignée « JF01200 TRIP » de génotype $\frac{+}{+}; \frac{UAS-ARNi-Parkin}{UAS-ARNi-Parkin}$.

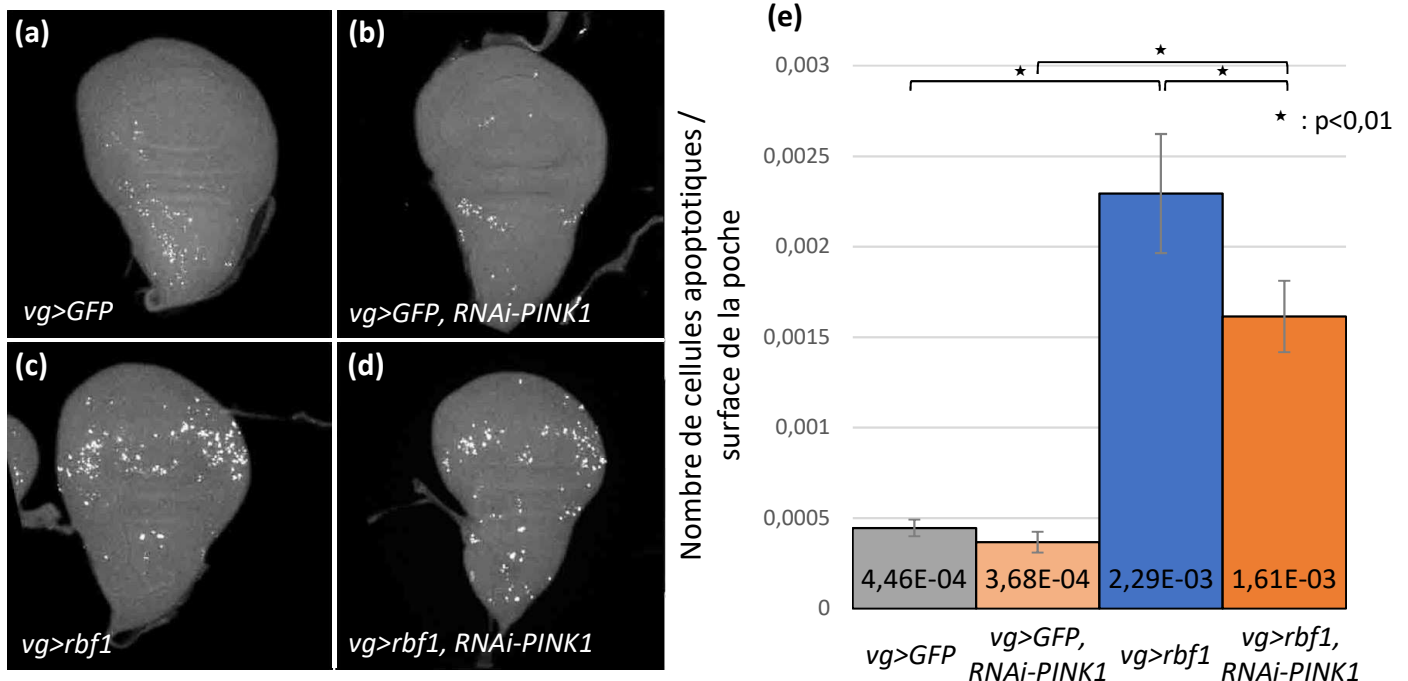


Figure 34. Une diminution du niveau de PINK1 inhibe l'apoptose induite par Rbf1

(a,b,c,d) Marquage TUNEL sur disques imaginaux d'ailes d'ailes issus des lignées $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{+}$ (*vg>GFP*), $\frac{vg-Ga}{+}; \frac{UAS-GFP}{UAS-ARNi-PINK1}$ (*vg>GFP, RNAi-PINK1*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{+}$ (*vg>rbf1*) et $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-rbf1}{UAS-ARNi-PINK1}$ (*vg>rbf1, RNAi-PINK1*). **(a)** Le génotype de contrôle négatif *vg>GFP* présente une apoptose basale, notamment au niveau du notum. **(b)** L'expression d'un ARNi dirigé contre *PINK1* (*vg>GFP, RNAi-PINK1*) n'entraîne pas d'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. **(c)** La surexpression de *rbf1* (*vg>rbf1*) conduit à une apoptose importante au niveau de la poche. **(d)** La co-expression de *rbf1* et du *RNAi-PINK1* (*vg>rbf1, RNAi-PINK1*) restreint l'apoptose à son niveau basal.

(e) Quantification des marquages TUNEL. L'histogramme présente les moyennes du nombre de cellules apoptotiques dans la poche rapportée à la surface de la poche (en unité arbitraire (UA)) pour 30 disques imaginaux d'aile par génotype. L'expression d'un ARNi dirigé contre *PINK1* n'induit pas d'augmentation de l'apoptose par rapport au contrôle négatif. Comme observé précédemment la surexpression de *rbf1* induit une forte augmentation de l'apoptose dans la poche. La co-expression de ces 2 transgènes conduit à une augmentation de l'apoptose par rapport à l'expression de l'*UAS-ARNi-PINK1* seul mais à une diminution par rapport à l'expression de l'*UAS-rbf1* seul. Les tests statistiques de Student menés entre les génotypes comparables confirment que ces différences sont bien significatives avec un p-value < 0,01 (*).

Elle exprime un ARNi dirigé contre *Parkin* sous contrôle de séquences promotrices UAS. L'effet de la diminution de la quantité de Parkin est testé dans un contexte d'apoptose induite par Rbf1 dans le domaine Vestigial. Le phénotype d'aile adulte dans ce contexte est étudié avec (*Vg>Rbf1*, RNAi-*Parkin*) ou sans RNAi-*Parkin* (*Vg>Rbf1*) (figure 33b). L'expression du ARNi-*Parkin* en présence d'une surexpression de *rbf1* décale le phénotype d'ailes encochées vers la classe phénotypique sauvage. Un test statistique de Wilcoxon indique que ce décalage est significatif avec un $\alpha < 10^{-13}$ (N=301). Ces résultats ont été reproduits au moins 2 fois, d'autres lignées exprimant des ARNi dirigés contre *PINK1* et *Parkin* ainsi qu'un mutant de *PINK1* ont été testées. Ces expériences confirment la suppression des phénotypes induits par Rbf1 en présence d'une baisse du niveau de PINK1 ou Parkin et sont résumées dans le tableau 1.

Il apparaît donc qu'une diminution de la quantité des ARNm de *PINK1* ou de *Parkin* donc probablement de leur protéine diminue les phénotypes d'encoche dans l'aile induits par Rbf1. Pink1 et Parkin seraient donc impliquées dans le phénotype de mort induit par Rbf1 dans le domaine vestigial du disque d'aile.

d. PINK1 et Parkin sont nécessaires à l'apoptose induite par Rbf1

Nous avons cherché à déterminer si la suppression phénotypique observée en présence d'ARNi-*PINK1* et d'ARNi-*Parkin* était associée à une diminution du nombre de cellules apoptotiques induit par la surexpression de *rbf1* au cours du développement. Un marquage TUNEL a donc été effectué sur des disques imaginaux obtenus à partir des différents croisements permettant de tester l'interaction entre *rbf1* et *PINK1* ou *Parkin*. Le marquage TUNEL des disques d'ailes *vg>GFP* (Figure 34a) présente une apoptose développementale basale, plus particulièrement au niveau du notum. L'expression seule d'un ARNi dirigé contre l'ARNm PINK1 dans le domaine vestigial (Figure 34b) n'induit pas d'augmentation de l'apoptose. A l'inverse, la surexpression de *rbf1* dans le domaine vestigial (Figure 34c) entraîne une forte augmentation de l'apoptose dans le domaine d'expression de ce gène. On observe une quantité de cellules apoptotiques intermédiaire en présence d'une co-expression de *rbf1* et d'un ARNi-*PINK1* (Figure 34d), Pink1 serait donc impliqué dans la voie apoptotique induite par Rbf1 dans ce domaine du disque d'aile.

Afin de confirmer ces observations, le marquage des disques imaginaux a été quantifié de manière systématique au niveau de la poche du disque imaginal. Comme expliqué

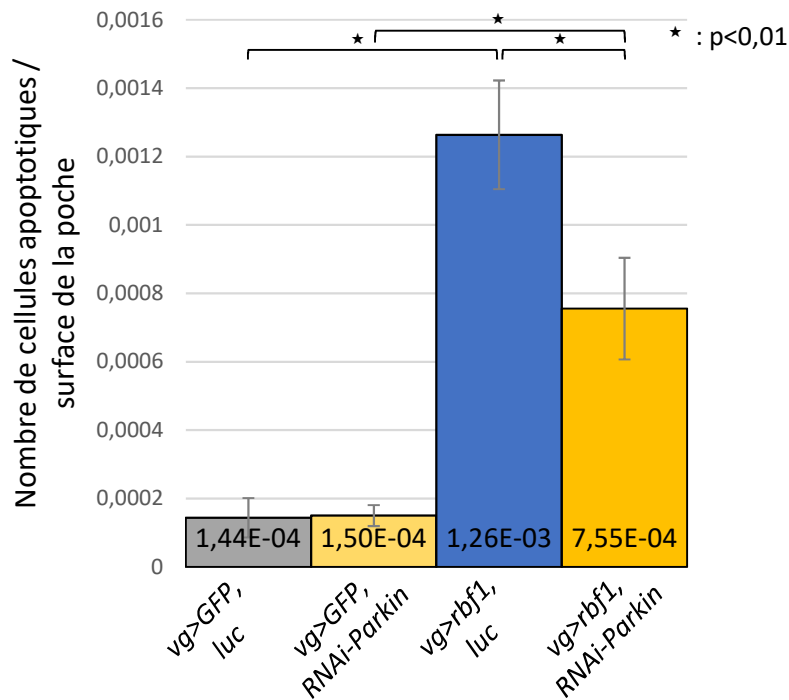


Figure 35. La diminution du niveau de Parkin inhibe l'apoptose induite par Rbf1

Quantification des marquages TUNEL. L'histogramme présente les moyennes du nombre de cellules apoptotiques dans la poche rapportée à la surface de la poche (en unité arbitraire (UA)) pour 30 disques imaginaux d'aile des génotype $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{UAS-Luciferase}$ (*vg>GFP, luc*), $\frac{vg-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{UAS-RNAi-Parkin}$ (*vg>GFP, RNAi-Parkin*), $\frac{vg-Ga}{+}; \frac{UAS-rbf1}{UAS-Luciferase}$ (*vg>rbf1, luc*) et $\frac{vg-Ga}{+}; \frac{UAS-rbf1}{UAS-RNAi-Par}$ (*vg>rbf1, RNAi-Parkin*). Un ARNi dirigé contre *Parkin* sous contrôle de l'inducteur *vg-Gal4* a été induit en condition contrôle ou de surexpression de *rbf1*. Il n'y a pas de différence entre la condition contrôle (*vg>GFP, luc*) et la condition d'expression du *RNAi-Parkin* dans le même contexte génétique (*vg>GFP, RNAi-Parkin*). Nous observons une augmentation de ce rapport en condition surexpression de *rbf1* (*vg>rbf1, luc*). L'expression d'un ARNi dirigé contre *Parkin* dans ce contexte induit une diminution de ce rapport (*vg>rbf1, RNAi-Parkin*). Des tests statistiques de Student vérifie que ces différences sont significatives avec une p-value < 0,01 (*). Donnée le génotype

précédemment, ces quantifications ont été rapportées à la surface de la poche (Figure 32). Les moyennes des rapports obtenus pour chaque génotype ont été comparées entre elles (Figure 34e). Les rapports sont de $4,46 \times 10^{-4}$ pour *vg>GFP*, $3,68 \times 10^{-4}$ pour *vg>GFP, RNAi-PINK1*, $2,29 \times 10^{-3}$ pour *vg>rbf1* et $1,61 \times 10^{-3}$ pour *vg>rbf1, RNAi-PINK1*. Un test Student a été utilisé pour confirmer la significativité des différences observées. Une étoile indique les p-value inférieures à 0,01.

Une étude reprenant le même schéma a été menée pour tester l'interaction entre les gènes *rbf1* et *Parkin* dans l'apoptose induite par Rbf1. Les moyennes du nombre de cellules apoptotiques dans la poche du disque d'aile rapporté à la taille du disque sont comparées entre elles (Figure 35). La valeur moyenne pour le contrôle négatif (*vg>GFP, luc*) est de $1,44 \times 10^{-4}$. Cette valeur est très proche pour *vg>GFP, RNAi-Parkin* avec $1,50 \times 10^{-4}$. Elle est fortement augmentée lorsque *rbf1* est surexprimé dans les individus témoins (*vg>rbf1, luc*) : $1,26 \times 10^{-3}$. En revanche, la co-expression de *rbf1* avec l'*ARNi-Parkin* induit un phénotype intermédiaire de valeur de $7,55 \times 10^{-4}$. Des tests de Student confirment que les différences observées sont significatives avec des valeurs de p inférieur à 0,01 comme indiqué sur la figure 35.

Conformément aux observations précédentes, l'expression de *rbf1* dans le domaine vestigial induit bien de l'apoptose dans ce domaine. Alors que l'expression d'un *ARNi-PINK1* ou d'un *ARNi-Parkin* seul n'entraîne pas d'augmentation de l'apoptose par rapport au témoin négatif (respectivement *vg>GFP* et *vg>GFP, luc*), on constate une diminution de l'apoptose induite par Rbf1 lorsque cette expression est opérée dans un contexte de surexpression de *rbf1*. Ces observations indiquent qu'une diminution du niveau de PINK1 ou Parkin inhibe partiellement l'apoptose induite par *rbf1*. Ces deux protéines pourraient donc participer activement à la mort cellulaire initiée par Rbf1. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'au cours du processus d'apoptose induit par Rbf1, l'interaction de Debcl avec Drp1 au niveau de la membrane externe mitochondriale est nécessaire pour induire de la fission mitochondriale et la production d'EAO. Nous avons donc, dans un second temps, cherché si l'action de PINK1 se situe en aval ou en amont de Debcl dans la voie d'induction de l'apoptose par Rbf1.

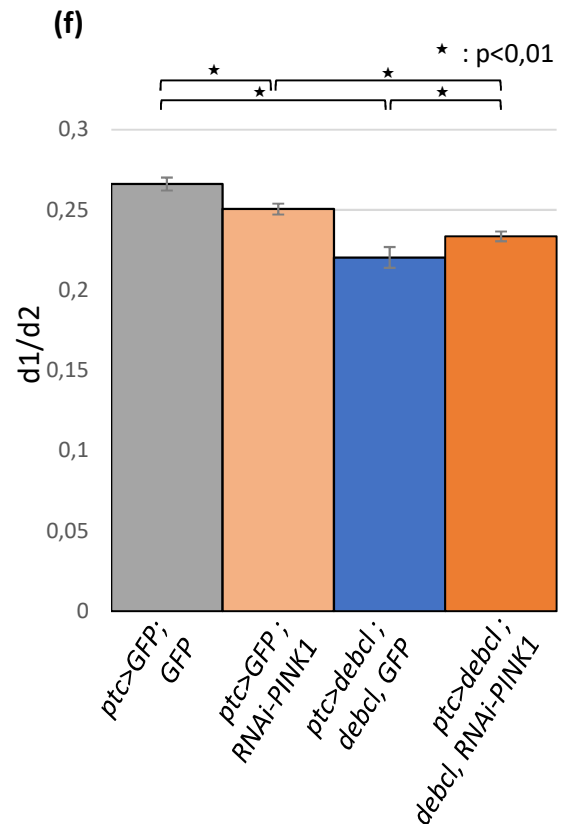
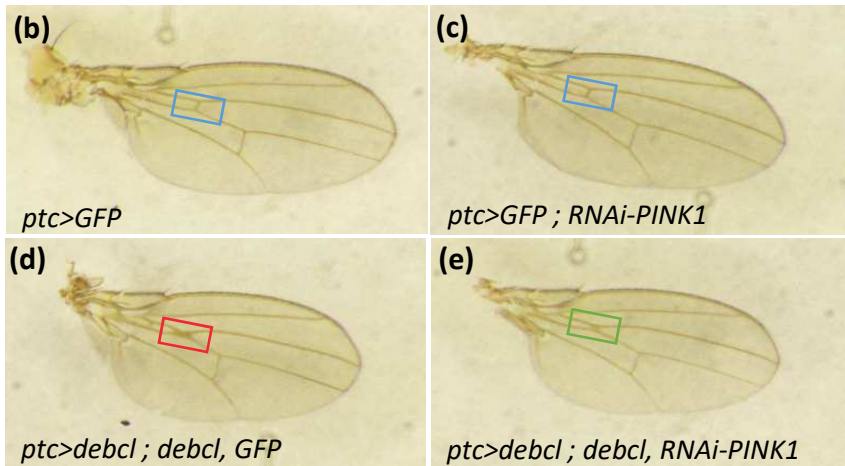
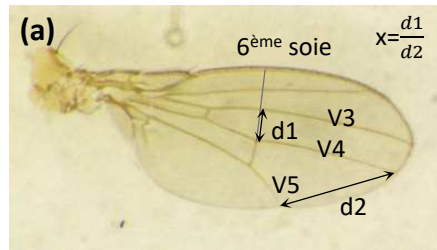


Figure 36. PINK1 intervient en aval de Debcl dans l'apoptose induite par *rbf1*.

(a,b,c,d,e) Ailes adultes de drosophiles issus des lignées aux génotypes $\frac{ptc-Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP}{+}$ (*ptc>GFP ; GFP*), $\frac{ptc-Gal4}{+}; \frac{UAS-RNAi-PINK1}{+}$ (*ptc>GFP, RNAi-PINK1*), $\frac{ptc-Gal4,UAS-Debcl}{+}; \frac{UAS-Debcl}{+}$ (*ptc>debcl ; debcl, GFP*) et $\frac{ptc-Gal4,UAS-Debcl}{+}; \frac{UAS-Debcl}{UAS-RNAi-PINK1}$ (*ptc>debcl ; debcl, RNAi-PINK1*)

(a) Le domaine Patched (*ptc*) correspond à la région située entre les veines 3 et 4 (notées respectivement V3 et V4). La distance **d1** est calculé entre les veines 3 et 4 au niveau de la 6^{ème} soie de la bordure antérieure de l'aile et de la cross-veine postérieure. Afin de s'affranchir d'effets de l'environnement pouvant affecter la croissance générale des individus, cette distance est rapportée à la distance **d2** située entre les extrémités des veines 4 et 5 (V5). **(b)** L'expression de *GFP* seule dans le domaine *ptc* n'induit pas de phénotype différent de celui du témoin sauvage notamment au niveau de la cross-veine antérieure (rectangle bleu). **(c)** De même, la cross-veine antérieure n'est pas affectée par l'expression d'un ARNi dirigé contre *PINK1* dans le domaine *ptc* (rectangle bleu). **(d)** L'expression de deux copies supplémentaires de *debcl* par le promoteur *ptc* induit un phénotype fort de fusion des V3 et V4 au niveau de la cross-veine qui disparaît (rectangle rouge). De plus on observe une diminution de la distance entre V3 et V4 **(e)** L'expression d'un ARNi dirigé contre *PINK1* dans un contexte de surexpression de *debcl* induit un phénotype de fusion des V3 et V4 moins fort que pour les individus surexprimant *debcl* (rectangle vert). La distance entre V3 et V4 semble être intermédiaire par rapport aux génotypes observés en (c) et (d).

(f) Comparaison des distances entre V3 et V4 (*d1*) rapportées à la distance entre V4 et V5 (*d2*). La moyenne de la distance entre les V3 et V4 est bien significativement diminuée en cas de surexpression de *debcl*. Cette diminution est partiellement supprimée en présence d'un ARNi dirigé contre *PINK1*. Des tests statistiques de Student confirment que ces différences sont bien significatives avec un p-value < 0,01 (*).

e. PINK1 agit en aval de Debcl dans l'apoptose induite par Rbf1

Le rôle de Debcl est central dans les évènements mitochondriaux induits par Rbf1. Une surexpression de *debcl* induit de l'apoptose et récapitule les évènements mitochondriaux induits par Rbf1. Afin de rechercher si PINK1 pouvait avoir une action sur ou en aval de Debcl, nous avons testé si une modification du niveau de PINK1 modulait les phénotypes induits par la surexpression de *debcl*.

Nous disposons au laboratoire d'une souche transgénique permettant la surexpression de deux copies de *debcl* placées sous contrôle de séquences UAS. L'expression des transgènes *UAS-debcl* est induite par l'inducteur *patched-Gal4* (*ptc-Gal4*). L'inducteur *ptc-Gal4* s'exprime au niveau de la frontière antéro-postérieure du disque imaginal d'aile. L'expression de *debcl* dans ce contexte conduit à une augmentation de l'apoptose au niveau de la frontière antéro-postérieure du disque imaginal d'aile au cours du développement. Cette apoptose se traduit chez l'adulte par une diminution de la distance entre les veines 3 et 4 et une fusion de ces deux veines au niveau de la veine transversale antérieure qui disparaît (Figure 36d). Ce phénotype présente l'avantage d'être observable facilement et de varier très peu d'un individu à l'autre. Nous avons testé l'effet d'une diminution du niveau de PINK1 sur ce phénotype à l'aide de l'expression d'un *ARNi* dirigé contre *PINK1*.

Une aile représentative de chaque génotype est présentée en figures 36b-e. La surexpression du gène *GFP* (Figure 36b) sous contrôle de *ptc-Gal4* n'induit pas de phénotype. Nous pouvons observer la présence de la veine transversale antérieure dans le rectangle bleu. L'expression de l'*ARNi* dirigé contre *PINK1* dans le domaine *patched* (Figure 36c) n'induit pas de différence marquante par rapport au témoin *ptc>GFP; GFP*. La veine transversale antérieure est conservée (rectangle bleu). L'expression de deux copies supplémentaires de *debcl* sous contrôle du pilote *ptc-Gal4* (Figure 36d) semble induire la fusion de celles-ci au niveau de la veine transversale antérieure (rectangle rouge). La co-expression de l'*ARNi-PINK1* dans ce contexte (Figure 36e) supprime partiellement le phénotype de fusion des veines 3 et 4 au niveau de la veine transversale antérieure (rectangle vert) induit par l'expression de *debcl*.

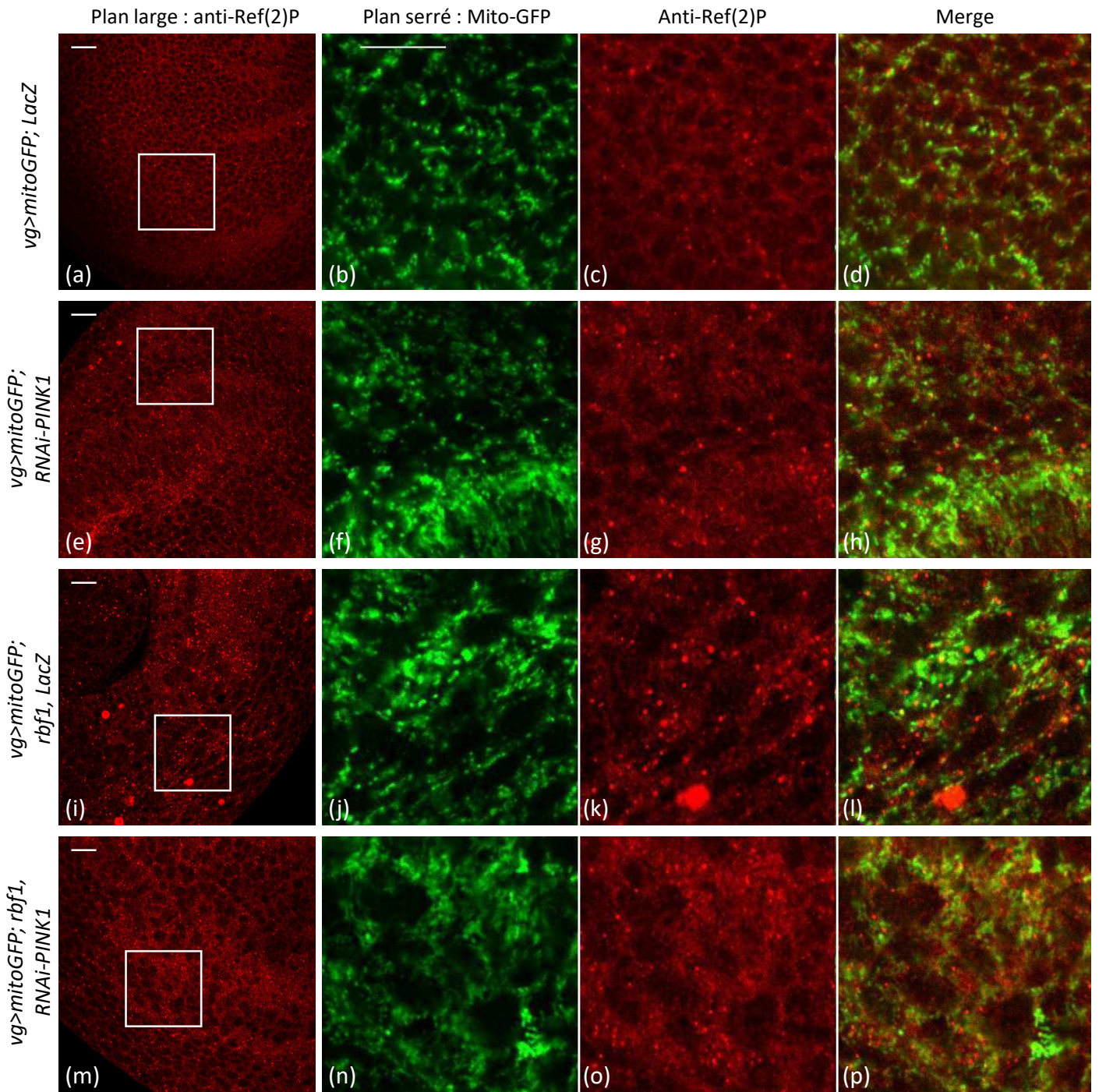


Figure 37. L'absence de PINK1 n'induit pas de perte massive de la colocalisation entre Mito-GFP et Ref(2)P

Images de microscopie confocale montrant la GFP en vert et l'immunomarquage de Ref(2)P en rouge. Ref(2)P (aussi appelée p62) est une protéine impliquée dans la formation de corps autophagiques et mitophagiques. Sa colocalisation avec des éléments mitochondriaux est souvent synonyme de mitophagie.

(a,e,i,m) Plan large d'un point focus d'un disque imaginal d'aile au niveau du bord antérieur de la poche dans le domaine *vg* prise à 63X. Le carré blanc correspond aux champs zoomés dans le panel de droite.

(b,c,d,f,g,h,j,k,l,n,o,p) Zoom 214,2X des images correspondantes aux carrés blancs du panel de gauche. Les barres blanches correspondent à 10µm.

Une étude quantitative complète de ces observations a été réalisée. La distance entre les veines 3 et 4 (d1 dans la Figure 36a) est calculée de manière standardisée. Elle est mesurée sur une droite passant par, le point de croisement entre la veine transversale postérieure et la veine 4, et la 6eme soie observable au niveau de la marge antérieure de l'aile (voir figure 36a). Afin de normaliser cette distance entre les différentes ailes, elle est rapportée à une valeur interne à l'aile mais extérieure au domaine d'expression de *ptc* : la distance entre les extrémités des veines 4 et 5 (d2 dans la Figure 36a). Les moyennes de ces rapports sont comparées pour les différents génotypes (Figure 36f) et des tests de Student sont effectués sur ces données. On peut observer, de manière significative avec une valeur de *p* inférieure à 0,01, une diminution du rapport d1/d2 en présence d'une surexpression de *debcl* et celle-ci est partiellement supprimée en contexte d'une co-expression d'*ARNi-PINK1*. Donc, la co-expression de *debcl* et de l'*ARNi-PINK1* n'a pas d'effet additif et induit un phénotype intermédiaire.

Ces résultats indiquent qu'en cas de forte diminution du niveau de PINK1, l'apoptose induite par *Debcl* est partiellement inhibée. Si l'on considère que les événements induits par la surexpression de *debcl* récapitulent les événements mitochondriaux induits par *Rbf1*, on peut supposer que PINK1 agit en aval de *Debcl* dans la voie d'apoptose induite par *Rbf1*. Si tel est le cas, on pourrait prêter un rôle pro-apoptotique à PINK1 et ses partenaires, Parkin et MARF pourraient participer à ces activités. Les protéines PINK1, Parkin et MARF sont bien connu pour leur capacité à induire la mitophagie. Ces protéines étant connues pour leurs rôles centraux dans la mitophagie, elles amènent, avec leur implication, un questionnement sur le lien entre la voie d'apoptose déclenchée par *Rbf1* et ce processus. Nous avons donc recherché si la surexpression de *rbf1* était associée à une augmentation de mitophagie en présence ou en absence de PINK1.

f. Recherche d'évènements de mitophagie induit par *Rbf1*

Afin de mettre en évidence la mitophagie, la technique la plus communément utilisée consiste à observer la colocalisation de facteurs mitochondriaux et autophagiques. Pour cela, nous avons établi à une lignée possédant à la fois le transgène *UAS-rbf1* sur le Chromosome III et un transgène inductible codant une protéine GFP associée à une séquence d'adressage à la matrice mitochondriale (*UAS-mitoGFP*) sur le chromosome II. Afin de marquer les

Information sur les lignées				interaction génétique avec <i>vg-Gal4, UAS-rbf1</i>								
Gène	Nom de lignée	identification dans la banque de provenance	Nature de la modification	Expérience 1			Expérience 2			Expérience 3		
				effet	Résultat test de Wilcoxon	N	effet	Résultat test de Wilcoxon	N	effet	Résultat test de Wilcoxon	N
MARF	JF01650 TRIP	BL 31157	RNAi	↘	1,00E-30	379	↘	2,50E-07	356	↘	1,14E-11	439
	KK105681	V105261	RNAi	↘	7,50E-06	394	→	3,40E-02	403	→	2,30E-01	276
PINK1	JF01200 TRIP	BL 31170	RNAi	↘	1,00E-30	385	↘	1,00E-30	521	↘	1,02E-14	391
	JF01203 TRIP	BL 31262	RNAi	↘	1,00E-30	552	↘	1,32E-09	626	↘	3,23E-11	294
	HMS01707	BL 38262	RNAi	↘	3,29E-12	123	↘	3,60E-05	154	↘	5,30E-07	132
	HMS02204 TRIP	BL 41671	RNAi	→	1,00E-02	268	→	1,62E-05	325			
	KK101205	v109614	RNAi	→	1,80E-01	297						
	Pink1 ⁸⁹	BL34749	perte de fonction	↘ Mâles	6,99E-03	155						
	UAS-Pink1	BL51648	expression sous contrôle UAS	→	0,24	255						
Parkin	JF01200 TRIP	BL31259	RNAi	↘	1,00E-30	451	↘	1,00E-30	301	↘	1,00E-30	358
	HMS01651 TRIP	BL37509	RNAi	→	1,90E-01	304	→	2,40E-01	421	→	5,00E-02	373
	KK107919	v104363	RNAi	→	6,20E-02	295	→	1,30E-02	358	→	2,10E-01	298
	GD5543	v47636	RNAi	↘	1,81E-06	394	↘	2,40E-08	426	↘	1,09E-14	389
	UAS-park FLAG	BL 34746	expression sous contrôle UAS	→	1,90E-01	378						

Tableau 1. Récapitulatif des tests d'interaction génétique effectués entre *rbf1* et MARF, PINK et Parkin.

L'ensemble des tests d'interaction génétique concernant PINK1, Parkin et MARF sont résumés dans ce tableau. Les résultats présentés dans les **Figure 30** et **32** sont indiqués en couleur. La lignée *w¹¹¹⁸* est utilisée comme témoin sauf pour les lignées KK105681, KK101205 et KK107919 qui ont été testées par rapport la souche témoin KK, de même fond génétique.

événements d'autophagie, un anticorps anti-Ref(2)P permet de localiser cette protéine, homologue de p62 chez l'humain, qui est responsable de la sélection des éléments subissant l'autophagie.

Pour le témoin (Figure 37a et c), l'anticorps anti-Ref(2)P présente un marquage principalement diffus et cytosolique bien qu'on puisse observer quelques points de fluorescence plus intenses, qui pourrait correspondre à un niveau basal d'autophagie. La GFP (Figure 37b) présente une localisation plutôt ponctiforme et filamenteuse. Ces formes sont à attribuer à l'orientation du réseau mitochondrial par rapport au plan d'acquisition de la coupe optique correspondant à des coupes transversales ou sagittales. La superposition des deux marquages (Figure 37d) ne révèle que peu de colocalisation, notamment au niveau des points plus fortement marqués avec l'anti-Ref(2)P. L'expression d'un *RNAi-PINK1* dans le domaine vestigial augmente le marquage ponctiforme avec l'anti-Ref(2)P dans ce domaine (Figure 37e et g). Le marquage GFP (Figure 37f) ne semble pas fortement affectée. La superposition des marquages (Figure 37h) révèle quelques points de couleur jaune, indiquant une colocalisation, mais ceux-ci restent peu nombreux par rapport à l'ensemble du marquage ponctiforme correspondant à Ref(2)P. Pour sa part, la surexpression de *rbf1* entraîne un changement notable pour l'anti-Ref(2)P (Figure 37i et k). On remarque sur le plan large, la formation de points de grande taille s'ajoutant au marquage ponctiforme important. La taille de ces points est proche de la taille d'une cellule. La GFP présente un marquage proche de celui du témoin (Figure 37j) tandis que la superposition des marquages (Figure 37l) révèle quelques points de colocalisation jaune mais aucun au niveau des points de grande taille marqués à l'anti-Ref(2)P. Enfin, la co-expression de *rbf1* et d'un *ARNi-PINK1* induit un marquage de Ref(2)P ponctiforme comparable à celui observé pour le génotype *vg>mitoGFP; RNAi-PINK1* mais sans les points les plus gros observés quand *rbf1* seul est surexprimé (Figure 37m et o). La localisation de la GFP est moins net que dans le témoin bien que l'aspect filamenteux soit conservé (Figure 37n). La superposition des marquages (Figure 37p) révèle peu de colocalisation.

Les résultats présentés ici ne permettent pas de mettre en évidence une colocalisation de marqueurs de la mitochondrie et de l'autophagie sauf, dans une moindre mesure lorsque *rbf1* est surexprimé seul. Cependant, la différence importante de marquage de Ref(2)P observée dans le cas d'une surexpression de *rbf1* incite à penser que des événements autophagiques pourraient être induits et que Pink1 serait impliqué dans ce phénomène. Toutefois ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés avant d'établir des conclusions.

4. Conclusion sur les évènements mitochondriaux impliqués dans l'apoptose induite par Rbf1

L'ensemble des résultats présentés dans cette première partie de mes résultats permettent d'avancer sur la compréhension des évènements mitochondriaux nécessaires à l'apoptose induite par Rbf1. En effet, nous avons pu démontrer que l'inhibition transcriptionnelle de *buffy* induite par Rbf1 confère à Debcl son activité pro-apoptotique. Ainsi, à la mitochondrie, Debcl recrute Drp1 qui, probablement en s'oligomérisant, va induire de la fission mitochondriale nécessaire à la transmission du signal de mort cellulaire. L'activation de Debcl et Drp1 conduit à une accumulation d'EAO mitochondriaux qui est nécessaires à l'apoptose. Les résultats complémentaires que j'ai pu obtenir montre que la protéine MARF, qui est connu pour son implication dans la fusion mitochondriale, n'a pas ici un rôle antagoniste à Drp1 et semble même jouer un rôle positif dans l'apoptose induite par Rbf1. Ce rôle pourrait être associé à son implication dans le recrutement des protéines responsables de la mitophagie, PINK1 et Parkin. Mes résultats indiquent que celle-ci sont aussi nécessaires au déclenchement de l'apoptose induite par Rbf1. PINK1 étant par ailleurs également nécessaire à l'apoptose induite par Debcl (indépendamment d'une surexpression de Rbf1), PINK semble intervenir en aval de Debcl. Il n'a pour le moment pas été possible de mettre en évidence de façon clair des évènements de mitophagie dans les cellules surexprimant Rbf1 et d'en établir le lien avec PINK, MARF et Parkin.

B. Liens entre l'apoptose induite par Rbf1 et la traduction

1. Contexte scientifique

La régulation de la traduction est un mécanisme important, notamment dans la formation des cancers. On peut aussi observer que l'apoptose est associée à une diminution importante de la synthèse protéique globale dans de nombreux types cellulaires. Ce contrôle implique la régulation des facteurs d'initiation de la traduction (Morley, 2001; Liwak, Faye and Holcik, 2012). Chez la drosophile, les gènes inhibiteurs des IAPs que sont *rpr* et *grim* entraînent une suppression généralisée de la traduction. Cette suppression est en partie responsable de la diminution de la quantité de dIAP1 (une protéine à vie courte) par rapport aux autres

protéines, dont les caspases, permettant ainsi une levée de l'inhibition de ces dernières et le déclenchement de l'apoptose (Yoo *et al.*, 2002; Colón-Ramos *et al.*, 2006). Une autre protéine associée à la suppression tumorale, Pcd4 (Programme Cell Death 4), contrôle à la fois l'apoptose et la traduction. Pcd4 est capable de se lier aux ARNm. Cette capacité lui permet de supprimer la traduction d'ARNm spécifiques comme *c-myb* (Singh *et al.*, 2011) en interagissant avec la poly(A)-binding protein (PABP) (Fehler *et al.*, 2014). PABP est une protéine conservée entre la drosophile (dPABP) et l'homme. Elle est fortement impliquée dans la traduction et dans la stabilité des ARNm (Smith, Blee and Gray, 2014). Le rôle de dPABP est pour le moment associé : (a) à la régulation positive de la traduction à la fois globale (Roy *et al.*, 2004) et spécifique d'ARNm tel que *msl2* (Duncan, Strein and Hentze, 2009) ; (b) à la déstabilisation d'ARNm spécifiques reconnus par des microARN (Huntzinger *et al.*, 2013) ; (c) à la suppression de la NMD (nonsense-mediated decay (NMD), un mécanisme de contrôle de la qualité des ARNm qui permet la dégradation d'ARNm présentant un codon stop prématuré pouvant mener à la production de protéines tronquées (Behm-Ansmant *et al.*, 2007). Nos résultats présentés ici mettent en évidence un lien potentiel entre l'apoptose induite par Rbf1 et dPABP.

2. La surexpression de PABP supprime le phénotype d'aile induit par Rbf1

a. Résumé

Lors de l'étude des voies d'action de Rbf1 dans l'activation de l'apoptose pour les cellules en prolifération, des partenaires physiques ont été cherchés avec une approche par spectrométrie de masse. Menés par Angéline Moriéras au cours de sa thèse, ces travaux suggèrent l'existence d'une interaction physique potentielle entre Rbf1 et une protéine centrale de la transcription : dPABP (drosophila Poly-Adenylate Binding Protein). Bien que cette interaction physique n'ait pu être confirmée, l'étude des interactions génétiques entre *rbf1* et *dpabp* a abouti à des observations très étonnantes qui nous ont poussé à étudier davantage l'implication de PABP dans le processus d'apoptose induit par Rbf1 dans l'espoir de comprendre les événements impliqués.

Les premiers résultats, apportés par Angéline Moriéras, concernaient l'effet de la modulation d'activité de *dpabp* et de certains de ses partenaires de la machinerie traductionnelle sur le phénotype d'encoche induit par *rbf1*. J'ai complété ces résultats par une

approche au niveau cellulaire afin d'étudier l'effet de ces partenaires de dPABP sur l'apoptose induite par Rbf1. De façon très surprenante, *dpabp* ne supprime pas l'apoptose mais en induit par lui-même. De plus, l'apoptose induite par *dpabp* ne conduit à aucun phénotype. Ont alors été testées plusieurs hypothèses visant à comprendre les mécanismes qui permettent à dPABP de pallier cette forte mort développementale, pour aboutir à la formation d'ailes adultes sauvages ne présentant pas d'encoques. Nous avons recherché si la compensation des cellules éliminées impliquait :

(a) La prolifération des cellules voisines induite par les cellules apoptotiques. En effet, il est bien établi que les cellules apoptotiques peuvent induire la prolifération des cellules des cellules voisines (Perez-Garijo and Steller, 2015).

(b) L'induction d'un retard de développement permettant de compenser la perte cellulaire. Cet autre mécanisme compensatoire a été décrit au laboratoire en réponse à un stress du réticulum endoplasmique : l'augmentation du temps de développement qui permet la production d'un plus grand nombre de cellules (Demay *et al.*, 2014).

Les résultats sont présentés dans le manuscrit suivant mais ne permettent malheureusement pas de trancher sur le véritable processus déclenché par dPABP pour pallier la perte de tissu provoquée par l'apoptose (induite par lui-même par Rbf1).

b. Manuscrit

Overexpression of poly(A)-binding protein (PABP) can counteract loss of tissue resulting from Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*

Angéline Moriéras*, Vincent Ruby*, Christine Dupuy-Wintz, Jessie Colin, Bernard Mignotte, Aurore Rincheval# and Isabelle GuénaI#

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines/Université Paris-Saclay, Ecole Pratique des Hautes Etudes/PSL Research University, Montigny-le-Bretonneux, France.

*: These authors contributed equally to this work

#: Co-senior authors

Running Title: PABP antagonizes Rbf1-induced phenotype

Keywords: Retinoblastoma protein - Rbf1 - poly(A)-binding protein - Apoptosis - *Drosophila*

Corresponding Author: Isabelle GuénaI

Abstract

The retinoblastoma protein (pRb) plays important roles in the control of many cellular processes such as cell cycle and cell death. Consistent with its tumor suppressor role, pRb inhibits cell proliferation but its role in apoptosis is more complex, pRb being pro- or anti-apoptotic depending on the proliferative status of the cell. pRb and its *Drosophila* homolog (Rbf1) have been found to be pro-apoptotic in proliferative tissues. The overexpression of Rbf1 in the wing imaginal disc during the larval development results in an adult notched wings phenotype due to Rbf1-induced apoptosis. In this article, we show that this phenotype can be rescued by a mechanism that could be related to cap-dependent mRNA translation. This mechanism could involve a developmental delay and seems specific to Rbf1-induced apoptosis since it does not appear to rescue notched wings phenotype associated with *reaper*-induced apoptosis. It involves neither an inhibition of Rbf1-induced apoptosis nor an increase in the rate of apoptosis-induced proliferation. Our results suggest an important role of the poly(A)-binding protein (PABP) and the translation initiation factor eIF4F on tissue homeostasis upon pRb activation.

Introduction

The retinoblastoma protein (pRb) is inactivated in a wide variety of cancers [1]. It plays important roles in many processes implicated in cell fate decisions such as proliferation, apoptosis and differentiation. Consistent with its tumor suppressor role, pRb inhibits cell proliferation [2]. Contrary to this well characterized role in cell cycle regulation, its role in apoptosis remains poorly understood. Indeed, pRb has been found to be either pro- or anti-apoptotic[3,4,5,6,7,8]. Besides, the factors governing pRb functions in apoptosis remain unknown. Interestingly, pRb is stabilized in response to DNA damage [9]. Moreover,

pRb is required to upregulate some pro-apoptotic genes transcription and cell death after a genotoxic stress both *in vivo* and *in vitro* [4]. To further clarify how the cell status impacts the role of pRb toward apoptosis regulation, *Drosophila* has been used as a model organism. The overexpression of *rbf1*, the *Drosophila* homologue of pRb, induces apoptosis in proliferative tissues, whereas no cell death is triggered by *rbf1* expression in post-mitotic cells [10]. Therefore, overexpression of *rbf1* in *Drosophila* can mimic pRb stabilization in response to DNA damage [9] and be used to study its pro-apoptotic function. Thus, fly constitutes a good model organism to study pro-apoptotic properties of a pRb homolog *in vivo* in a simple genetic background.

We have previously shown that the Rbf1 pro-apoptotic activity depends on its ability to decrease the level of anti-apoptotic proteins such as DIAP1 and the Bcl-2 family protein Buffy [11]. We also showed that Debcl (the *Drosophila* Bcl-2 family pro-apoptotic member [12]) and the pro-fission protein Drp1 can interact and that Buffy inhibits this interaction. Debcl and Drp1 are necessary downstream of Buffy to trigger a mitochondrial fragmentation during Rbf1-induced apoptosis leading to reactive oxygen species production, which in turn activates a Jun Kinase pathway to trigger cell death [13,14].

Regulation of translation is critical for cellular transformation and oncogenesis. It is also known for years that induction of apoptosis is associated with substantial inhibition of protein synthesis in several cell types [15]. In *Drosophila*, the pro-apoptotic proteins Reaper (Rpr) and Grim promote a general suppression of protein translation [16,17,18]. PABP1 is a multifunctional RNA-binding protein which displays roles in global and mRNA-specific translation and stability (reviews: [19,20]). It is overproduced in preleukemic thymuses in mice and gastrointestinal tumors in human [21,22]. *Drosophila* genome encodes one PABP1 homologue, hereafter called PABP, whose molecular functions are incompletely

characterized (review: [20]). The *Drosophila* PABP, as other PABPs do, enhances translation (global and/or mRNA specific) and has also been described to be involved in miRNA-mediated regulation and mRNA surveillance. Interestingly, PABP appears to protect cells from death in SCA3 (Spinal Cerebellar Ataxia 3) or ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) *Drosophila* neurodegeneration models [23,24]. In this paper, we show that *Drosophila* PABP overexpression can specifically counteract adult notched wing phenotypes consecutive to Rbf1-induced apoptosis in wing discs. This activity of PABP is not related to an increase in apoptosis-induced proliferation or to cell death inhibition in the wing disc and could involve its binding partner eIF4F. Moreover, we show that PABP activity does not compensate a lack of translation in *rbf1* overexpressing cells. Interestingly, larvae co-expressing *rbf1* and *pAbp* in the wing imaginal discs show a developmental delay that could allow the replacement of apoptotic cells to maintain tissue homeostasis.

Materials and Methods

Fly stocks:

Flies were raised at 21°C or 25 °C on a standard medium. The UAS-*rbf1*, UAS-*rpr*, *vg-Gal4* and *en-Gal4* strains were previously described [11,13,14,25]. The origin of the strains used in table 1 are indicated in the table. The following other strains were obtained from the Bloomington Stock Center (Bloomington): *pAbpEP310* (17261), *pAbp-flag* (9420), UAS-*LacZ* (3956). The UAS-RNAi-*paip2* (*v106413-KK*) strains come from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC). In order to use control flies from the same genetic background, the UAS-*gfp* strain (BL35786) and the host line *y,w[1118];P{attP,y[+],w[3']}* (transformant ID 60100) were used as control for TRIP V10 collection and KK VDRC library respectively. We used a *w1118* fly stock as the reference for all other strain.

Test of phenotype suppression in the wing:

To test the implication of candidate genes in *rbf1*-induced phenotypes, the severity of the notched wing phenotype induced by UAS-*rbf1* overexpression led by *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds as previously described [10,11,13,14,26]. For each gene, we verified that the alteration of this gene expression level (overexpression, RNAi or mutant) did not induce any wing phenotype. *vg-Gal4>UAS-rbf1 Drosophila* females were crossed with males bearing a loss-of function mutation for the different genes or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing margin. Wilcoxon tests were performed as previously described [25]. We considered the difference significant when $\alpha < 10^{-3}$.

Labelling of newly synthesized proteins:

Newly synthesized protein were labeled using the click-iT[®] plus OPP protein synthesis assay kit (Molecular probes) according to manufacturer instructions. Briefly, L3 wandering larvae were dissected in Schneider media and wing imaginal discs were incubated in 200 μ L of 20 μ M click-iT[®] OPP reagent (component A) diluted in Schneider media for 30 minutes at room temperature. Reagent was removed and discs were washed in PBS before being fixed 20 minutes in 3.7% formaldehyde diluted in PBS and permeabilized overnight at 4°C in 0.5% Triton X-100 diluted in PBS. After PBS washing, discs were incubated in the reaction cocktail containing components B and D, reaction buffer and additive for 30 minutes at room temperature in the dark. Discs were washed with the rinse buffer (component F) then with PBS. Washed discs were incubated in 0.3% Triton X-100, 3% BSA diluted in PBS for 30 minutes at room temperature and then incubated for 2.5 hours at room temperature in the dark with the same solution supplemented with anti-GFP (1:400, Invitrogen, A11122) or anti-

RBF1 [11] to allow detection of the expression domain and with anti-DE-cadherin (1:400, clone DCAD2, concentrate from Developmental Studies Hybridoma Bank) to visualize all the wing disc cells . After washes with 0.5% Triton X-100 in PBS, discs were incubated overnight at 4°C with secondary antibodies: AlexaFluor 488-coupled anti-rabbit and AlexaFluor 568-coupled anti-rat (1:400, Invitrogen). Discs were washed in 0.5% Triton X-100 in PBS and finally mounted in AF1 Mountant Solution (citifluor). Images were acquired using a Leica SPE confocal microscope.

Measurement of developmental time between wandering third instar larvae and adult eclosion:

For all genotypes studied, egg laying was collected for 7 hours. Wandering third instar larvae were put individually in a 96 well plate containing fly nutritive medium and placed in an incubator at 25°C. A picture of the plate was taken each hour for 5 days allowing to determine the time required for adult eclosion. The average development time between the larval stage and the adult hatch was calculated from a minimum of 15 values. ANOVA and Student's t-tests were performed. Statistical differences compared to the control flies were considered as significant for $p < 5\%$.

Immunostaining and TUNEL staining of imaginal discs:

Third instar larvae were dissected in PBS pH 7.6, fixed in PBS-3.7% formaldehyde. Discs were labeled by incubation overnight at 4°C with anti-phospho-histone H3 (rabbit polyclonal antibody, 1/1000, 06-570, Millipore) in PBT-FCS (PBS, 0,3% Triton, 10% Fetal Calf Serum). Incubation with fluorescently labeled Alexa 488, 568 and 647 secondary antibodies (1/500, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) was carried in PBT-FCS for 2 h at room temperature. After washing in PBT, TUNEL staining was performed according to

manufacturer's instructions (ApopTag Red in situ apoptosis detection kit, Millipore). Wing discs were finally mounted in AF1 Mountant Solution (citifluor) and observed with a Leica SP8 confocal microscope. Quantification of TUNEL and PH3 staining was done in the wing pouch for at least 20 wing imaginal discs per genotype. Tukey's t-tests were performed and results were considered to be significant when $\alpha < 5\%$.

Results and Discussion

PABP antagonizes Rbf1-induced notched wing phenotype

To examine whether PABP can suppress phenotypes associated with Rbf1-induced cell death, we performed genetic interaction tests. As previously shown, Rbf1 overexpression at the dorso-ventral frontier of wing imaginal discs using the UAS-Gal4 system with the vestigial (*vg*) Gal4 driver induced notches along the wing margin [10]. The number of notches correlates with the amount of apoptosis in wing imaginal discs of third-instar larvae [10]. As previously described [10,11,13,14,26], wing phenotypes were classified into four categories according to the number of notches: wild type (no notch), weak, intermediate and strong (Fig. 1A). Overexpression of *pAbp-Flag* alone led to wild type wing phenotype (not shown). When *rbf1* and *pAbp* were co-overexpressed at 25°C, a significant shift of the distribution toward weaker phenotypes was observed as compared to overexpression of *rbf1* only (Fig. 1B) showing that *pAbp* could suppress *rbf1*-induced wing phenotype. We thus decided to increase PABP activity by other means. To this purpose, we used RNAi targeting the *paip2* gene, which encodes the PABP-binding protein PAIP2. PAIP2 binds to PABP thus precluding its interaction with other proteins. When *rbf1* was overexpressed and *paip2* simultaneously down regulated by RNAi, we again observed a significant shift of the distribution toward weaker wing phenotypes (Fig. 1C). To confirm the

antagonistic effect of PABP on notched wings phenotype induced by Rbf1, we overexpressed *rbf1* in various *pAbp* loss of function heterozygous background. To be able to observe an enhancement of the *rbf1*-induced wing phenotype, as the Gal4 system is sensitive to temperature, the experiment was set at 21°C to reduce the strength of the phenotype induced by *rbf1* expression alone. When *rbf1* was overexpressed in a *pAbp*^{EP310} loss of function heterozygous background, the distribution of the phenotypes significantly shifted toward stronger phenotypes as compared to expression of *rbf1* alone (Fig. 1D). Notched wings phenotypes were not observed in the simple heterozygous *pAbp* mutant flies. The same experiments were done using other *pAbp* mutants (*pAbp*^{k10109}, *pAbp*^{EY11561}) and gave equivalent results (data not shown). These results showed that PABP antagonizes the *rbf1*-induced notched wings phenotype. Furthermore, this effect is specific to *rbf1*-induced phenotype since the notched wings phenotypes induced by overexpression of the *Drosophila* apoptotic gene *rpr* [25] were not suppressed and even enhanced when *pAbp-flag* was co-overexpressed with *rpr* (Fig. 1E).

PABP suppresses wing phenotypes without antagonizing Rbf1-induced apoptosis and without increasing compensatory proliferation in the wing imaginal discs

To determine how *pAbp* can suppress *rbf1*-induced loss of tissue, we first studied whether *pAbp* can counteract *rbf1*-induced apoptosis. TUNEL staining quantification was performed on wing imaginal discs overexpressing *rbf1*, *pAbp-Flag* or both (Fig. 2 A-E). Surprisingly, we observed that overexpression of *pAbp-Flag* in the wing disc induces apoptosis of many cells (Fig. 2C). Quantification of TUNEL positive cells shows that the amount of apoptotic cells was similar to the one induced by *rbf1* (Fig. 2B) although *pAbp-Flag*-expressing flies display intact wings. Even more surprisingly, the amount of apoptosis is equivalent in wing discs overexpressing *rbf1* only or co-overexpressing *rbf1* and *pAbp-Flag*

(compare fig. 2B to fig. 2D), showing that PABP does not inhibit Rbf1-induced apoptosis. Thus, PABP ability to suppress *rbf1*-induced phenotype is not due to an inhibition of apoptosis in wing imaginal discs.

Since Rbf1-induced apoptosis leads to compensatory proliferation [14,26], another hypothesis that could explain the suppression of this notched wing phenotype is that overexpression of *pAbp* leads to an enhanced compensatory proliferation. We thus studied the effect of *pAbp* overexpression on cell proliferation by anti-phospho-histone H3 (anti-PH3) immunostaining in wing discs overexpressing *rbf1*, *pAbp-Flag* or *rbf1* and *pAbp-Flag*. As expected, the amount of anti-PH3 labelled cells was higher in discs overexpressing *rbf1* than in control discs (Fig. 2G). The figure 2H also shows that overexpressing *pAbp-Flag* increased anti-PH3 labelling. This enhanced proliferation could explain why the wing of flies can be intact despite the high level of apoptosis observed in the wing disc. However, anti-PH3 labelling is not significantly higher in discs overexpressing *rbf1* and *pAbp-Flag* than in discs overexpressing *rbf1* only (Fig. 2I). These results show that the suppression of the Rbf1-induced notched wing phenotype by PABP is not related to an increased proliferation in the wing disc.

pAbp suppression of the Rbf1-induced notched wing phenotype is related to the eIF4F translation initiation complex but not to the RISC complex.

PABP is known to bind to two translation modulators, the eIF4F complex that initiates cap-dependent mRNA translation and the RNA-induced silencing complex (RISC). AGO1, GW182 and the Rm62/p68 helicase are essential components of RISC. Once bound to poly(A), miRISC can recruit the deadenylation CCR4-NOT complex, which is composed of six subunits including POP2/CAF1 and CCR4. To test an eventual role of these proteins in the

suppression of the *Rbf1*-induced notched wing phenotype, we performed genetic interaction tests using the *vg-Gal4* driver. When *rbf1* was overexpressed and the gene encoding AGO1, GW183, Rm62/p68, POP2/CAF1 or CCR4 simultaneously downregulated by RNAi, we did not observe any significant shift of the phenotypes distribution (Table 1). This result shows that *pAbp* suppression of the Rbf1-induced notched wing phenotype is not related to the miRISC complex.

The other PABP-binding complex eIF4F is composed of three subunits, eIF4A, eIF4E, and eIF4G. eIF4E is thought to be inhibited by Lk6 kinase-mediated phosphorylation and 4E-BP binding, thus blocking its ability to form the translation initiation complex [27]. Genetic interaction tests showed that downregulation of eIF4E enhances notches wing phenotypes while increasing eIF4E amounts suppressed it (Table 1). Furthermore, overexpression of the eIF4E inhibitor *Lk6* enhances the notched wings phenotype. This suggests that the eIF4F complex, as its binding partner PABP do, can stimulate a compensatory mechanism upon Rbf1-induced apoptosis. Taken together, all these results suggest that a cap-dependent mRNA translation is involved in the suppression of the Rbf1-induced notched wing phenotype. Surprisingly, the downregulation of 4E-BP, with the use of RNAi or in mutant heterozygous background, enhances Rbf1-induced phenotypes which can appear contradictory for an eIF4F inhibitor. However, considering that Rbf1-induced apoptosis involves Drp1-dependent mitochondrial fragmentation leading to reactive oxygen species production [13], this result is in agreement with the observations that 4E-BP promotes translation of nucleus-encoded mitochondria-related mRNAs, oxidative stress resistance and mitochondrial activity [28,29,30] at least in part via Drp1 regulation [31]. This result suggests

that 4E-BP suppresses the wing phenotype by inhibiting the apoptotic cascade triggered by Rbf1 at the mitochondrial level.

4E-BP but not Lk6 and eIF4E suppresses rbf1-induced apoptosis

In order to test if the ability of 4E-BP, LK6 and eIF4E to modulate the Rbf1-induced phenotype distribution involved a regulation of apoptosis at the larval stage, we performed TUNEL staining on wing imaginal discs. A slight increase in the number of apoptotic cells was observed in the wing imaginal disc of *4EBP^{k13517}* heterozygous mutant background compared to control and this mutant background significantly increased the number of apoptotic cells in the *vg-Gal4* expression domain of *vg>rbf1*, *4EBP^{k13517}* wing imaginal disc compared to *vg>rbf1* (Fig. 3A). This result is in agreement with an anti-apoptotic effect of 4E-BP. In contrast, we observed no changes in the level of TUNEL labeled cells in wing imaginal discs co-expressing *rbf1* and *LK6* (Fig. 3B) or *eIF4E* (Fig. 3C) compared to wing discs overexpressing *rbf1* alone. This shows that the suppressor effect of *eIF4E* overexpression, as well as the enhancer effect of *Lk6* overexpression is not related to an inhibition of apoptosis but rather involves a compensatory mechanism linked to the translation process that allows to counteract wing tissue loss.

Overexpression of Rbf-1 or pAbp in the wing pouch stimulates translation

Taking into account, on the one hand, the role of PABP in translation and, on the other hand, the fact that induction of apoptosis is often associated with substantial inhibition of protein synthesis in several cell types [15], it was tempting to speculate that the apoptotic pathway triggered by Rbf1 also involves an inhibition of global translation that would be compensated by PABP activity. Thus, we performed experiments to estimate the

global rate of translation in imaginal discs expressing *rbf1*, *PABP* or *rbf1* and *PABP* under the control of the *vg-Gal4* driver by using click-iT[®] plus OPP protein synthesis assay kit. To consider the translation in the cells of interest, we used an anti-GFP (Fig 4 lane 1 and 3) or an anti-Rbf1 (Fig 4 lane 2 and 4) to visualize the *vg-Gal4* expression domain. This experiment shows that both *rbf1* and *pAbp* overexpression lead to an increase in the amount of newly synthesized proteins compared to control. The result obtained when *rbf1* and *pAbp* are co-overexpressed does not appear significantly different than those obtained with *rbf1* or *pAbp* alone. These observations show that *rbf1*-induced apoptosis is not associated with global decrease in translation and that the suppression of the wing phenotype by PABP does not arise from a further increase in translation mediated by PABP (compare lane 2 and 4).

Simultaneous overexpression of rbf1 and pAbp leads to an increased metamorphosis duration

Since the suppressor effect of PABP does not seem to involve a modulation of cell death or proliferation, we wanted to know whether it could implicate a developmental delay, which is another mechanism known to contribute to the replacement of apoptotic cells [32]. Thus, we designed experiments aiming at estimating the metamorphosis duration of larvae of different genotypes. The figure 5 shows that while overexpressing *rbf1* or *pAbp* alone does not impact on the duration of metamorphosis compared to control, when *rbf1* and *pAbp* are co-overexpressed the duration of metamorphosis is significantly increased. This observation opens the possibility that this extended metamorphosis allows coordination of tissue growth and regeneration within the tissue in a way similar to what has been described after imaginal disc damage [33].

Conclusions

In this paper we show that PABP and eIF4F can counteract tissue loss resulting from Rbf1-induced apoptosis. This effect is specific since it is not found in a tissue where another apoptosis inducer, such as *reaper*, is expressed. Our results are in agreement with the data of the literature showing that eIF4F complex plays an important role in chemoresistance [34]. Surprisingly, we failed to detect any involvement of apoptosis inhibition or proliferation increase in the third instar larvae wing disc that could account for the suppression of the adult wing phenotype. The rescue of apoptosis-induced phenotype in the wing probably involves events taking place later during the metamorphosis that are facilitated by the development delay induced in flies co-expressing *rbf1* and *pAbp*. The characterization of these events and the identification of the mRNAs targeted by PABP/ eIF4F would probably give rise to important data on the functional interplays between pRb family proteins, translational regulations and tissue homeostasis.

Acknowledgements

We are grateful to Vincent Rincheval for his critical readings of the manuscript. This work was supported by the Ligue Contre le Cancer. Confocal microscopy experiments were performed on CYMAGES imaging facility (University of Versailles/Saint-Quentin-en-Yvelines).

References

- [1] C.J. Sherr, F. McCormick, The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer Cell* 2 (2002) 103-112.
- [2] D. Cobrinik, Pocket proteins and cell cycle control, *Oncogene* 24 (2005) 2796-2809.
- [3] A. Almasan, Y. Yin, R.E. Kelly, E.Y. Lee, A. Bradley, W. Li, J.R. Bertino, G.M. Wahl, Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5436-5440.

- [4] A. Ianari, T. Natale, E. Calo, E. Ferretti, E. Alesse, I. Screpanti, K. Haigis, A. Gulino, J.A. Lees, Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein, *Cancer Cell* 15 (2009) 184-194.
- [5] K.I. Hilgendorf, E.S. Leshchiner, S. Nedelcu, M.A. Maynard, E. Calo, A. Ianari, L.D. Walensky, J.A. Lees, The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria, *Genes & development* 27 (2013) 1003-1015.
- [6] K.Y. Tsai, Y. Hu, K.F. Macleod, D. Crowley, L. Yamasaki, T. Jacks, Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos, *Mol. Cell.* 2 (1998) 293-304.
- [7] A. Sharma, C.E. Comstock, E.S. Knudsen, K.H. Cao, J.K. Hess-Wilson, L.M. Morey, J. Barrera, K.E. Knudsen, Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells, *Cancer research* 67 (2007) 6192-6203.
- [8] M.S. Huh, M.H. Parker, A. Scime, R. Parks, M.A. Rudnicki, Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation, *J Cell Biol* 166 (2004) 865-876.
- [9] G. Palacios, F. Talos, A. Nemaierova, U.M. Moll, O. Petrenko, E2F1 plays a direct role in Rb stabilization and p53-independent tumor suppression, *Cell Cycle* 7 (2008) 1776-1781.
- [10] C. Milet, A. Rincheval-Arnold, B. Mignotte, I. Guenal, The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells, *Cell Cycle* 9 (2010) 97-103.
- [11] A. Clavier, A. Baillet, A. Rincheval-Arnold, A. Coleno-Costes, C. Lasbleiz, B. Mignotte, I. Guenal, The pro-apoptotic activity of Drosophila Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA, *Cell Death Dis* 5 (2014) e1405.
- [12] A. Clavier, A. Rincheval-Arnold, J. Colin, B. Mignotte, I. Guenal, Apoptosis in Drosophila: which role for mitochondria?, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 21 (2016) 239-251.
- [13] A. Clavier, V. Ruby, A. Rincheval-Arnold, B. Mignotte, I. Guenal, The Drosophila retinoblastoma protein, Rbf1, induces a Debcl- and Drp1-dependent mitochondrial apoptosis, *J Cell Sci* 128 (2015) 3239-3249.
- [14] A. Clavier, A. Rincheval-Arnold, A. Baillet, B. Mignotte, I. Guenal, Two different specific JNK activators are required to trigger apoptosis or compensatory proliferation in response to Rbf1 in Drosophila, *Cell Cycle* 15 (2016) 283-294.
- [15] S.J. Morley, The regulation of eIF4F during cell growth and cell death, *Prog Mol Subcell Biol* 27 (2001) 1-37.
- [16] D.A. Colon-Ramos, C.L. Shenvi, D.H. Weitzel, E.C. Gan, R. Matts, J. Cate, S. Kornbluth, Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation, *Nature structural & molecular biology* 13 (2006) 103-111.
- [17] C.L. Holley, M.R. Olson, D.A. Colon-Ramos, S. Kornbluth, Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 439-444.
- [18] S.J. Yoo, J.R. Huh, I. Muro, H. Yu, L. Wang, S.L. Wang, R.M. Feldman, R.J. Clem, H.A. Muller, B.A. Hay, Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 416-424.
- [19] D.J. Goss, F.E. Kleiman, Poly(A) binding proteins: are they all created equal?, *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4 (2013) 167-179.

- [20] R.W. Smith, T.K. Blee, N.K. Gray, Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans, *Biochem Soc Trans* 42 (2014) 1229-1237.
- [21] M. Verlaet, V. Deregowski, G. Denis, C. Humblet, M.T. Stalmans, V. Bours, V. Castronovo, J. Boniver, M.P. Defresne, Genetic imbalances in preleukemic thymuses, *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2001) 12-18.
- [22] L. Zhang, W. Zhou, V.E. Velculescu, S.E. Kern, R.H. Hruban, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Gene expression profiles in normal and cancer cells, *Science* 276 (1997) 1268-1272.
- [23] D. Lessing, N.M. Bonini, Polyglutamine genes interact to modulate the severity and progression of neurodegeneration in *Drosophila*, *PLoS Biol* 6 (2008) e29.
- [24] H.J. Kim, A.R. Raphael, E.S. LaDow, L. McGurk, R.A. Weber, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, S. Finkbeiner, A.D. Gitler, N.M. Bonini, Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models, *Nat Genet* 46 (2014) 152-160.
- [25] S. Brun, V. Rincheval, S. Gaumer, B. Mignotte, I. Guenal, reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in *Drosophila*, *Oncogene* 21 (2002) 6458-6470.
- [26] C. Milet, A. Rincheval-Arnold, A. Morieras, A. Clavier, A. Garrigue, B. Mignotte, I. Guenal, Mutating RBF can enhance its pro-apoptotic activity and uncovers a new role in tissue homeostasis, *PLoS One* 9 (2014) e102902.
- [27] A.A. Teleman, V. Hietakangas, A.C. Sayadian, S.M. Cohen, Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*, *Cell Metab* 7 (2008) 21-32.
- [28] G. Tettweiler, M. Miron, M. Jenkins, N. Sonenberg, P.F. Lasko, Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP, *Genes Dev* 19 (2005) 1840-1843.
- [29] B.M. Zid, A.N. Rogers, S.D. Katewa, M.A. Vargas, M.C. Kolipinski, T.A. Lu, S. Benzer, P. Kapahi, 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*, *Cell* 139 (2009) 149-160.
- [30] M. Morita, S.P. Gravel, V. Chenard, K. Sikstrom, L. Zheng, T. Alain, V. Gandin, D. Avizonis, M. Arguello, C. Zakaria, S. McLaughlan, Y. Nouet, A. Pause, M. Pollak, E. Gottlieb, O. Larsson, J. St-Pierre, I. Topisirovic, N. Sonenberg, mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation, *Cell Metab* 18 (2013) 698-711.
- [31] M. Morita, J. Prudent, K. Basu, V. Goyon, S. Katsumura, L. Hulea, D. Pearl, N. Siddiqui, S. Strack, S. McQuirk, J. St-Pierre, O. Larsson, I. Topisirovic, H. Vali, H.M. McBride, J.J. Bergeron, N. Sonenberg, mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1, *Molecular cell* 67 (2017) 922-935 e925.
- [32] Y. Demay, J. Perochon, S. Szuplewski, B. Mignotte, S. Gaumer, The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model, *Cell Death & Disease* 5 (2014) e1452.
- [33] A. Halme, M. Cheng, I.K. Hariharan, Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*, *Curr Biol* 20 (2010) 458-463.
- [34] H. Malka-Mahieu, M. Newman, L. Desaubry, C. Robert, S. Vagner, Molecular Pathways: The eIF4F Translation Initiation Complex-New Opportunities for Cancer Treatment, *Clin Cancer Res* 23 (2017) 21-25.

Figures legends

Figure 1: PABP specifically antagonizes Rbf1-induced phenotypes

(A) Fly wings are classified into four categories (wild-type, weak, intermediate and strong) according to the number of notches observed on their margin (asterisks) (adapted from [10]). Distribution of notch wing phenotypes in *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-gfp* and *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-pAbp-flag* (B), *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-gfp* and *vg-Gal4/UAS-RNAi paip2* ; *UAS-rbf1/+* (C), *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-gfp* and *vg-Gal4/pAbp^{EP310}; UAS-rbf1/+* (D) *UAS-rpr/+; vg-Gal4/+; UAS-gfp/+* and *UAS-rpr/+; vg-Gal4/+; UAS-pAbp-flag/+* (E). Statistical analysis was performed using Wilcoxon tests.

Figure 2: PABP does not inhibit Rbf1-induced apoptosis and does not increase apoptosis induced proliferation triggered by Rbf1.

(A–B) Visualization of apoptotic cells by TUNEL staining in wing imaginal discs of the following genotypes: *vg-Gal4/+; UAS-gfp/+* (A), *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-gfp* (B), *vg-Gal4/+; UAS-pAbp-flag/UAS-gfp* (C) and *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-pAbp-flag* (D). (E) The box and whisker plots show the distribution of the number of TUNEL positive cells in the wing imaginal discs pouch normalized by the pouch surface of previously described genotypes. (F–I) Visualization of mitotic cells by PH3 staining in wing imaginal discs of previously described genotypes. (J) The box and whisker plots show the distribution of the number of PH3 positive cells in the wing imaginal discs pouch normalized by the pouch surface visualized of the previous genotypes. **: Tuckey's test $p < 0.01$. The points correspond to outlier values.

Figure 3: Positive regulation of eIF4E does not suppress *rbf1*-induced apoptosis.

The box plot shows the distribution of the number of TUNEL positive cells in the wing imaginal discs pouch normalized by the pouch surface of control genotype compared to the following genotypes: , *vg-Gal4/+*; *vg-Gal4/4EBP^{k13507}*; *UAS-gfp/+* and *vg-Gal4/4EBP^{k13507}*; *UAS-rbf1/+* (A), *vg-Gal4/+*; *UAS-Lk6/UAS-gfp* and *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/UAS-Lk6* (B), *vg-Gal4/UAS-eIF4E*; *UAS-gfp/+* and *vg-Gal4/UAS-eIF4E*; *UAS-rbf1/+* (C). Each box and whisker plot corresponds to independent experiments and the control genotypes *vg-Gal4/+*; *UAS-gfp/+* (A, C) or *vg-Gal4/+*; *UAS-gfp/UAS-LacZ* (B) and or *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/+* (A) or *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/UAS-LacZ* (B), *UAS-rbf1/UAS-gfp* (C), are issued from crossing realized at the same time than those corresponding to the crosses test. The two asterisks indicate a statistically significant difference between two genotypes (*= p<0,05, **= p<0.01, Tukey-test) the point correspond to outlier value.

Figure 4: Both Rbf1 and PABP have a positive effect on translation in larvae wing imaginal discs.

The first colonne correspond to (1) anti-GFP staining or anti-Rbf1 staining (lane 2) which report *vg-Gal4* expressing domain, (2) Click-iT[®]plus OPPstaining which label newly synthesized proteins, (3) anti-armadillo staining to visualize the whole wing imaginal discs of the following genotypes, lane one control (*vg-Gal4/+*; *UAS-gfp/UAS-LacZ*), lane two *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/UAS-gfp*, lane three *vg-Gal4/+*; *UAS-gfp/UAS-pAbp-flag* and lane four *vg-Gal4/+*; *UAS-rbf1/UAS-pAbp-flag*. Each lane correspond to the same disc and all the discs are shown with anterior up and wing pouch to the right. All the pictures are at the same scale.

Figure 5: PABP overexpression leads to a developmental delay of *vg>rbf1*.

Duration of the developmental time from wandering third instar larvae stage to adult eclosion at 25°C of larvae of the following genotype: *vg-Gal4/+; UAS-gfp/UAS-LacZ* (control), *vg-Gal4/+; UAS-gfp/UAS-pAbp-flag*, *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-LacZ* and *vg-Gal4/+; UAS-rbf1/UAS-pAbp-flag*. *: Student Test, $p < 0,05$ compared to control).

Table 1

Gene	UAS- / UAS-RNAi/mutation	Notched phenotype
Gawky	<i>UAS-RNAi-Gawky</i> (v45773-GD)	No effect (n=466 ; $\alpha=0.3$)
AGO2	<i>UAS-RNAi-AGO2</i> (BL 34799–Trip)	No effect (n=297 ; $\alpha=0.01$)
Rm62/p68	<i>UAS-RNAi-Rm62</i> (v46909-GD)	No effect (n=103 ; $\alpha=0.5$)
CCR4	<i>UAS-RNAi-CCR4</i> (v13366-GD)	No effect (n=474 ; $\alpha=0.05$)
POP2	<i>pop2^{DG14804}</i> (BL 20439)	No effect (n=255 ; $\alpha=0.05$)
POP2	<i>pop2^{MB11505}</i> (BL 29217)	No effect (n=346 ; $\alpha=0.6$)
POP2	<i>pop2^{MB02463}</i> (BL 23569)	No effect (n=235 ; $\alpha=0.7$)
eIF4E	<i>UAS-eIF4E</i> (BL 8710)	Rescue (n=1357; $\alpha=10^{-13}$)
eIF4E	<i>eIF4E^{S058911}</i> (BL 8648)	Enhancement (n=466 ; $\alpha=10^{-4}$)
Lk6	<i>UAS-Lk6</i> (BL 8708)	Enhancement (n=1033 ; $\alpha=10^{-12}$)
4E-BP	<i>UAS-RNAi-4E-BP</i> (BL 36667–Trip)	Enhancement (n= 706 ; $\alpha=10^{-30}$)
4E-BP	<i>4E-BP^{k13517}</i> (BL 9558)	Enhancement (n= 488 ; $\alpha=10^{-7}$)

Figure 1

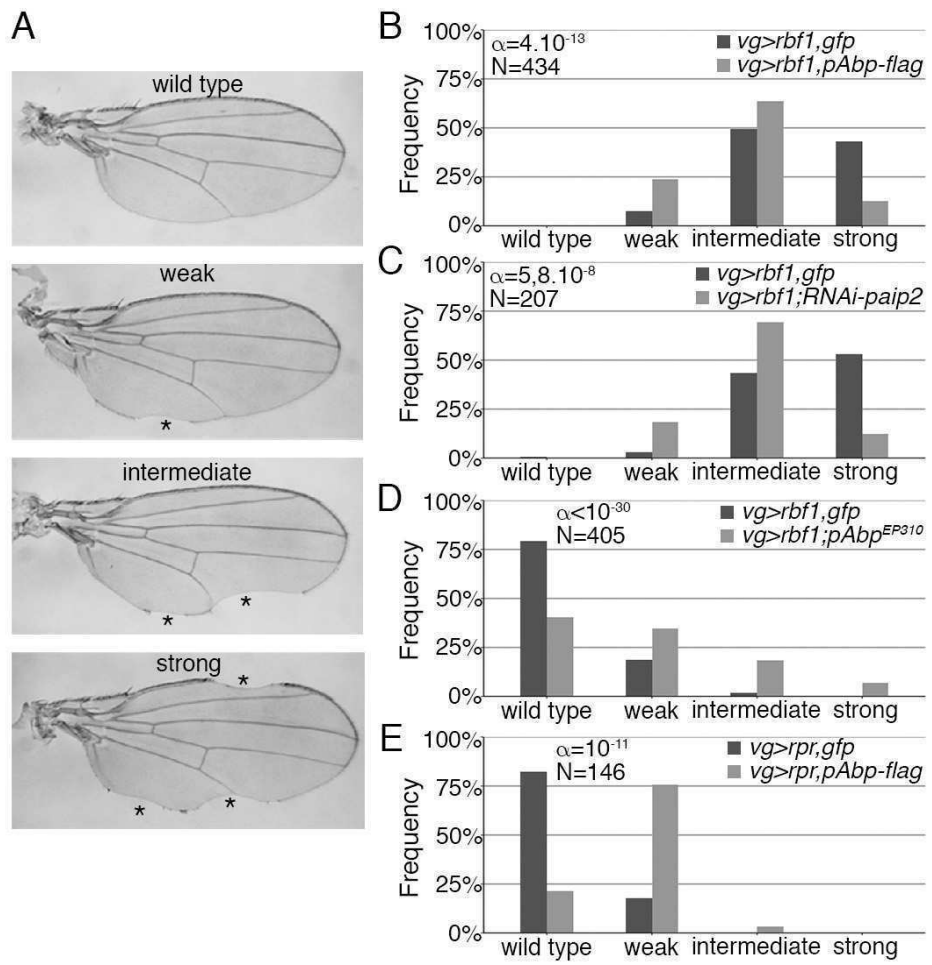


Figure 2

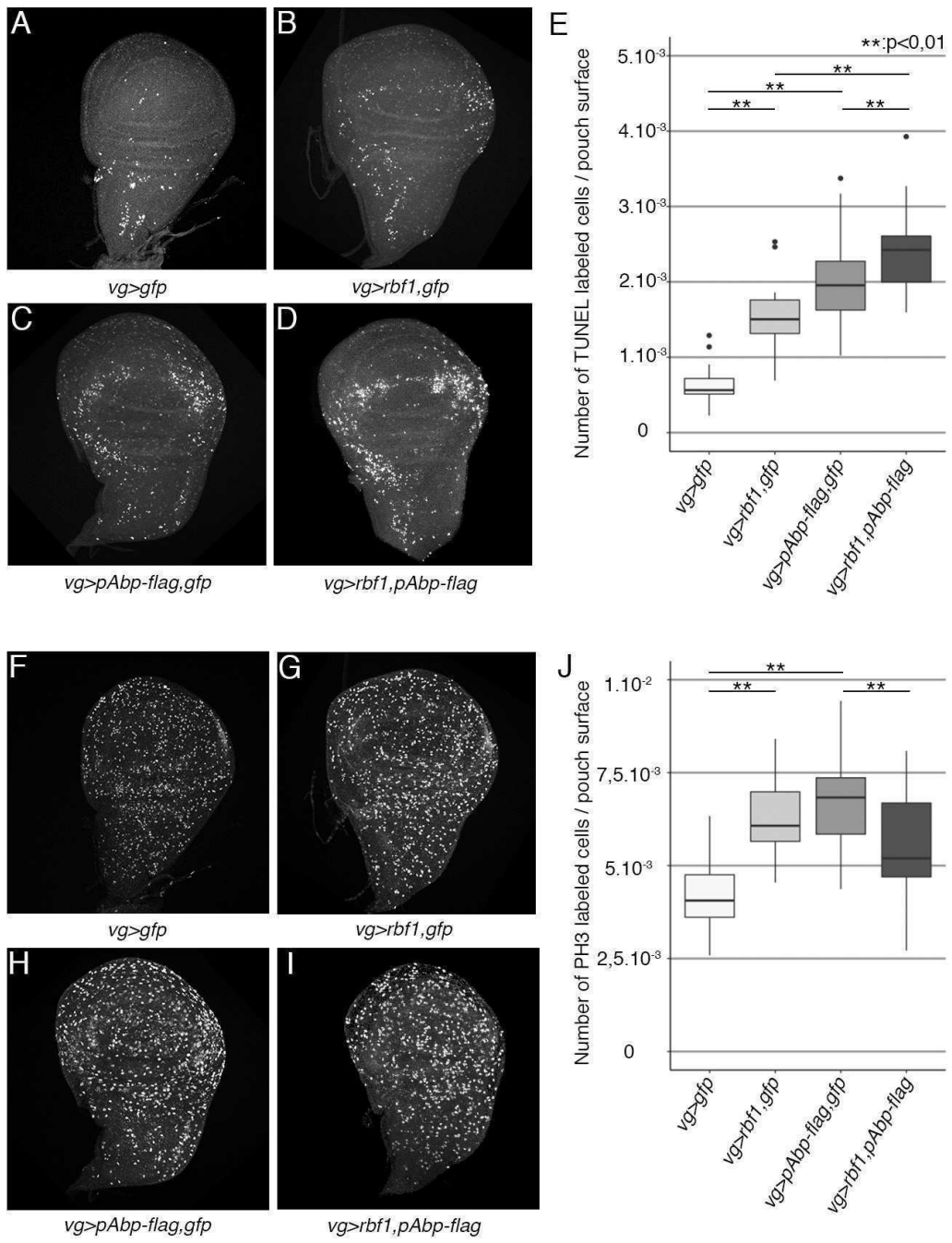


Figure 3

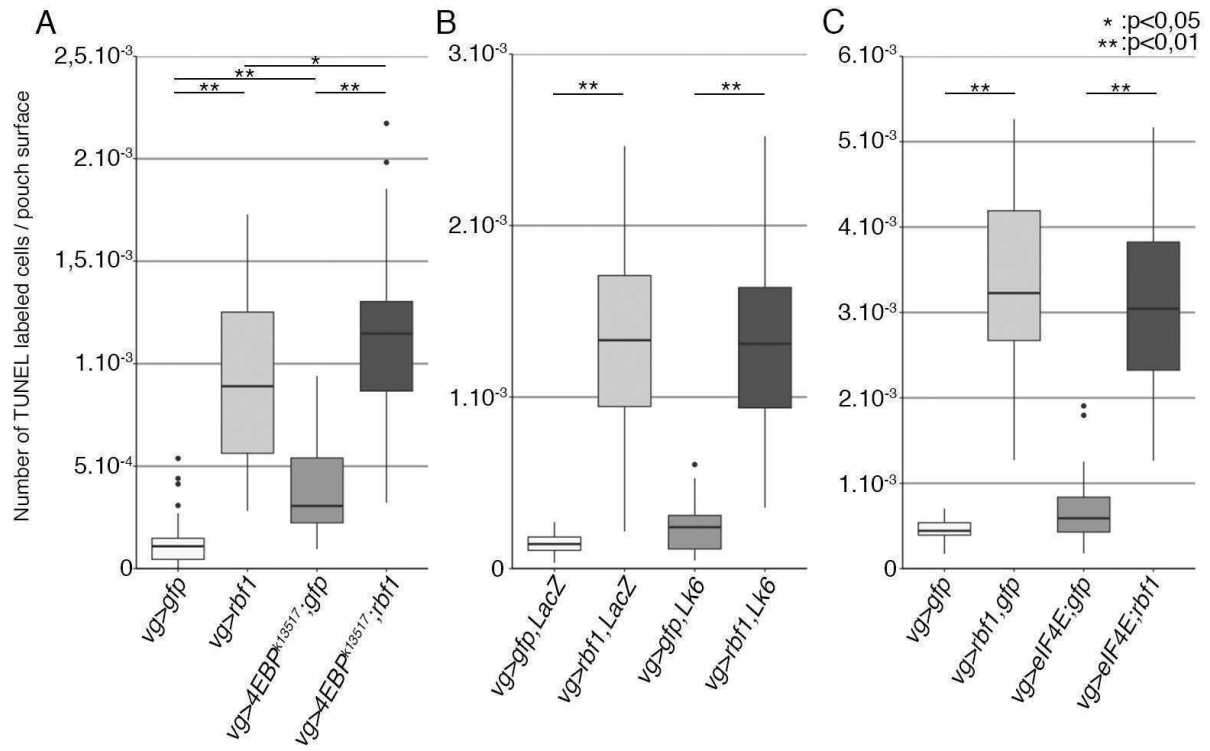


Figure 4

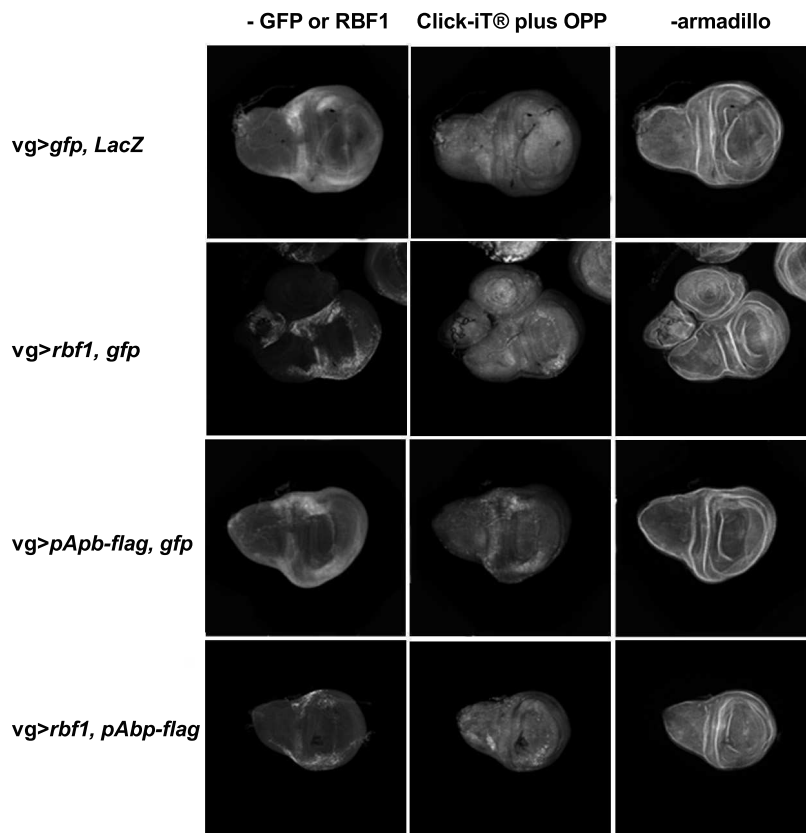
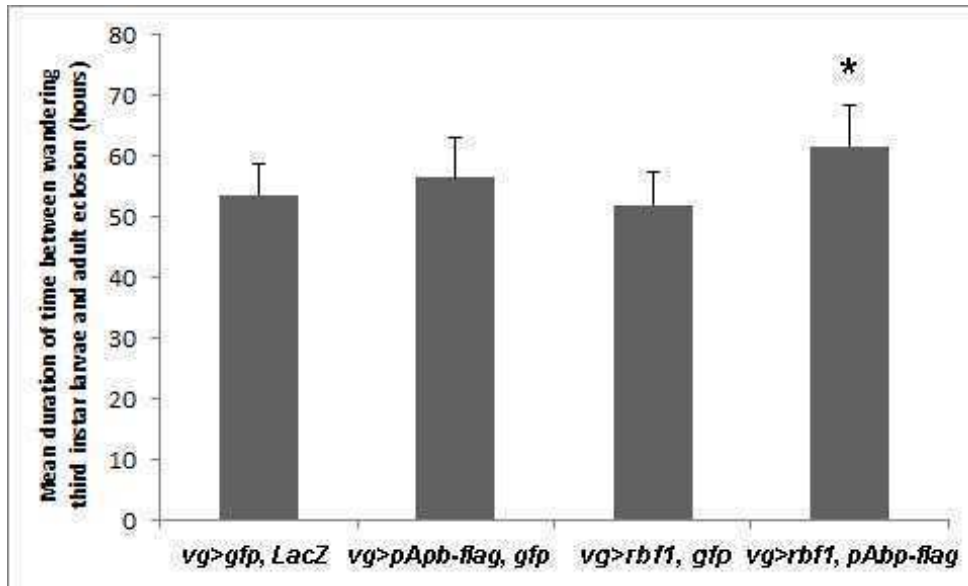


Figure 5



Discussion & Perspectives

L'apparition des tumeurs est multifactorielle. Parmi les causes de leur apparition, des mutations « perte de fonction » affectent des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire ou dans le déclenchement de l'apoptose. Ces gènes sont appelés « supprimeurs de tumeur » pour leur capacité à prévenir la transformation tumorale. pRb fut le premier gène identifié comme « suppresseur de tumeur ». Son inactivation est retrouvée dans de nombreux cancers, ce qui est en partie expliqué par le fait que pRb joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire ou par un rôle dans le maintien de la stabilité génomique.

Toutefois, pRb assure plusieurs autres fonctions et certaines d'entre elles pourraient également expliquer sa fonction de suppresseur de tumeur. En effet, son activité de co-facteur de transcription lui permet d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription ou régulateurs de la chromatine. Et bien que le rôle de suppresseur de tumeur de pRb soit établi depuis longtemps, il a été montré que ces interactions lui permettent de cibler de nombreux gènes impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires (revue dans Dyson, 2016). Sa place centrale dans le fonctionnement de la cellule rend donc difficile l'étude spécifique de ces différentes activités. Parmi celles-ci, pRb induit notamment la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose. Cette activité est déclenchée suite à l'induction de dommages à l'ADN dans des cellules de mammifères (Ianari *et al.*, 2009). Chez la drosophile, il a été montré par le laboratoire que la surexpression de son homologue, Rbf1, induit l'apoptose dans les cellules en prolifération (Milet *et al.*, 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à compléter la voie d'induction de l'apoptose par Rbf1. Pour cela, j'ai approfondi les questions soulevées par la découverte du rôle de *buffy* dans cette voie (Clavier *et al.*, 2014). Tout d'abord, l'implication de *debcl*, déjà décrit comme interagissant avec *buffy*, a été montrée (Quinn *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2016). Cette implication a permis d'envisager que la mitochondrie ait un rôle important dans l'apoptose induite par Rbf1. Cette hypothèse est validée par l'observation de l'implication d'une protéine majeure de la dynamique mitochondriale, Drp1, ainsi que des événements de fragmentation mitochondriale et d'accumulation d'EAO à la mitochondrie.

A. Les évènements mitochondriaux induits par Rbf1

Bien que la perméabilisation de la membrane et le relargage de dOMI/HTRA2, inhibiteur de dIAP1, depuis la mitochondrie vers le cytosol, soient observés dans les cellules apoptotiques de drosophile, la mitochondrie n'a pas un rôle aussi clair que dans l'apoptose des cellules de mammifères (Abdelwahid *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007). En effet, le relargage du cytochrome *c*, un facteur important dans la formation de l'apoptosome, n'est pas nécessaire dans cet organisme (Dorstyn *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2002; Means, Muro and Clem, 2006; Abdelwahid *et al.*, 2007), bien qu'il puisse être observé tardivement dans le cas de cellules en culture (Abdelwahid *et al.*, 2007). Au-delà de ces observations, il existe peu de données décrivant les liens existants entre la mitochondrie et l'apoptose de drosophile. Aussi, l'observation de l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 est originale et participe à la compréhension de ces liens.

1. La régulation de *E2F/rb* sur la mitochondrie et l'apoptose

Le lien entre la mitochondrie, l'apoptose et E2F/Rb a déjà pu être mis en évidence plusieurs fois dans la littérature, mais leurs relations sont différentes suivant les modèles étudiés. Tout d'abord, des études ont montré que la mutation de *dDP*, un co-facteur nécessaire à l'activité des *dE2Fs*, entraîne une réduction de l'activité mitochondriale (Ambrus *et al.*, 2013). Les mitochondries perdent, au moins en partie, leur potentiel de membrane ce qui impacte grandement leur capacité à synthétiser l'ATP, phénomène notamment retrouvé dans les cellules apoptotiques et qui a probablement lieu dans l'apoptose induite par Rbf1. De plus, leur morphologie est modifiée passant de mitochondries allongées et en réseaux à des mitochondries globulaires et isolées (Ambrus *et al.*, 2013) ce qui rappelle à la fragmentation mitochondriale induite par Rbf1. De manière intéressante, ces modifications pourraient expliquer la résistance des cellules mutées à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN (Moon *et al.*, 2005; Ambrus *et al.*, 2013). Les mitochondries, trop affectées, ne permettraient plus la transmission du signal de mort passant par elles. Ces observations ont même été étendues aux cellules de mammifères dans lesquelles l'inactivation de *DP* ou *E2F1* conduits à des résultats similaires (Ambrus *et al.*, 2013). Ces données vont dans le sens de ce qui a pu être observé dans les cellules post-mitotiques des disques imaginaux d'œil de drosophile en contexte de surexpression de *rbf1*. Il a pu être montré au laboratoire que, dans ce contexte,

Rbf1 est anti-apoptotique (Milet *et al.*, 2010). Les gènes ciblés semblent être aussi des cibles de dE2F1 et dE2F2. Dans l'apoptose que je décris dans les cellules prolifératives, Rbf1 induit la modification de la transcription de gènes en interaction avec dE2F2 (Clavier *et al.*, 2014). Nous aurions donc des phénomènes comparables en ce qui concerne le déclenchement d'évènements mitochondriaux mais les conséquences de ces phénomènes seraient opposées suivant le type cellulaire. La fragmentation mitochondriale serait protectrice vis-à-vis de l'apoptose dans les cellules post-mitotique du disque imaginal d'œil mais ferait partie du processus apoptotique dans les cellules prolifératives du disque imaginal d'aile.

Rbf1 interagit avec dE2F2 pour moduler l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose. Ainsi, Rbf1 réprime l'expression du gène anti-apoptotique, dont *buffy*, et stimule l'expression de *how*, un gène codant une protéine induisant la déstabilisation de l'ARNm codant pour l'anti-apoptotique DIAP1 (Clavier *et al.*, 2014). Buffy est décrit comme ayant une localisation au niveau du réticulum endoplasmique (Doumanis, Dorstyn and Kumar, 2007), cependant son activité est reliée à l'inhibition de Debcl, une protéine localisée au niveau mitochondriale. En effet, il a été montré qu'au cours des stades embryonnaire, larvaire et pupal, Buffy est capable d'interagir génétiquement et physiquement avec Debcl et d'inhiber son activité apoptotique ainsi que l'apoptose induite par radiation (Quinn *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2016). L'observation de l'implication de Buffy dans l'apoptose induite par Rbf1, nous a poussé à investiguer sur le rôle de Debcl dans ce processus. Nous avons pu démontrer que Debcl était bien impliquée dans l'apoptose induite par Rbf1. Cette interaction pourrait notamment avoir lieu aux points d'interaction entre le RE et la mitochondrie, les « membranes associées à la mitochondrie » (MAMs). Il n'est pas impossible que de telles structures aient une importance dans la régulation de l'activité de protéines telles que Debcl. Elles agiraient ainsi comme senseur de l'activité cellulaire. En cas de dysfonctionnement du RE ou de la mitochondrie, les MAMs pourraient être, en partie, perdues. De cette façon, l'interaction entre Buffy et Debcl ne serait plus possible et Debcl pourrait agir comme pro-apoptotique. Une étude plus approfondie de l'implication des MAMs dans l'apoptose pourrait être particulièrement intéressante mais dans l'apoptose induite par Rbf1, il n'y a pas d'indice permettant de penser que leur stabilité soit primordiale. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une surexpression de *Debcl* dans les cellules en prolifération récapitule les évènements mitochondriaux induits par Rbf1 et aboutit à l'apoptose. Ces observations pourraient s'expliquer par les mécanismes suivants :

- Dans les lignées surexprimant *rbf1*, la diminution seule de la quantité de Buffy permet d'expliquer l'activation de Debcl.
- Dans les lignées surexprimant *debcl*, Buffy ne serait plus capable d'inhiber toutes les protéines Debcl présentes.

Dans les deux cas, Debcl déclencherait la suite des évènements mitochondriaux menant à l'activation de la voie JNK. On ne peut cependant exclure que les MAMs soient totalement préservées et qu'elles n'influencent pas le déclenchement de l'apoptose.

En tant que facteur de transcription, pRb peut induire des modifications de la dynamique mitochondriale au cours de différents types de différenciation cellulaire. Par exemple, la mutation de *rb* entraîne un défaut de sortie du cycle cellulaire mais aussi de la biogénèse mitochondriale dans l'érythropoïèse (Sankaran, Orkin and Walkley, 2008). Autre exemple, il a été montré que l'absence de *rb* induisait l'apoptose au cours de la différenciation des myoblastes mais que cette apoptose pouvait être contrée par l'activation de la biogénèse mitochondriale (Ciavarrà and Zacksenhaus, 2010). Les données rapportées ici indiquent que *rb* modulent particulièrement la biogénèse mitochondriale au cours de la différenciation des érythrocytes et des myoblastes et que cette modulation est nécessaire au bon déroulement du processus. Bien que mes travaux portent sur des cellules prolifératives, j'ai voulu tester l'interaction génétique entre *rbf1* et *spargel*, un des gènes centraux de la biogénèse mitochondriale, homologue de drosophile de *pgc1-α*. Des résultats préliminaires semblent indiquer que *spargel*, favoriserait le phénotype d'aile induit par Rbf1. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de son implication et de la mettre en lien avec la mitophagie, ces phénomènes pouvant être complémentaires.

Par ailleurs, dans l'infection par papillomavirus des cellules humaines, E2F5, un répresseur transcriptionnel, est libérée de son interaction avec pRb et va agir au niveau mitochondrial où il interagit avec Drp1 pour favoriser la fission mitochondriale et la mitophagie (Thomas *et al.*, 2017). E2F1 peut induire l'apoptose au niveau mitochondrial en interagissant avec BCL-xL (Vuillier *et al.*, 2018). Toujours chez les mammifères, on trouve un rôle à E2F1 dans le métabolisme mitochondrial où elle peut favoriser la glycolyse à la fois par son activité de facteur de transcription et directement à la mitochondrie (Denechaud, Fajas and Giral, 2017).

De la même façon que E2F, les liens entre pRb et la mitochondrie peuvent être plus directs puisqu'il a été mis en évidence que cette protéine est capable de se localiser à la

mitochondrie pour induire l'apoptose (Hilgendorf *et al.*, 2013). pRb est capable d'interagir avec BAX pour l'activer et permettre la dépolarisation membranaire ainsi que le relargage du cytochrome *c*. Cette événement n'a pas été mis en évidence chez la drosophile sachant que le membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent, Debcl, n'est pas l'homologue de BAX.

Il n'a pour le moment pas été rapporté d'activité de dE2F1 ou dE2F2 directement à la mitochondrie chez la drosophile. De plus, il apparaît clairement que Rbf1 agit ici en régulant la transcription de gènes directement au noyau. Si elle n'est pas à exclure, l'idée d'une activité mitochondriale de Rbf1 ou dE2F1/dE2F2, dans la voie d'apoptose décrite ici, paraît très peu probable.

Mes travaux poursuivent donc l'exploration du lien entre *rb/E2F*, la mitochondrie et l'apoptose puisque nous démontrons que Rbf1 induit l'apoptose en modifiant la dynamique mitochondriale et en entraînant l'accumulation d'EA0 à la mitochondrie. Toutes ces données soutiennent l'idée que les mitochondries sont centrales dans la voie d'apoptose que contrôle les facteurs E2Fs/Rb.

2. La dynamique mitochondriale dans l'apoptose

L'interaction entre Debcl et Drp1 initie des événements mitochondriaux induits par Rbf1 et est nécessaire au déclenchement de l'apoptose. Pourtant, chez *Drosophila melanogaster*, la place de la mitochondrie dans l'apoptose a d'abord été fortement minimisée. Contrairement aux mammifères et bien qu'on observe une chute du potentiel de membrane et une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MEM), le cytochrome *c* n'est pas massivement relargué depuis la mitochondrie dans le cytosol suite à l'action des membre pro-apoptotique de le famille Bcl-2 à la surface mitochondriale. En effet, si un changement de localisation du cytochrome *c* a pu être observé quelquefois au cours de l'apoptose, celui-ci n'est clairement pas nécessaire à l'activation des caspases (Varkey *et al.*, 1999; Abdelwahid *et al.*, 2007). Le contrôle de l'apoptose passe alors principalement par la régulation de l'activité des caspases par dIAP1 qui est elle-même régulée par l'activité des RHG (Rpr, Hid et Grim). Ces trois protéines possèdent des séquences entraînant leur adressage à la mitochondrie qui est nécessaire à leur activité pro-apoptotique (Claveria *et al.*, 2002; Olson, Holley, Gan, *et al.*, 2003; Sandu, Ryoo and Steller, 2010; Morishita *et al.*, 2013). La nécessité de cet adressage n'est pas étonnante puisque dIAP1 et ses cibles, les caspases initiateur Dronc et effectrice Drice, se localisent au niveau de la mitochondrie durant

l'apoptose. Chez la drosophile, la mitochondrie est donc d'avantage décrite comme un point de rendez-vous pour les caspases et leurs régulateurs qu'un élément actif de déclenchement de l'apoptose.

Au-delà de la chute de potentiel membranaire et de la perméabilisation de la MEM, la morphologie mitochondriale est affectée au cours de l'apoptose. On observe une fission du réseau nécessaire à l'apoptose chez les mammifères et la drosophile (Arnoult *et al.*, 2005; Goyal *et al.*, 2007). La diminution d'expression de *drp1*, principal effecteur de cette fission, inhibe l'activation des caspases chez la drosophile (Abdelwahid *et al.*, 2007) et la retarde chez les mammifères (Tanaka and Youle, 2008). Son effet est donc situé à un stade tardif dans le déclenchement de l'apoptose. L'activation de l'apoptose que nous mettons en évidence place l'action de Drp1 en amont de la voie JNK qui ira activer des gènes pro-apoptotiques tel que *rpr*. Une fois produite, Rpr ira inhiber DIAP1 à la mitochondrie ce qui lèvera, seulement à ce moment-là, l'inhibition des caspases. Dans la voie d'induction de l'apoptose par Rbf1, Drp1 a, au minimum, une activité en amont de Rpr alors qu'elle est impliquée en aval de cette protéine dans l'étude (Abdelwahid *et al.*, 2007). Cependant, l'action de Rpr sera d'autant plus efficace si les mitochondries sont déjà fragmentées et prêtes pour l'activation des caspases.

Debcl est décrit comme ayant un rôle dans la mort cellulaire programmé au cours du développement du système nerveux central mais sa forme muté induit une plus grande sensibilité à l'apoptose déclenchée par irradiation (Galindo *et al.*, 2009). Debcl aurait donc un rôle antagoniste dans l'apoptose en fonction de la manière dont elle est déclenchée. De plus, sa mutation n'est pas associée à des changements de morphologie mitochondriale dans les glandes salivaires et les disques imaginaux d'ailes (Galindo *et al.*, 2009). Debcl peut avoir un rôle pro-apoptotique dans les cellules différenciées du système nerveux mais son inactivation par mutation n'a pas d'effet sur l'apoptose induite par irradiation des cellules en prolifération du disque imaginal d'aile. Nos résultats complète ces observation en démontrant que Debcl peut avoir un rôle dans une autre voie que celle induite par irradiation et que ce rôle passe par le déclenchement de modification de la dynamique mitochondriale.

Le rôle de Debcl passe par la stabilisation de Drp1 à la mitochondrie. Cette interaction n'a jamais été décrite par le passé et une étude plus détaillée de sa régulation est en cours au laboratoire. C'est le travail de Juliette Bertheault de Noiron actuellement en thèse. Elle s'intéresse aux modifications post-traductionnelles qui pourraient affecter Drp1 et expliquer sa stabilisation à la mitochondrie dans le contexte de surexpression de Rbf1. De plus, une

étude par spectrométrie de masse est en projet qui permettrait de déterminer les protéines interagissant avec Debcl et Drp1 à la mitochondrie.

3. Le stress oxydant dans la voie apoptotique

Chez la drosophile, plusieurs études ont déjà montré une corrélation entre l'activation des caspases et l'accumulation d'EAO dans les cellules apoptotiques (Siddique *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010). De la même façon, l'utilisation d'ARNs interférant dirigés contre les *sod1* et *sod2* dans les neurones dopaminergiques conduit à une augmentation des EAO et est associée à une perte de neurones dépendante des RHGs (Oka *et al.*, 2015). De plus, un mécanisme de déclenchement de l'apoptose par accumulation d'EAO a pu être observé dans un modèle de mutation nulle pour *selD*, homologue de drosophile de *selenophosphate synthetase type 1*, un gène important dans la production des sélénocystéines. Dans ce modèle, l'accumulation des EAO entraîne une stabilisation de dmp53, qui induit la transcription de *rpr* (Morey, Corominas and Serras, 2003). Il a aussi été montré que la diminution de l'expression de *dOSCP1* (*drosophila organic solute carrier partner 1*) dans les disques imaginaux d'œil génère des EAO. De plus, une apoptose nécessitant une inhibition de Buffy et une activation de Debcl est observée (Huu, Yoshida and Yamaguchi, 2015). Nos résultats sont cohérents avec ceux observés puisqu'ils soulignent l'importance de l'accumulation d'EAO dans l'apoptose induite par Rbf1 ou Debcl.

L'approche par cytométrie en flux sur des cellules isolées et marquées au MitoSOX, a été menée sur nos modèle de surexpression de *rbf1* sous contrôle du pilote *vestigial-gal4* et *debcl* sous contrôle du pilote *patched-gal4*. Dans les deux cas l'expression de *sod2*, codant pour une protéine réduisant les EAO à la mitochondrie, empêche cette augmentation et protège de l'apoptose. De plus, cette accumulation n'est pas observée en contexte mutant pour Drp1. On peut donc avancer que l'accumulation des EAO à lieu en aval de Debcl et nécessite Drp1 et surtout qu'elle joue un rôle dans la transmission du signal apoptotique.

Le lien entre Debcl/Drp1 et l'accumulation des EAO n'est cependant pas élucidé pour le moment. La corrélation forte qui a pu être révélée dans les études précédemment citées vont dans ce sens. Ce lien pourrait être dû à des modification affectant la chaîne respiratoire qui est le principal générateur d'EAO dans la mitochondrie. L'étude des partenaires de Debcl et Drp1 dans le déclenchement des évènements mitochondriaux conduisant à l'apoptose permettraient d'en comprendre davantage sur ce lien. De plus, la relation de cause à effet

entre l'accumulation d'EAO et l'activation de la voie JNK aboutissant à l'apoptose reste à éclaircir. Rac1 a déjà été décrite comme pouvant être activée de manière dépendante des EAO (Heo and Campbell, 2005). Il pourrait être judicieux d'approfondir la mécanique moléculaire à l'œuvre au moment de l'activation de Rac1, en cherchant les modifications post-traductionnelles que les EAO pourraient induire chez elle dans notre modèle.

Par ailleurs, le laboratoire avait pu démontrer que le déclenchement de la prolifération induite par apoptose (*AiP* pour *Apoposis-induced Prolifération*) nécessite la transmission du signal par la voie de signalisation JNK (Clavier *et al.*, 2016). D'autres résultats récents mettent aussi en évidence l'implication des EAO dans l'*AiP* en amont de l'activation de cette voie. L'activation de la voie JNK est observée par l'utilisation des rapporteur *puc-lacZ* et *TRE-DsRed*. Ces rapporteurs indiquent que l'activation de la voie JNK et de l'*AiP* est dépendante de la transmission d'un faible niveau d'EAO des cellules apoptotiques vers les cellules survivantes voisines (Santabárbara-Ruiz *et al.*, 2015). Le rôle des EAO n'est donc pas si évident à établir au niveau d'un tissu entier mais notre étude participe à la caractérisation de sa capacité de transmission du signal apoptotique.

4. Le rôle de la mitophagie dans l'apoptose

Les résultats concernant l'interaction génétique entre *rbf1* et *MARF*, *PINK1* ou *parkin* laissent imaginer un rôle de la mitophagie dans le phénotype induit par *Rbf1*. La forte diminution de la quantité de *MARF*, *PINK1* ou *Parkin* par ARN interférant mène à une diminution du niveau d'apoptose induite par *Rbf1*. Or, ces trois protéines participent à l'initiation du processus de mitophagie. Pourtant la mitophagie est généralement associée à un effet protecteur par rapport à l'apoptose. En entraînant la dégradation des mitochondries défectueuses, la cellule est protégée de leur accumulation qui pourrait aboutir au déclenchement de l'apoptose. Les mutations des gènes *PINK1* et *parkin* sont d'ailleurs associées à une diminution de la durée de vie (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006) et à la neurodégénérescence, signe d'une mort neuronale. Le fait de *MARF*, une mitofusine, agisse dans le même sens que *Drp1*, acteur de la fission mitochondriale, vis-à-vis de l'apoptose, peut vouloir dire que son rôle n'est pas corrélé à celui qu'elle a dans la fusion mitochondriale. L'implication des gènes *PINK1* et *parkin* renforce l'hypothèse de l'implication de la mitophagie dans laquelle les trois gènes sont impliqués. Il est cependant possible que ces gènes agissent de manière indépendante à leur rôle dans ce processus.

Par exemple, chez la drosophile, PINK1 permet le bon assemblage de la chaîne respiratoire en favorisant la fission mitochondriale (Liu *et al.*, 2011). Il a aussi été montré que, chez les mammifères, Drp1 et Parkin peuvent être recrutées à proximité de PINK1 (Buhlman *et al.*, 2014). Drp1 favorise alors la dégradation induite par PINK1 des mitochondries dysfonctionnelles de manière dépendante à Parkin (Buhlman *et al.*, 2014). D'ailleurs l'induction de Drp1 pendant 7 jours sur des mouches âgées de 30 jours augmente leur durée de vie et améliore leur santé. Ces améliorations nécessitent un processus autophagique fonctionnel et sont associées à une augmentation du contrôle qualité mitochondrial (Rana *et al.*, 2017). Les liens entre Drp1 et le couple PINK1/Parkin sont donc particulièrement prometteurs au vu de la littérature. L'étude des partenaires de Drp1 dans l'apoptose induite par Rbf1 permettra peut-être de révéler une interaction avec ses protéines. De plus, l'étude des modifications post-traductionnelles de Drp1 pourraient révéler l'implication de la kinase PINK1 et/ou de l'ubiquitine-ligase Parkin. Comme écrit précédemment, ces travaux sont en cours au laboratoire.

Des liens ont aussi été montrés entre la famille Bcl-2 et la mitophagie. La protéine pro-apoptotique BCL2 like 13, aussi appelée BCL-RAMBO, est l'homologue de mammifère d'ATG32, un récepteur mitochondrial de *Saccharomyces cerevisiae* impliqué dans la mitophagie (Kataoka *et al.*, 2001; Murakawa *et al.*, 2015). Lorsque *bcl2l13* est exprimé chez la drosophile, BCL2 like 13 se localise à la mitochondrie et induit des changements morphologiques aberrants chez l'adulte. Ces aberrations sont dues à de l'apoptose au cours du développement. Cependant, il n'est pas observé d'interaction génétique et physique entre BCL2 like 13 et Debcl ou Buffy (Nakazawa *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que, si *atg8a* (*LC3*), impliqué dans l'autophagie et la mitophagie, est muté, le phénotype d'aberrations morphologiques induit par *bcl2l13* lorsqu'il est exprimé dans l'œil, est supprimé (Nakazawa *et al.*, 2016). Il n'est pas à exclure que Debcl puisse avoir la capacité d'interagir à la mitochondrie avec des protéines comme PINK1 pour favoriser l'autophagie. Dans les cellules de mammifère, les membres de la famille Bcl-2 s'opposent à la mitophagie en empêchant Parkin d'être recrutée à la surface des mitochondries dépolarisées alors que son adressage mitochondrial est favorisé par les membres de la famille Bcl-2 ne possédant que le domaine BH3 ou mimant BH3 (Hollville *et al.*, 2014). Chez la drosophile, une étude a montré que Buffy interagit génétiquement avec PINK1 et Parkin en supprimant les phénotypes d'œil induit par la perte de Parkin ou la diminution d'expression de PINK1 (Angale and Staveley, 2016). La drosophile

a été très utilisée pour étudier la maladie de Parkinson. La capacité à simuler la dégénérescence des neurones dopaminergiques en font un outil particulièrement puissant dans l'étude du couple PINK1/Parkin (pour revue voir Von Stockum *et al.*, 2016). Les deux protéines sont impliquées dans l'apoptose induite par Rbf1 ce qui incite à explorer en priorité les activités intégrant les deux protéines. Il n'est cependant pas à exclure que des événements déclenchés par PINK1 sans Parkin puissent avoir lieu.

Nous n'avons malheureusement pas pu démontrer l'intervention de l'autophagie, et *a fortiori* de la mitophagie, dans les cellules surexprimant *rbf1*. Notre approche par microscopie confocale n'a pas été suffisante pour établir une colocalisation entre notre marqueur de l'autophagie Ref(2)P et le marqueur mitochondriale mitoGFP. Nous ne pouvons pas exclure qu'une perte importante de la fluorescence du marqueur mitoGFP soit induite lorsque la mitochondrie est altérée par le processus apoptotique. Afin de remédier à cette problématique, il pourrait être intéressant de poursuivre cette étude par l'observation en microscopie électronique de ces cellules. Cette méthode viserait à s'assurer de la localisation mitochondriale des protéines de l'autophagie telles que Parkin, Ref(2)P ou Atg8a (LC3). De plus, de nouvelles méthodes ont été mises au point récemment dans laquelle, la production d'une protéine fluorescente résistante à la dégradation par les enzymes lysosomiales, mt-Keima, permet l'observation du processus autophagique (Cornelissen *et al.*, 2018). Cette nouvelle méthode permettrait de trancher sur l'implication de la mitophagie dans l'apoptose induite par Rbf1. Si cette implication est avérée, les mécanismes moléculaires lui donnant la capacité de favoriser l'apoptose restent à mettre en évidence. Dans le cas contraire, il serait intéressant de se centrer davantage sur les fonctions de kinase de PINK1 et d'ubiquitine ligase de Parkin par l'étude de leurs partenaires qui pourraient compter Debcl et Drp1.

B. Le rôle de la traduction dans l'apoptose induite par Rbf1

1. Rbf1 et PABP

Plusieurs travaux décrivent une baisse de la traduction au cours de l'apoptose. En effet, l'apoptose entraîne une forte diminution de la traduction générale en régulant l'activité des acteurs de la traduction générale par changement de leur état de phosphorylation ou clivage par les protéases (pour revue voir Liwak, Faye et Holcik, 2012). Cependant, une voie alternative existe. Celle-ci nécessite des sites internes de recrutement de ribosomes (IRES) qui permettent la traduction spécifique d'ARNm issus de gènes ayant un rôle dans l'apoptose comme *dmyc* chez la drosophile (Liwak, Faye and Holcik, 2012). Nous avons mis en évidence que la machinerie traductionnelle n'inhibe pas l'apoptose induite par Rbf1 mais qu'un ou plusieurs mécanismes sont induits permettant de compenser la perte de tissu. En effet, la surexpression de *PABP* dans l'aile permet de supprimer les phénotypes d'encoche observés en réponse à la surexpression de *rbf1*. De manière étonnante, cet effet n'est pas dû à une diminution de l'apoptose au moment du stade larvaire puisque la surexpression de *PABP* induit elle-même de l'apoptose et que la co-expression de *pAbp* et *rbf1* induit plus d'apoptose que la surexpression de *rbf1* seul. Malgré cette apoptose induite au stade larvaire, la surexpression de *pAbp* mène à un phénotype sauvage laissant penser qu'un mécanisme de compensation est à l'œuvre pour maintenir l'homéostasie tissulaire au cours du développement. Premier mécanisme de compensation testé, il n'est pas observé davantage de prolifération dans le cas de la co-expression de *rbf1* et *pAbp* par rapport à l'expression de *rbf1* seul. L'augmentation du nombre de cellules apoptotiques n'est donc pas corrélée à une augmentation de la prolifération compensatoire. Ce mécanisme n'explique pas la diminution du phénotype d'aile induite chez l'adulte. Nous avons étudié l'implication d'autres membres ou régulateurs du complexe d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe dans ce mécanisme de compensation. L'inhibition de l'expression de eIF4E, qui est une sous-unité du complexe eIF4F, aggrave le phénotype d'aile induit par Rbf1, tandis que sa surexpression permet une suppression du phénotype d'aile induit par Rbf1 sans pour autant inhiber l'apoptose au stade larvaire. De manière cohérente, l'inhibition de eIF4E par la surexpression de la kinase Lk6 a l'effet inverse. Ces résultats sont en accord avec un rôle de la traduction

dépendante de la coiffe dans le mécanisme de compensation. De façon surprenante, 4EBP, un autre inhibiteur de eIF4E à l'effet opposé. Cependant, cette contradiction apparente peut s'expliquer par le rôle de 4EBP dans la biogenèse mitochondriale et la résistance au stress oxydant (Tettweiler *et al.*, 2005; Zid *et al.*, 2009; Morita *et al.*, 2013). Nous avons d'ailleurs observé que la surexpression de 4EBP permet d'inhiber l'apoptose induite par Rbf1.

Des mécanismes de maintien de l'homéostasie tissulaire ont déjà pu être mis en évidence au laboratoire dans différents contextes. Il a ainsi été montré que l'apoptose induite par *rbf1* induisait de la « prolifération en réponse à l'apoptose » (AiP) à partir des cellules à proximité des cellules ayant engagé le processus apoptotique (Clavier *et al.*, 2016). Une autre équipe du laboratoire a mis en évidence qu'un stress chronique de RE pouvait induire l'apoptose au cours du développement de l'aile mais que l'homéostasie tissulaire était préservée par l'induction d'un retard de développement (Demay *et al.*, 2014). De façon inattendue, nous n'avons pas identifié de mécanisme compensatoire induit par PABP dans le phénotype d'aile induit par Rbf1 puisqu'il n'a pas été mis en évidence d'augmentation de la prolifération dans les contextes de co-expression de *pAbp* et *rbf1* par rapport à la surexpression de *rbf1* seul. Par ailleurs, l'étude du temps d'éclosion des mouches a révélé que la surexpression de *pAbp* seule n'entraîne pas un allongement du temps de développement. Cependant, la co-expression de *pAbp* et *rbf1* induit une augmentation de ce temps par rapport à la surexpression de *rbf1* seule. Si *pAbp* semble induire d'autres mécanismes compensatoires pour empêcher la perte de tissu observée chez l'adulte, il est possible que la suppression du phénotype observable en contexte de co-expression soit due à cet allongement du temps de développement. Ce mécanisme a déjà pu être observé dans d'autres cas d'induction de l'apoptose au cours du développement. Par exemple, l'induction d'apoptose par un stress du RE déclenche des mécanismes de compensation impliquant un allongement du temps de développement pour permettre au tissu de maintenir son homéostasie (Demay *et al.*, 2014).

Ce résultat indique que le retard de développement pourrait être le mécanisme permettant d'inhiber l'apparition d'encoche au niveau de l'aile malgré l'augmentation importante de l'apoptose au cours du développement.

2. La traduction et l'apoptose

Nous n'avons que peu de données concernant un lien potentiel entre Rbf1 et la traduction, si ce n'est qu'il existe un locus de recrutement de Rbf1 au niveau de gènes impliqués dans la coiffe d'ARNm nécessaire à l'initiation de leur traduction. Sont ainsi recensées les cibles potentielles : *rpl40* (Ribosomal protein L40), *eIF3* (eukaryotic initiation factor 3), *s6k* (RpS6 kinase), *4E-BP* (eIF4E-binding protein) et *paip2* (PABP-interacting protein 1) (Acharya *et al.*, 2012).

De manière étonnante, l'importance de la mitochondrie dans l'apoptose induite par Rbf1 pourrait aussi être reliée à son activité traductionnelle. En effet, il a été mis en évidence que les importants changements phénotypiques induits par la mutation de *PINK1* peuvent être supprimés par une réduction de l'activité traductionnelle et aggravés par son augmentation (Liu and Lu, 2010). Cette interaction semble être à imputer à l'importance de *PINK1* et *Parkin* dans la localisation de la traduction des éléments de la chaîne respiratoire à la membrane externe mitochondriale (Gehrke *et al.*, 2015). En effet, la mutation de *PINK1* entraîne une perte d'adressage de l'ARNm des éléments de la chaîne respiratoire à la surface mitochondriale. Or cet adressage est régulé par *Pumilio*. Des résultats complémentaires non présentés, montrent un effet important de *Pumilio* dans l'apoptose induite par Rbf1 puisque l'ARNi dirigé contre *pumilio* induit une suppression importante de l'apoptose induite par Rbf1 au stade larvaire et une suppression totale du phénotype d'encoche chez l'adulte. Cependant, si *Pumilio* est nécessaire à l'apoptose induite par Rbf1, il reste à déterminer si son implication est reliée à son rôle dans la traduction générale au niveau de la mitochondrie ou à un contrôle de la traduction de facteurs spécifiques. Des liens entre *rbf1* et *pumilio* ont déjà été montrés puisque Rbf1 et dE2F2 répriment l'expression de *pumilio* ainsi que celle de ses partenaires *nanos* et *brat* (Miles *et al.*, 2014). Les complexes dREAM (formé notamment par Rbf1 et dE2F2) et *Pumilio* (formé par *Pumilio*, *Nanos* et *Brat*) interagissent d'ailleurs génétiquement entre eux (Miles *et al.*, 2014). L'implication de *Pumilio* dans l'apoptose induite par Rbf1 pourrait indiquer que la répression de la traduction au niveau mitochondriale participe au signal apoptotique. En son absence, la voie apoptotique déclenchée par Rbf1 est très fortement inhibée ce qui peut indiquer qu'une traduction trop efficace de certains ARNm ciblés par *Pumilio* est délétère pour cette apoptose. Il serait intéressant, dans un premier temps, de tester si les partenaires

de Pumilio, Nanos et Brat, et les ARNm qu'ils ciblent interagissent génétiquement avec *rbf1* dans l'apoptose induite par Rbf1.

C. Conclusion

La première partie des résultats présentés dans cette thèse apportent un complément d'information concernant à la voie d'apoptose déclenchée par Rbf1. Rbf1 induit la diminution de l'expression de *buffy*, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Cette diminution a pour effet de diminuer la quantité de Buffy dans la cellule ce qui permet l'activation de Debcl, pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Debcl permet alors le recrutement et la stabilisation de Drp1 à la mitochondrie où elle a pour capacité de s'oligomériser pour induire la fission mitochondriale. Cette fragmentation du réseau mitochondriale est corrélée à une accumulation des EAO mitochondriales, elle aussi dépendantes de l'activation de Debcl et Drp1. Ces événements déclenchent l'activation de la voie Jun kinase (JNK) aboutissant à l'apoptose de la cellule. J'ai également pu mettre en évidence l'implication de MARF, PINK1 et Parkin, des protéines connues comme étant des effecteurs de la mitophagie. Ces protéines semblent favoriser le processus apoptotique mais nous manquons encore d'éléments permettant de les placer finement dans la voie induite par Rbf1. Cependant, les liens entre la mitophagie et les EAO mitochondriales, ainsi que l'implication de PINK1 dans l'apoptose induite par Debcl, semblent indiquer que leur activité se situe en aval de l'action de Debcl et Drp1 et en amont de l'activation de la voie JNK.

La seconde partie de mes travaux a constitué à chercher s'il existait une implication de la traduction dans l'apoptose induite par Rbf1. Il apparaît clairement que certains des gènes de la machinerie traductionnelle dont nous avons pu tester l'interaction avec *rbf1*, sont capables de supprimer le phénotype induit par Rbf1 chez l'adulte. Pour autant, l'apoptose au stade larvaire n'est pas diminuée. L'étude des mécanismes de compensation a permis d'établir que cette compensation ne passe pas par une augmentation de prolifération compensatoire. De plus, la surexpression de *rbf1* n'induit pas de diminution de la traduction générale qui aurait pu être compensée par l'action de PABP. Des résultats préliminaires font penser qu'un allongement du temps de développement pourrait être à l'origine de la suppression du phénotype d'encoche induite par Rbf1 chez l'adulte.

Ces deux études menées en parallèle ont permis de préciser l'activité de Rbf1 dans l'apoptose. Ces travaux renforcent l'importance de la mitochondrie dans l'apoptose chez la

drosophile. Ils permettent ainsi d'ouvrir des pistes de recherche sur l'induction de l'apoptose par pRb chez les mammifères et contribuent à la compréhension de son rôle de suppresseur de tumeur.

Matériel & Méthodes

A. Génétiques

1. Les drosophiles

Les drosophiles ont un cycle de vie composé de 4 grande phases : embryonnaire, larvaire, pupale et adulte. Les moyennes des temps de développement sont de 1 jour, 4,5 jours, 3,5 jours et 50 jours à 25°C. La femelle peut se faire féconder 8 heures après l'émergence de la pupa. Cela permet un passage de l'œuf dont la femelle est issue jusqu'à l'œuf qu'elle pond elle-même allant de 8 jours à 29°C à 16 jours à 18°C. Cette durée est de 10 jours si les mouches sont élevées à la température optimale de 25°C.

Les embryons sont des œufs blancs mesurant 0,5mm. La phase larvaire permet le développement des disques imaginaux qui sont les structures à l'origine de certains des organes observés chez l'adultes comme les ailes, les pattes et les yeux. La métamorphose ayant lieu dans la pupa permet le développement de ces organes pour leur donner leur forme finale. Les femelles sont généralement fécondées une unique fois dans leur vie. Elles utilisent alors des spermatozoïdes stockés dans une spermathèque pour féconder et pondre, en moyenne, 1000 à 1500 œufs au cours de leur vie (avec un maximum autour de 3000).

a. Le système UAS/Gal4

L'utilisation poussée du modèle *D. melanogaster* pour l'étude génétique de processus cellulaires et physiologiques a incité la communauté à développer des outils puissants permettant sa manipulation comme le système UAS/Gal4 issu de la levure. Chez celle-ci, la séquence UAS (Upstream Activating Sequence) est spécifiquement reconnue par le facteur de transcription Gal4 permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Chez une drosophile comportant le gène Gal4 sous un promoteur spécifique et une autre possédant une séquence d'intérêt en aval de la séquence UAS, cette séquence est induite dans les cellules où ce promoteur est actif comme si elle était directement sous ce promoteur. Il est ainsi possible d'exprimer spécifiquement un gène ou un ARNi dans une souche possédant le système complet.

b. Les chromosomes balanceurs

Les chromosomes balanceurs sont des chromosomes aberrants utilisés pour le maintien de d'éléments génétiquement modifiés au sein d'une souche de drosophile. Ces chromosomes possèdent toute l'information génétique d'un chromosome normal mais présentent un réarrangement conséquent dans l'organisation de cette information. Ainsi, les crossing-over se passant chez les femelles au moment de la formation de gamète ne sont plus possibles ou tellement délétères que les œufs ne sont pas viables. L'ensemble des transgènes insérés et/ou des mutations induites sur le chromosome associé ségrégent alors forcément ensemble au cours de la méiose. Au moins un marqueur phénotypique létal homozygote est porté par le chromosome balanceur permettant d'identifier quel chromosome entre le balanceur et celui d'intérêt a été hérité. Ces souches sont donc particulièrement pratiques pour les mutations ne permettant un maintien homozygote viable.

2. Test d'interaction génétique

Ils visent à mettre en évidence l'implication de deux gènes dans un même processus cellulaire ou physiologique. Pour ces tests, un phénotype de référence est produit par l'un des gènes d'intérêt. Dans cette étude, c'est principalement le phénotype d'encoche induit par la surexpression de *rbf1* dans le domaine vestigial qui est utilisé comme référence. La modification de ce phénotype par la présence d'une surexpression, d'une mutation ou l'expression d'un ARN interférant (ARNi) spécifique d'un autre gène traduit potentiellement de l'importance de ce gène dans le phénotype testé. Les ARNi dirigés contre *MARF*, *PINK1* et *Parkin* qui ont été retenus pour les figures 31 à 37 ont une efficacité prouvée dans la littérature : (Hwang *et al.*, 2014) pour le *RNAi-MARF* (JF01650 TRIP), (Liu *et al.*, 2016) pour le *RNAi-PINK1* (JF01203 TRIP) et (Srivastav *et al.*, 2015) pour le *RNAi-Parkin* (JF01200 TRIP).

Pour tester une interaction génétique, des femelles vierges d'un génotype sont croisées avec des mâles d'un autre génotype. Afin de s'assurer de la virginité de ces premières, elles sont récupérées très tôt (8 à 10 heures) après leur éclosion. Un tube de croisement est composé de manière optimale de 15 femelles vierges (♀) et de 5 mâles (♂). Les croisements sont repiqués tous les 3 jours maximums pour éviter la saturation des tubes en larve qui peut induire notamment une diminution de la taille. Tous les individus issus d'un tube sont observés afin de s'assurer que toute la population d'une génération soit prise en compte.

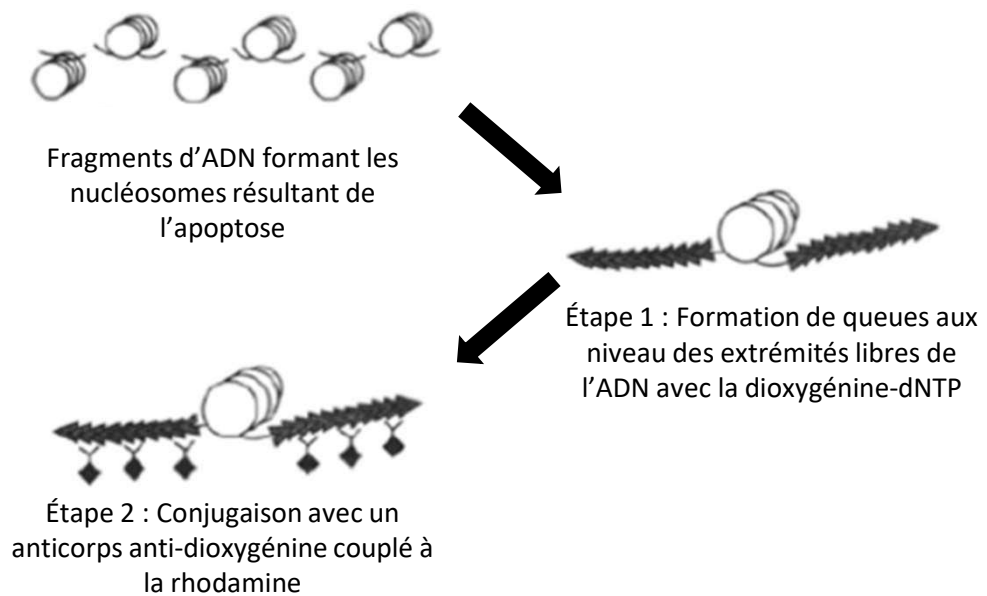


Figure 38. Principe de marquage TUNEL

La dégradation de l'ADN au cours de l'apoptose n'atteint pas l'ADN située au sein des nucléosomes. Des bases (dNTP) couplées à la dioxygénine forment des queues au niveau des extrémités libres de ces brins d'ADN au cours de la première étape de marquage. La deuxième étape consiste à conjuguer des anticorps anti-dioxygénine couplés à la rhodamine au niveau de la la dioxygénine associée à ces brins d'ADN. Dans les cellules apoptotiques, les extrémité libres de brins d'ADN sont nombreuses et permettent un marquage important à la rhodamine.

Adapté de : Mohan *et al.*, 2015

Dans le cas des phénotypes d'aile, les phénotypes d'encoche sont comptabilisés en fonction de la force du phénotype, allant de sauvage (pas d'encoche) à fort (4 encoches ou plus) en passant par faible (1 encoche) et moyen (2 ou 3 encoches). Les encoches chevauchant une veine étant très probablement issues de deux événements distincts, elles comptent comme deux encoches pour la répartition des phénotypes.

Un test statistique de Wilcoxon est alors appliqué permettant de déterminer si les différences observées dans la répartition des phénotypes sont suffisamment importantes pour être considérées comme significatives. Le seuil statistique est fixé à 10^{-3} .

B. Biologie cellulaire

Des techniques de marquages cellulaires ont été utilisées pour permettre l'observation de processus ayant lieu dans les tissus larvaires à l'origine de l'aile ainsi que la présence de protéines d'intérêts et leur localisation au niveau cellulaire.

1. Dissection de larves

Les larves sont récupérées 6 jours après le lancement des croisements. 30 individus par génotypes sont isolés et rincés dans du PBS (*phosphate buffered saline*). Les larves sont ensuite retournées pour permettre l'exposition des tissus internes et les corps gras ainsi que le tube digestif sont retirés. Une fois que l'ensemble de l'échantillon a été traité, les cuticules sont fixées par 20 minutes d'incubation dans du PBS contenant du formaldéhyde à 3,7% sous agitation. S'en suit 3 rinçage de 5 minutes en PBT (1× PBS, 0.5% Triton X-100).

2. Observation de l'apoptose par marquage TUNEL

Le processus apoptotique implique forcément un événement de dégradation du noyau et de son contenu, ce qui se traduit par la formation de cassure dans l'ADN qu'il contient. Le marquage TUNEL permet l'observation des brins d'ADN libres. Le processus est récapitulé dans la Figure 38 (Mohan *et al.*, 2015).

Les disques imaginaux d'aile sont isolés des carcasses. Le marquage des cellules apoptotique est permis par l'utilisation du kit de détection *In Situ* ApopTag® S7165 de Millipore sur les disques imaginaux isolés, en suivant les instructions du fabricant. Ceux-ci sont ensuite montés entre lames et lamelles dans du milieu de montage Citifluor™ (Biovalley).

3. Immunofluorescence

Les autophagosomes sont révélés par immunomarquage.

Suite à la dissection des larves décrite précédemment, les cuticules sont incubées 1 heure dans du PBT contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF). Elles peuvent alors être exposé aux anticorps primaires anti-ref(2)P de lapin (fourni par l'équipe de Sébastien Gaumer provenant de Didier Contamine, 1/400^{ème}) pendant 2h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Elles sont ensuite rincées 3 fois au PBT pendant 5 minutes. Pour finir, les échantillons sont incubés avec des anticorps secondaire anti-lapin émettant dans le rouge (Alexa Fluor®, 568, A11011, Invitrogen, 1/200^{ème}) pendant 1h30 à température ambiante.

Les disques imaginaux sont alors isolés des carcasses de larve et sont montés entre lame et lamelle dans du milieu de montage Citifluor™ (Biovalley).

4. Observation en microscopie confocal

Les échantillons sont ensuite observés au microscope confocal Leica SPE pour l'observation des marquages TUNEL et de l'immunofluorescence anti-PH3. Le grossissement nécessaire à l'observation mitochondriale et des autophagosomes a nécessité l'utilisation d'un microscope confocal Leica SP8. Chacun des disques est acquis sur toute son épaisseur par l'accumulation de plusieurs plans d'acquisition appelé « coupe ». Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ complété par un ensemble de plugin appelé Fiji.

5. Quantification des cellules apoptotiques

Afin de permettre une quantification la plus reproductible possible, la fonction « Process/ Find Maxima... » d'ImageJ a été utilisé. Dans un premier temps, l'ensemble des coupes d'un disque est empilé (« Image/Stacks/Z Project... »). La surface de la poche du disque imaginal d'aile est délimitée par l'outil « Freehand selections ». Enfin, la fonction « Find Maxima... » est utilisée de manière à régler le seuil de détection permettant de compter une fois chaque point de marquage. Les critères sont reportés d'un disque à l'autre au sein d'un même génotype. Le décomptes de cellules positives au TUNEL et la taille de la poche sont retenus pour l'analyse statistique.

6. Analyse statistique

Le nombre de cellules apoptotiques est rapporté à la taille du disque (en unité arbitraire) calculé par imagJ. Une moyenne est calculée par génotype. Les valeurs sont comparées deux à deux et leur significativité est testée grâce au test de Student. Le seuil de significativité est fixé à 10^{-2} .

Bibliographie

Abbott, M. K. and Lengyel, J. A. (1991) 'Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective.', *Genetics*, 129(3), pp. 783–9. PMID: 1752422.

Abdelwahid, E. *et al.* (2007) 'Mitochondrial Disruption in *Drosophila* Apoptosis', *Developmental Cell*, 12(5), pp. 793–806. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.004.

Acharya, P. *et al.* (2010) 'Paradoxical instability-activity relationship defines a novel regulatory pathway for retinoblastoma proteins.', *Molecular biology of the cell*, 21(22), pp. 3890–901. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0520.

Acharya, P. *et al.* (2012) 'Evidence for autoregulation and cell signaling pathway regulation from genome-wide binding of the *Drosophila* retinoblastoma protein', *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(11), pp. 1459–1472. doi: 10.1534/g3.112.004424.

Achleitner, G. *et al.* (1999) 'Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact', *European Journal of Biochemistry*, 264(2), pp. 545–553. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00658.x.

Adams, P. D. *et al.* (1999) 'Retinoblastoma Protein Contains a C-terminal Motif That Targets It for Phosphorylation by Cyclin-cdk Complexes', *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), pp. 1068–1080. doi: 10.1128/MCB.19.2.1068.

Aerts, L. *et al.* (2015) 'PINK1 Kinase Catalytic Activity Is Regulated by Phosphorylation on Serines 228 and 402', *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 2798–2811. doi: 10.1074/jbc.M114.620906.

Ahlander, J. and Bosco, G. (2009) 'Sqd interacts with the *Drosophila* retinoblastoma tumor suppressor Rbf.', *Biochemical and biophysical research communications*, 383(3), pp. 363–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.018.

Ahlander, J., Chen, X. B. and Bosco, G. (2008) 'The N-terminal domain of the *Drosophila* retinoblastoma protein Rbf1 interacts with ORC and associates with chromatin in an E2F independent manner', *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002831.

Akepati, V. R. *et al.* (2008) 'Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues.', *Journal of neurochemistry*, 106(1), pp. 372–83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x.

Al-Furoukh, N. *et al.* (2015) 'ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein

response (UPRmt) in mammalian cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1853(10), pp. 2580–2591. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2015.06.016.

Ambrus, A. M. *et al.* (2013) 'Loss of dE2F Compromises Mitochondrial Function', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 27(4), pp. 438–451. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.002.

An, B. and Dou, Q. P. (1996) 'Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: An interleukin 1 β -converting enzyme-like protease as candidate', *Cancer Research*, 56(3), pp. 438–442. PMID: 8564948.

Anesti, V. and Scorrano, L. (2006) 'The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton.', *Biochimica et biophysica acta*, 1757(5–6), pp. 692–9. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.04.013.

Angale, P. G. M. and Staveley, B. E. (2016) 'Overexpression of Buffy enhances the loss of parkin and suppresses the loss of Pink1 phenotypes in Drosophila', 7(December), pp. 1–7. doi: 10.1139/gen-2016-0165.

Arena, G. *et al.* (2013) 'PINK1 protects against cell death induced by mitochondrial depolarization, by phosphorylating Bcl-xL and impairing its pro-apoptotic cleavage', *Cell Death and Differentiation*, 20(7), pp. 920–930. doi: 10.1038/cdd.2013.19.

Arias, C. *et al.* (2015) 'Dpp-expressing and non-expressing cells: two different populations of growing cells in Drosophila.', *PloS one*. Edited by E. Moreno, 10(3), p. e0121457. doi: 10.1371/journal.pone.0121457.

Arnoult, D. *et al.* (2005) 'Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation.', *The Journal of biological chemistry*, 280(42), pp. 35742–50. doi: 10.1074/jbc.M505970200.

Asano, M., Nevins, J. R. and Wharton, R. P. (1996) 'Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in Drosophila imaginal discs', *Genes and Development*, 10(11), pp. 1422–1428. doi: 10.1101/gad.10.11.1422.

Baker, M. J. *et al.* (2014) 'Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics.', *The EMBO journal*, 33(6), pp. 578–93. doi: 10.1002/embj.201386474.

Bangs, P., Franc, N. and White, K. (2000) 'Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in Drosophila.', *Cell death and differentiation*, 7(11), pp. 1027–34. doi: 10.1038/sj.cdd.4400754.

Bannister, A. J. *et al.* (2001) 'Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3

by the HP1 chromo domain.', *Nature*, 410(6824), pp. 120–124. doi: 10.1038/35065138.

Baqri, R. M. *et al.* (2014) 'Mitochondrial chaperone TRAP1 activates the mitochondrial UPR and extends healthspan in *Drosophila*', *Mechanisms of Ageing and Development*, 141–142, pp. 35–45. doi: 10.1016/j.mad.2014.09.002.

Basu, K. *et al.* (2017) 'Molecular mechanism of DRP1 assembly studied in vitro by cryo-electron microscopy', *PLOS ONE*. Edited by H. Reddy, 12(6), p. e0179397. doi: 10.1371/journal.pone.0179397.

Baum, J. S. *et al.* (2007) 'The *Drosophila* caspases Strica and Dronc function redundantly in programmed cell death during oogenesis.', *Cell death and differentiation*, 14(8), pp. 1508–17. doi: 10.1038/sj.cdd.4402155.

Becker, D. *et al.* (2012) 'Pink1 kinase and its membrane potential ($\Delta\psi$)-dependent cleavage product both localize to outer mitochondrial membrane by unique targeting mode.', *The Journal of biological chemistry*, 287(27), pp. 22969–87. doi: 10.1074/jbc.M112.365700.

Behm-Ansmant, I. *et al.* (2007) 'A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay', *The EMBO Journal*, 26(6), pp. 1591–1601. doi: 10.1038/sj.emboj.7601588.

Bergmann, A. *et al.* (1998) 'The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of ras-dependent survival signaling', *Cell*, 95(3), pp. 331–341. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81765-1.

Berry, D. L. and Baehrecke, E. H. (2007) 'Growth Arrest and Autophagy Are Required for Salivary Gland Cell Degradation in *Drosophila*', *Cell*, 131(6), pp. 1137–1148. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.048.

Bingol, B. *et al.* (2014) 'The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy', *Nature*. doi: 10.1038/nature13418.

Binné, U. K. *et al.* (2007) 'Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit', *Nature Cell Biology*, 9(2), pp. 225–232. doi: 10.1038/ncb1532.

Birnbaum, M. J., Clem, R. J. and Miller, L. K. (1994) 'An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs.', *Journal of virology*, 68(4), pp. 2521–8. doi: 0022-538X/94/\$04.00+0.

Bossy, B. *et al.* (2010) 'S-Nitrosylation of DRP1 Does Not Affect Enzymatic Activity and is Not Specific to Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*. Edited by X. Zhu *et al.*, 20(s2), pp. S513–S526. doi: 10.3233/JAD-2010-100552.

Bowen, C., Spiegel, S. and Gelmann, E. P. (1998) 'Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein.', *Cancer research*, 58(202), pp. 3275–3281. PMID: 9699655.

Brachmann, C. B. *et al.* (2000) 'The Drosophila Bcl-2 family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation', *Current Biology*, 10(9), pp. 547–550. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00474-7.

Braschi, E. *et al.* (2010) 'Vps35 mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes.', *Current biology : CB*, 20(14), pp. 1310–5. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.066.

Brennecke, J. *et al.* (2003) 'bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila.', *Cell*. United States, 113, pp. 25–36.

Broemer, M. *et al.* (2010) 'Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases.', *Molecular cell*, 40(5), pp. 810–22. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.011.

de Bruin, A. *et al.* (2003) 'Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp. 6546–6551. doi: 10.1073/pnas.1031853100.

Brun, S. *et al.* (2002) 'reaper and bax initiate two different apoptotic pathways affecting mitochondria and antagonized by bcl-2 in Drosophila.', *Oncogene*. England, 21, pp. 6458–6470. doi: 10.1038/sj.onc.1205839.

Buhlman, L. *et al.* (2014) 'Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance.', *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.012.

Burchell, V. S. *et al.* (2013) 'The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy.', *Nature neuroscience*, 16(9), pp. 1257–65. doi: 10.1038/nn.3489.

Burke, J. R. *et al.* (2010) 'Phosphorylation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding', *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp. 16286–16293. doi: 10.1074/jbc.M110.108167.

Burke, J. R. *et al.* (2014) 'Multiple Mechanisms for E2F Binding Inhibition by Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein C-Terminal Domain', *Journal of Molecular Biology*, 426(1), pp. 245–255. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.031.

Buttitta, L. A. *et al.* (2007) 'A Double-Assurance Mechanism Controls Cell Cycle Exit

upon Terminal Differentiation in *Drosophila*', *Developmental Cell*, 12(4), pp. 631–643. doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.020.

Cai, K., Wang, Y. and Bao, X. (2011) 'MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), p. 73. doi: 10.1186/1756-9966-30-73.

Carr, S. M. *et al.* (2011) 'Interplay between lysine methylation and Cdk phosphorylation in growth control by the retinoblastoma protein', *The EMBO journal*, 30(2), pp. 317–327. doi: 10.1038/emboj.2010.311.

Caulfield, T. R. *et al.* (2014) 'Phosphorylation by PINK1 Releases the UBL Domain and Initializes the Conformational Opening of the E3 Ubiquitin Ligase Parkin', *PLoS Computational Biology*. Edited by S. L. Kosakovsky Pond, 10(11), p. e1003935. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003935.

Caulfield, T. R., Fiesel, F. C. and Springer, W. (2015) 'Activation of the E3 ubiquitin ligase Parkin', *Biochemical Society Transactions*, 43(2), pp. 269–274. doi: 10.1042/BST20140321.

Chai, J. *et al.* (2003) 'Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination', *Nature Structural Biology*, 10(11), pp. 892–898. doi: 10.1038/nsb989.

Challa, M. *et al.* (2007) 'Drosophila Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease.', *The EMBO journal*, 26(13), pp. 3144–56. doi: 10.1038/sj.emboj.7601745.

Chan, H. M. *et al.* (2001) 'Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein.', *Nature cell biology*, 3(7), pp. 667–674. doi: 10.1038/35083062.

Chan, N. C. *et al.* (2011) 'Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy', *Human Molecular Genetics*, 20(9), pp. 1726–1737. doi: 10.1093/hmg/ddr048.

Chau, B. N. and Wang, J. Y. J. (2003) 'Coordinated regulation of life and death by RB', *Nature Reviews Cancer*, 3(2), pp. 130–138. doi: 10.1038/nrc993.

Chau, C. M. *et al.* (2008) 'Cell Cycle Association of the Retinoblastoma Protein Rb and the Histone Demethylase LSD1 with the Epstein-Barr Virus Latency Promoter Cp', *Journal of Virology*, 82(7), pp. 3428–3437. doi: 10.1128/JVI.01412-07.

Chellappan, S. P. *et al.* (1991) 'The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein', *Cell*, 65(6), pp. 1053–1061. doi: 10.1016/0092-8674(91)90557-F.

Chen, G. *et al.* (2014) 'A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy.', *Molecular cell*, 54(3), pp. 362–77. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.034.

Chen, H. *et al.* (2003) 'Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development', *Journal of Cell Biology*, 160(2), pp. 189–200. doi: 10.1083/jcb.200211046.

Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D. C. (2005) 'Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(28), pp. 26185–92. doi: 10.1074/jbc.M503062200.

Chen, P. *et al.* (1996) 'grim, a novel cell death gene in *Drosophila*.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10(14), pp. 1773–82. doi: 10.1101/GAD.10.14.1773.

Chen, P. *et al.* (1998) 'Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in *Drosophila*.', *Developmental biology*, 201(2), pp. 202–16. doi: 10.1006/dbio.1998.9000.

Chen, P. L. *et al.* (1996) 'Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs.', *Genes & development*, 10(21), pp. 2794–804. PMID: 8946919.

Chen, Y. and Dorn, G. W. (2013) 'PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria.', *Science (New York, N.Y.)*, 340(6131), pp. 471–5. doi: 10.1126/science.1231031.

Chicas, A. *et al.* (2010) 'Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence', *Cancer Cell*, 17(4), pp. 376–387. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.023.

Cho, D.-H. *et al.* (2009) 'S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury', *Science*, 324(5923), pp. 102–105. doi: 10.1126/science.1171091.

Christensen, J. *et al.* (2007) 'RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri- and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3', *Cell*, 128(6), pp. 1063–1076. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.003.

Chu, C. T. *et al.* (2013) 'Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial

membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells.', *Nature cell biology*, 15(10), pp. 1197–1205. doi: 10.1038/ncb2837.

Ciavarra, G. and Zacksenhaus, E. (2010) 'Rescue of myogenic defects in Rb-deficient cells by inhibition of autophagy or by hypoxia-induced glycolytic shift.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 191(2), pp. 291–301. doi: 10.1083/jcb.201005067.

Cipolat, S. *et al.* (2004) 'OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 101(45), pp. 15927–32. doi: 10.1073/pnas.0407043101.

Clark, I. E. *et al.* (2006) 'Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin', *Nature*, 441(7097), pp. 1162–1166. doi: 10.1038/nature04779.

Clarke, A. R. *et al.* (1992) 'Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development', *Nature*, 359(6393), pp. 328–330. doi: 10.1038/359328a0.

Classon, M. and Dyson, N. (2001) 'p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets.', *Experimental cell research*, 264(1), pp. 135–47. doi: 10.1006/excr.2000.5135.

Claudio, P. P., Tonini, T. and Giordano, A. (2002) 'The retinoblastoma family: twins or distant cousins?', *Genome biology*, 3(9), p. reviews3012. PMID: 12225593.

Claveria, C. *et al.* (2002) 'GH3, a novel proapoptotic domain in Drosophila Grim, promotes a mitochondrial death pathway', *The EMBO Journal*, 21(13), pp. 3327–3336. doi: 10.1093/emboj/cdf354.

Clavier, A. *et al.* (2014) 'The pro-apoptotic activity of Drosophila Rbf1 involves dE2F2-dependent downregulation of diap1 and buffy mRNA.', *Cell death & disease*, 5, p. e1405. doi: 10.1038/cddis.2014.372.

Clavier, A. *et al.* (2015) 'The Drosophila retinoblastoma protein, Rbf1, induces a Debcl- and Drp1-dependent mitochondrial apoptosis', *Journal of Cell Science*, 128(17), pp. 3239–3249. doi: 10.1242/jcs.169896.

Clavier, A. *et al.* (2016) 'Two different specific JNK activators are required to trigger apoptosis or compensatory proliferation in response to Rbf1 in Drosophila', *Cell Cycle*, 15(2), pp. 283–294. doi: 10.1080/15384101.2015.1100776.

Cobrinik, D. (2005) 'Pocket proteins and cell cycle control.', *Oncogene*, 24(17), pp. 2796–809. doi: 10.1038/sj.onc.1208619.

Colón-Ramos, D. A. *et al.* (2006) 'Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of

translation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(2), pp. 103–111. doi: 10.1038/nsmb1052.

Colussi, P. A. *et al.* (2000) 'Debc1, a Proapoptotic Bcl-2 Homologue, Is a Component of the *Drosophila melanogaster* Cell Death Machinery', *The Journal of Cell Biology*, 148(4), pp. 703–714. doi: 10.1083/jcb.148.4.703.

Conradt, B. (2009) 'Genetic Control of Programmed Cell Death During Animal Development', *Annual Review of Genetics*, 43(1), pp. 493–523. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091533.

Cornelissen, T. *et al.* (2014) 'The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy.', *Human molecular genetics*, 23(19), pp. 5227–42. doi: 10.1093/hmg/ddu244.

Cornelissen, T. *et al.* (2018) 'Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in *Drosophila*.', *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.35878.

Costa, A. C., Loh, S. H. Y. and Martins, L. M. (2013) '*Drosophila* Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease', *Cell Death and Disease*, 4(1), p. e467. doi: 10.1038/cddis.2012.205.

Cuesta, A. *et al.* (2002) 'The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease', *Nature Genetics*, 30(1), pp. 22–25. doi: 10.1038/ng798.

Cui, L. *et al.* (2006) 'Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration', *Cell*, 127(1), pp. 59–69. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.015.

Cunningham, C. N. *et al.* (2015) 'USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria.', *Nature cell biology*, 17(2), pp. 160–9. doi: 10.1038/ncb3097.

Dahiya, A. *et al.* (2000) 'Role of the LXCXE binding site in Rb function', *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), pp. 6799–6805. doi: 10.1128/MCB.20.18.6799-6805.2000.

Deas, E. *et al.* (2011) 'PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL.', *Human molecular genetics*, 20(5), pp. 867–79. doi: 10.1093/hmg/ddq526.

Demay, Y. *et al.* (2014) 'The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/SIpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model', *Cell Death and Disease*, 5(10), p. e1452. doi: 10.1038/cddis.2014.403.

Denechaud, P.-D., Fajas, L. and Giralto, A. (2017) 'E2F1, a Novel Regulator of Metabolism', *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers, 8, p. 311. doi: 10.3389/fendo.2017.00311.

Denton, D. *et al.* (2009) 'Autophagy, Not Apoptosis, Is Essential for Midgut Cell Death in *Drosophila*', *Current Biology*, 19(20), pp. 1741–1746. doi: 10.1016/j.cub.2009.08.042.

Dimova, D. K. (2011) 'RB regulation of developmental transcriptional programs', *Fly*, p. 1.

Ditzel, M. *et al.* (2008) 'Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation.', *Molecular cell*, 32(4), pp. 540–53. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.025.

Dorn, G. W. *et al.* (2011) 'MARF and Opa1 control mitochondrial and cardiac function in *Drosophila*', *Circulation Research*, 108(1), pp. 12–17. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236745.

Dorstyn, L. *et al.* (1999) 'DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7.', *The Journal of biological chemistry*, 274(43), pp. 30778–83. doi: 10.1074/jbc.274.43.30778.

Dorstyn, L. *et al.* (1999) 'DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), pp. 4307–4312. doi: 10.1073/pnas.96.8.4307.

Dorstyn, L. *et al.* (2002) 'The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells', *The Journal of Cell Biology*, 156(6), pp. 1089–1098. doi: 10.1083/jcb.2001111107.

Del Dotto, V. *et al.* (2017) 'OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions', *Cell Reports*, 19(12), pp. 2557–2571. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.073.

Doumanis, J. *et al.* (2001) 'STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2.', *Cell death and differentiation*, 8(4), pp. 387–94. doi: 10.1038/sj.cdd.4400864.

Doumanis, J., Dorstyn, L. and Kumar, S. (2007) 'Molecular determinants of the subcellular localization of the *Drosophila* Bcl-2 homologues DEBCL and BUFFY.', *Cell Death Differ.* England, 14, pp. 907–915. doi: 10.1038/sj.cdd.4402082.

Du, W. (2000) 'Suppression of the *rbf* null mutants by a *de2f1* allele that lacks transactivation domain', *Development*, 127(2), pp. 367–379.

Du, W. and Dyson, N. (1999) 'The role of RBF in the introduction of G1 regulation during

Drosophila embryogenesis', *EMBO Journal*, 18(4), pp. 916–925. doi: 10.1093/emboj/18.4.916.

Duncan, K. E., Strein, C. and Hentze, M. W. (2009) 'The SXL-UNR Corepressor Complex Uses a PABP-Mediated Mechanism to Inhibit Ribosome Recruitment to msl-2 mRNA', *Molecular Cell*, 36(4), pp. 571–582. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.042.

Durcan, T. M. *et al.* (2014) 'USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin.', *The EMBO journal*, 33(21), pp. 2473–91. doi: 10.15252/emj.201489729.

Dyer, M. A. and Bremner, R. (2005) 'The search for the retinoblastoma cell of origin', *Nature Reviews Cancer*, 5(2), pp. 91–101. doi: 10.1038/nrc1545.

Dyson, N. J. (2016) 'RB1: A prototype tumor suppressor and an enigma', *Genes and Development*, 30(13), pp. 1492–1502. doi: 10.1101/gad.282145.116.

Eckhart, L. *et al.* (2008) 'Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire', *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), pp. 831–841. doi: 10.1093/molbev/msn012.

Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986) 'Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.', *Cell*, 44(6), pp. 817–29. PMID: 3955651.

Ernster, L. and Schatz, G. (1981) 'Mitochondria : A Historical Review', 91(December). doi: 0021-9525/81/12/0227s/29.

Eskes, R. *et al.* (2000) 'Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.', *Molecular and cellular biology*, 20(3), pp. 929–35. PMID: 10629050.

Estaquier, J. *et al.* (2012) 'The Mitochondrial Pathways of Apoptosis', in Scatena, R., Bottoni, P., and Giardina, B. (eds) *Advances in Mitochondrial Medicine*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 157–183.

Fan, Y. and Bergmann, A. (2008) 'Distinct Mechanisms of Apoptosis-Induced Compensatory Proliferation in Proliferating and Differentiating Tissues in the *Drosophila* Eye', *Developmental Cell*, 14(3), pp. 399–410. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.003.

Fehler, O. *et al.* (2014) 'An evolutionarily conserved interaction of tumor suppressor protein Pdc4 with the poly(A)-binding protein contributes to translation suppression by Pdc4', *Nucleic Acids Research*, 42(17), pp. 11107–11118. doi: 10.1093/nar/gku800.

Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004) 'The history of cancer epigenetics', *Nature Reviews Cancer*, 4(2), pp. 143–153. doi: 10.1038/nrc1279.

Ferecatu, I. *et al.* (2009) 'Evidence for a mitochondrial localization of the retinoblastoma protein.', *BMC cell biology*, 10, p. 50. doi: 10.1186/1471-2121-10-50.

Ferguson, K. L. *et al.* (2002) 'Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development.', *The EMBO journal*, 21(13), pp. 3337–46. doi: 10.1093/emboj/cdf338.

Fiesel, F. C. *et al.* (2014) 'A specific subset of E2 ubiquitin-conjugating enzymes regulate Parkin activation and mitophagy differently.', *Journal of cell science*, 127(Pt 16), pp. 3488–504. doi: 10.1242/jcs.147520.

Figueroa-Romero, C. *et al.* (2009) 'SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), pp. 3917–27. doi: 10.1096/fj.09-136630.

Fiorese, C. J. *et al.* (2016) 'The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR', *Current Biology*. Cell Press, 26(15), pp. 2037–2043. doi: 10.1016/J.CUB.2016.06.002.

Frank, S. *et al.* (2001) 'The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis', *Developmental Cell*, 1(4), pp. 515–525. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00055-7.

Fraser, A. G. and Evan, G. I. (1997) 'Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE.', *The EMBO journal*, 16(10), pp. 2805–13. doi: 10.1093/emboj/16.10.2805.

Fraser, A. G., McCarthy, N. J. and Evan, G. I. (1997) 'drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells', *EMBO J*, 16(20), pp. 6192–6199. doi: 10.1093/emboj/16.20.6192.

Fu, M. *et al.* (2013) 'Regulation of mitophagy by the Gp78 E3 ubiquitin ligase', *Molecular Biology of the Cell*, 24(8), pp. 1153–1162. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0607.

Fuks, F. *et al.* (2000) 'DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.', *Nature genetics*, 24(1), pp. 88–91. doi: 10.1038/71750.

Fuks, F. *et al.* (2003) 'The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase', *Nucleic Acids Research*, 31(9), pp. 2305–2312. doi: 10.1093/nar/gkg332.

Furukawa, Y. *et al.* (2002) 'Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis', *Journal of*

Biological Chemistry, 277(42), pp. 39760–39768. doi: 10.1074/jbc.M200805200.

Galindo, K. A. *et al.* (2009) 'The Bax/Bak ortholog in *Drosophila*, Debcl, exerts limited control over programmed cell death.', *Development (Cambridge, England)*, 136(2), pp. 275–83. doi: 10.1242/dev.019042.

Gandre-Babbe, S. and van der Bliek, A. M. (2008) 'The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells', *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), pp. 2402–2412. doi: 10.1091/mbc.E07-12-1287.

Gehrke, S. *et al.* (2015) 'PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 21(1), pp. 95–108. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.007.

Georlette, D. *et al.* (2007) 'Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the *Drosophila* Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells.', *Genes & development*, 21(22), pp. 2880–96. doi: 10.1101/gad.1600107.

Gill, R. M. *et al.* (1994) 'Characterization of the human RB1 promoter and of elements involved in transcriptional regulation.', *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 5(5), pp. 467–74. PMID: 8049153.

Girling, R. *et al.* (1993) 'A new component of the transcription factor DRTF1/E2F', *Nature*, 362(6415), pp. 83–87. doi: 10.1038/362083a0.

Goldstein, J. C. *et al.* (2000) 'The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant.', *Nature cell biology*, 2(3), pp. 156–62. doi: 10.1038/35004029.

Gong, G. *et al.* (2015) 'Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice.', *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), p. aad2459. doi: 10.1126/science.aad2459.

Gonzalo, S. *et al.* (2005) 'Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin', *Nature Cell Biology*, 7(4), pp. 420–428. doi: 10.1038/ncb1235.

Gordon, G. M. and Du, W. (2011) 'Targeting Rb inactivation in cancers by synthetic lethality.', *American journal of cancer research*, 1(6), pp. 773–86. PMID: 21814623.

Goyal, G. *et al.* (2007) 'Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*.', *Developmental cell*, 12(5), pp. 807–16. doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.002.

Goyal, L. *et al.* (2000) 'Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim

through inhibition of IAP function', *The EMBO Journal*, 19(4), pp. 589–597. doi: 10.1093/emboj/19.4.589.

Granatiero, V., De Stefani, D. and Rizzuto, R. (2017) 'Mitochondrial Calcium Handling in Physiology and Disease', in *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 25–47. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_2.

Greene, A. W. *et al.* (2012) 'Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment.', *EMBO reports*, 13(4), pp. 378–85. doi: 10.1038/embor.2012.14.

Gu, W. *et al.* (1993) 'Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation', *Cell*, 72(3), pp. 309–324. doi: 10.1016/0092-8674(93)90110-C.

Guillery, O. *et al.* (2008) 'Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential.', *Biology of the cell*. Blackwell Publishing Ltd, 100(5), pp. 315–25. doi: 10.1042/BC20070110.

Guo, Z. *et al.* (2001) 'Inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor induces apoptosis protease-activating factor-1 dependent and independent apoptotic pathways during embryogenesis', *Cancer Research*, 61(23), pp. 8395–8400. PMID: 11731416.

Gupta, S. C. *et al.* (2010) 'Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press, 73(6), pp. 1415–1423. doi: 10.1016/J.ECOENV.2010.05.013.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer.', *Cell*, 100(1), pp. 57–70. PMID: 10647931.

Harder, Z., Zunino, R. and McBride, H. (2004) 'Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission.', *Current biology : CB*, 14(4), pp. 340–5. doi: 10.1016/j.cub.2004.02.004.

Harvey, N. L. *et al.* (2001) 'Characterization of the *Drosophila* Caspase, DAMM', *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), pp. 25342–25350. doi: 10.1074/jbc.M009444200.

Hassler, M. *et al.* (2007) 'Crystal Structure of the Retinoblastoma Protein N Domain Provides Insight into Tumor Suppression, Ligand Interaction, and Holoprotein Architecture', *Molecular Cell*, 28(3), pp. 371–385. doi: 10.1016/j.molcel.2007.08.023.

Hasson, S. A. *et al.* (2013) 'High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy', *Nature*, 504(7479), pp. 291–295. doi:

10.1038/nature12748.

Hawkins, C. J. *et al.* (2000) 'The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM', *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), pp. 27084–27093. doi: 10.1074/jbc.M000869200.

Haynes, C. M. *et al.* (2007) 'ClpP Mediates Activation of a Mitochondrial Unfolded Protein Response in *C. elegans*', *Developmental Cell*. Cell Press, 13(4), pp. 467–480. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.016.

Haynes, C. M. *et al.* (2010) 'The Matrix Peptide Exporter HAF-1 Signals a Mitochondrial UPR by Activating the Transcription Factor ZC376.7 in *C. elegans*', *Molecular Cell*. Cell Press, 37(4), pp. 529–540. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.015.

Haynie, J. L. and Bryant, P. J. (1977) 'The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*.', *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 183(2), pp. 85–100. doi: 10.1007/BF00848779.

Hengartner, M. O., Ellis, R. and Horvitz, R. (1992) 'Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death', *Nature*, 356(6369), pp. 494–499. doi: 10.1038/356494a0.

Henley, S. A. and Dick, F. A. (2012) 'The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle.', *Cell division*, 7(1), p. 10. doi: 10.1186/1747-1028-7-10.

Heo, J. and Campbell, S. L. (2005) 'Mechanism of Redox-mediated Guanine Nucleotide Exchange on Redox-active Rho GTPases', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(35), pp. 31003–31010. doi: 10.1074/jbc.M504768200.

Hernández, G. *et al.* (2004) 'Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos.', *RNA (New York, N.Y.)*, 10(11), pp. 1783–97. doi: 10.1261/rna.7154104.

Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004) 'Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 Mediates Apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp. 8627–8634. doi: 10.1074/jbc.M312866200.

Hickman, E. S., Moroni, M. C. and Helin, K. (2002) 'The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer.', *Current opinion in genetics & development*, 12(1), pp. 60–6. PMID: 11790556.

Hiebert, S. W. (1993) 'Regions of the retinoblastoma gene product required for its

interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression.', *Molecular and Cellular Biology*, 13(6), pp. 3384–3391. doi: 10.1128/MCB.13.6.3384.

Hilgendorf, K. I. *et al.* (2013) 'The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria.', *Genes Dev.* United States, 27, pp. 1003–1015. doi: 10.1101/gad.211326.112.

Hollenbeck, P. J. and Saxton, W. M. (2005) 'The axonal transport of mitochondria.', *Journal of cell science*, 118(Pt 23), pp. 5411–9. doi: 10.1242/jcs.02745.

Holley, C. L. *et al.* (2002) 'Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition', *Nature Cell Biology*, 4(6), pp. 439–444. doi: 10.1038/ncb798.

Hollville, E. *et al.* (2014) 'Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy.', *Molecular cell*. Elsevier Inc., 55(3), pp. 451–66. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.001.

Hong, F. D. *et al.* (1989) 'Structure of the human retinoblastoma gene.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14), pp. 5502–6. PMID: 2748600.

Hsieh, T.-C. *et al.* (2010) 'Tuberous Sclerosis Complex 1 Regulates dE2F1 Expression during Development and Cooperates with RBF1 to Control Proliferation and Survival', *PLoS Genetics*. Edited by B. E. Clurman, 6(8), p. e1001071. doi: 10.1371/journal.pgen.1001071.

Huh, J. R. *et al.* (2007) 'The Drosophila inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers.', *The Journal of biological chemistry*, 282(3), pp. 2056–68. doi: 10.1074/jbc.M608051200.

Huh, M. S. *et al.* (2004) 'Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation', *Journal of Cell Biology*, 166(6), pp. 865–876. doi: 10.1083/jcb.200403004.

Van Humbeeck, C. *et al.* (2011) 'Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(28), pp. 10249–61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1917-11.2011.

Huntzinger, E. *et al.* (2013) 'The interactions of GW182 proteins with PABP and

deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets', *Nucleic Acids Research*, 41(2), pp. 978–994. doi: 10.1093/nar/gks1078.

Huu, N. T., Yoshida, H. and Yamaguchi, M. (2015) 'Tumor suppressor gene *OSCP1 / NOR1* regulates apoptosis, proliferation, differentiation, and ROS generation during eye development of *Drosophila melanogaster*', *FEBS Journal*, 282(24), pp. 4727–4746. doi: 10.1111/febs.13528.

Hwang, R.-D. *et al.* (2014) 'The neuroprotective effect of human uncoupling protein 2 (hUCP2) requires cAMP-dependent protein kinase in a toxin model of Parkinson's disease', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 69, pp. 180–191. doi: 10.1016/J.NBD.2014.05.032.

Hwangbo, D.-S. *et al.* (2016) 'Control of apoptosis by *Drosophila* DCAF12', *Developmental Biology*, 413(1), pp. 50–59. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.03.003.

Ianari, A. *et al.* (2009) 'Proapoptotic Function of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein', *Cancer Cell*, 15(3), pp. 184–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.026.

Igaki, T. *et al.* (2000) 'Drob-1, a *Drosophila* member of the Bcl-2/CED-9 family that promotes cell death', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), pp. 662–667. doi: 10.1073/pnas.97.2.662.

Igaki, T. *et al.* (2007) 'Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in *Drosophila*.', *Biochemical and biophysical research communications*, 356(4), pp. 993–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.079.

Iguchi, M. *et al.* (2013) 'Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation.', *The Journal of biological chemistry*, 288(30), pp. 22019–32. doi: 10.1074/jbc.M113.467530.

Ivatt, R. M. *et al.* (2014) 'Genome-wide RNAi screen identifies the Parkinson disease GWAS risk locus SREBF1 as a regulator of mitophagy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), pp. 8494–9. doi: 10.1073/pnas.1321207111.

Jacks, T. *et al.* (1992) 'Effects of an Rb mutation in the mouse', *Nature*, 359(6393), pp. 295–300. doi: 10.1038/359295a0.

James, D. I. *et al.* (2003) 'hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery', *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp. 36373–36379. doi: 10.1074/jbc.M303758200.

Jänicke, R. U. *et al.* (1996) 'Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-

like protease in apoptosis.', *The EMBO journal*, 15(24), pp. 6969–78. PMID: 9003773.

Ji, P. *et al.* (2004) 'An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant.', *Molecular cell*, 16(1), pp. 47–58. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.029.

Jiang, C., Baehrecke, E. H. and Thummel, C. S. (1997) 'Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis.', *Development (Cambridge, England)*, 124(22), pp. 4673–83. PMID: 9409683.

Jiang, Z. *et al.* (1997) 'The retinoblastoma gene family is differentially expressed during embryogenesis', *Oncogene*, 14(15), pp. 1789–1797. doi: 10.1038/sj.onc.1201014.

Jin, S. M. *et al.* (2010) 'Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL', *The Journal of Cell Biology*, 191(5), pp. 933–942. doi: 10.1083/jcb.201008084.

Joaquin, M., de Nadal, E. and Posas, F. (2017) 'An RB insensitive to CDK regulation.', *Molecular & cellular oncology*, 4(1), p. e1268242. doi: 10.1080/23723556.2016.1268242.

Johnson, B. N. *et al.* (2012) 'The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp. 6283–8. doi: 10.1073/pnas.1113248109.

Jones, G. *et al.* (2000) 'Deterin, a New Inhibitor of Apoptosis from *Drosophila melanogaster*', *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), pp. 22157–22165. doi: 10.1074/jbc.M000369200.

Julian, L. M. and Blais, A. (2015) 'Transcriptional control of stem cell fate by E2Fs and pocket proteins', *Frontiers in Genetics*, 6, p. 161. doi: 10.3389/fgene.2015.00161.

Kagan, V. E. *et al.* (2016) 'NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy.', *Cell death and differentiation*, 23(7), pp. 1140–51. doi: 10.1038/cdd.2015.160.

Kaiser, W. J., Vucic, D. and Miller, L. K. (1998) 'The *Drosophila* inhibitor of apoptosis D-IAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE.', *FEBS letters*, 440(1–2), pp. 243–8. PMID: 9862464.

Kamber Kaya, H. E. *et al.* (2017) 'An inhibitory mono-ubiquitylation of the *Drosophila* initiator caspase Dronc functions in both apoptotic and non-apoptotic pathways', *PLoS Genetics*, 13(2), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pgen.1006438.

Kane, L. A. *et al.* (2014) 'PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin

ligase activity', *The Journal of Cell Biology*, 205(2), pp. 143–153. doi: 10.1083/jcb.201402104.

Kang, J. *et al.* (2014) 'Bar represses dPax2 and decapentaplegic to regulate cell fate and morphogenetic cell death in *Drosophila* eye.', *PLoS one*. Edited by E. M. Verheyen, 9(2), p. e88171. doi: 10.1371/journal.pone.0088171.

Kaplan, Y. *et al.* (2010) 'Gradients of a Ubiquitin E3 Ligase Inhibitor and a Caspase Inhibitor Determine Differentiation or Death in Spermatids', *Developmental Cell*, 19(1), pp. 160–173. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.009.

Karbowski, M., Neutzner, A. and Youle, R. J. (2007) 'The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division', *Journal of Cell Biology*, 178(1), pp. 71–84. doi: 10.1083/jcb.200611064.

Kataoka, T. *et al.* (2001) 'Bcl-rambo, a Novel Bcl-2 Homologue That Induces Apoptosis via Its Unique C-terminal Extension', *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), pp. 19548–19554. doi: 10.1074/jbc.M010520200.

Kazlauskaite, A. *et al.* (2014) 'Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser⁶⁵', *Biochemical Journal*, 460(1), pp. 127–141. doi: 10.1042/BJ20140334.

Kazlauskaite, A. *et al.* (2015) 'Binding to serine 65-phosphorylated ubiquitin primes Parkin for optimal PINK1-dependent phosphorylation and activation', *EMBO reports*, 16(8), pp. 939–954. doi: 10.15252/embr.201540352.

Keller, S. A. *et al.* (2005) 'Distinct developmental expression of *Drosophila* retinoblastoma factors', *Gene Expression Patterns*, 5(3), pp. 411–421. doi: 10.1016/j.modgep.2004.09.005.

Kerr, J. F. *et al.* (1972) 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257. PMID: 4561027.

Khammari, A. *et al.* (2011) 'Physiological apoptosis of polar cells during *Drosophila* oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1', *Cell Death and Differentiation*, 18(5), pp. 793–805. doi: 10.1038/cdd.2010.141.

Kim, H. Y. and Cho, Y. (1997) 'Structural similarity between the pocket region of retinoblastoma tumour suppressor and the cyclin-box.', *Nature structural biology*, 4(5), pp. 390–5. PMID: 9145110.

Kim, J. *et al.* (2016) 'miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1).', *Molecular neurodegeneration*, 11(1), p. 55. doi: 10.1186/s13024-016-0121-4.

Knudsen, E. S., Sexton, C. R. and Mayhew, C. N. (2006) 'Role of the retinoblastoma tumor suppressor in the maintenance of genome integrity.', *Current molecular medicine*, 6(7), pp. 749–57. PMID: 17100601.

Kondapalli, C. *et al.* (2012) 'PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65', *Open Biology*, 2(5), pp. 120080–120080. doi: 10.1098/rsob.120080.

Kondo, S. *et al.* (2006) 'DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation.', *Molecular and cellular biology*, 26(19), pp. 7258–68. doi: 10.1128/MCB.00183-06.

Korenjak, M. and Brehm, A. (2005) 'E2F–Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development', *Current Opinion in Genetics & Development*. England, 15(5), pp. 520–527. doi: 10.1016/j.gde.2005.07.001.

Koshiba, T. *et al.* (2004) 'Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes.', *Science (New York, N.Y.)*, 305(5685), pp. 858–62. doi: 10.1126/science.1099793.

Koyano, F. *et al.* (2014) 'Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin', *Nature*, 510(7503), pp. 162–6. doi: 10.1038/nature13392.

Kumar, A. *et al.* (2015) 'Disruption of the autoinhibited state primes the E3 ligase parkin for activation and catalysis', *The EMBO Journal*, 34(20), pp. 2506–2521. doi: 10.15252/embj.201592337.

Kumar, S. (2007) 'Caspase function in programmed cell death', *Cell Death and Differentiation*, 14(1), pp. 32–43. doi: 10.1038/sj.cdd.4402060.

Kurada, P. and White, K. (1998) 'Ras promotes cell survival in Drosophila by downregulating hid expression.', *Cell*, 95(3), pp. 319–29. PMID: 9814703.

de la Cova, C. *et al.* (2004) 'Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition', *Cell*, 117(1), pp. 107–116. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00214-4.

De La Fuente, S. *et al.* (2016) 'Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle', *Journal of Biological Chemistry*, 291(44), pp. 23343–23362. doi: 10.1074/jbc.M116.755496.

Lai, a *et al.* (2001) 'RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest.', *Molecular and cellular biology*, 21(8), pp. 2918–2932. doi: 10.1128/MCB.21.8.2918-2932.2001.

Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S. A. (2013) 'The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), pp. 759–774. doi: 10.1038/nrm3696.

Lamber, E. P. *et al.* (2013) 'Structural Insights into the Mechanism of Phosphoregulation of the Retinoblastoma Protein', *PLoS ONE*. Edited by B. Kobe, 8(3), p. e58463. doi: 10.1371/journal.pone.0058463.

Lazarou, M. *et al.* (2012) 'Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 22(2), pp. 320–333. doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.014.

Lazarou, M. *et al.* (2015) 'The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy', *Nature*, 524(7565), pp. 309–314. doi: 10.1038/nature14893.

Leboucher, G. P. *et al.* (2012) 'Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis.', *Molecular cell*. Nature Publishing Group, 47(4), pp. 547–57. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.041.

Ledl, A., Schmidt, D. and Müller, S. (2005) 'Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor.', *Oncogene*, 24(23), pp. 3810–3818. doi: 10.1038/sj.onc.1208539.

Leduc, C. *et al.* (2006) 'p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation', *Oncogene*, 25(30), pp. 4147–4154. doi: 10.1038/sj.onc.1209446.

Lee, G. *et al.* (2011) 'Drosophila caspases involved in developmentally regulated programmed cell death of peptidergic neurons during early metamorphosis', *Journal of Comparative Neurology*, 519(1), pp. 34–48. doi: 10.1002/cne.22498.

Lee, H. *et al.* (2010) 'Drosophila RB proteins repress differentiation-specific genes via two different mechanisms.', *Mol Cell Biol*, 30(10), pp. 2563–2577. doi: 10.1128/MCB.01075-09.

Lee, H. *et al.* (2012) 'A Dual Role for the dREAM/MMB Complex in the Regulation of Differentiation-Specific E2F/RB Target Genes', *Molecular and Cellular Biology*, 32(11), pp. 2110–2120. doi: 10.1128/MCB.06314-11.

Lee, J. O., Russo, A. A. and Pavletich, N. P. (1998) 'Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7.', *Nature*, 391(6670), pp. 859–65. doi: 10.1038/36038.

Lee, T. V *et al.* (2011) 'Drosophila IAP1-mediated ubiquitylation controls activation of the initiator caspase DRONC independent of protein degradation.', *PLoS genetics*. Edited by B. Lu, 7(9), p. e1002261. doi: 10.1371/journal.pgen.1002261.

Lee, T. V *et al.* (2016) 'The initiator caspase Dronc is subject of enhanced autophagy upon proteasome impairment in Drosophila', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 23(9), pp. 1555–1564. doi: 10.1038/cdd.2016.40.

Lefebvre, V. *et al.* (2013) 'Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy.', *Autophagy*, 9(11), pp. 1770–9. doi: 10.4161/auto.25413.

Lemaire, C. *et al.* (2005) 'Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb.', *Oncogene*, 24(November 2015), pp. 3297–3308. doi: 10.1038/sj.onc.1208493.

Leulier, F. *et al.* (2000) 'The Drosophila caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection.', *EMBO reports*, 1(4), pp. 353–358. doi: 10.1093/embo-reports/kvd073.

Leulier, F. *et al.* (2006) 'Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the Drosophila cell death machinery', *Cell Death Differ*, 13(10), pp. 1663–1674. doi: 10.1038/sj.cdd.4401868.

Lewis, H. *et al.* (2014) 'miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration', *Cell Cycle*, 13(2), pp. 227–239. doi: 10.4161/cc.26984.

Li, J. *et al.* (2014) 'Mitofusin 1 is negatively regulated by microRNA 140 in cardiomyocyte apoptosis.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 34(10), pp. 1788–99. doi: 10.1128/MCB.00774-13.

Li, P. *et al.* (1997) 'Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.', *Cell*, 91(4), pp. 479–89. PMID: 9390557.

Li, X., Wang, J. and Shi, Y. (2011) 'Structural mechanisms of DIAP1 auto-inhibition and DIAP1-mediated inhibition of drICE.', *Nature communications*, 2, p. 408. doi: 10.1038/ncomms1418.

Liban, T. J. *et al.* (2016) 'Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family', *Journal of Molecular Biology*, 428(20), pp. 3960–3971. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.017.

Liesa, M. *et al.* (2008) 'Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta.', *PloS one*. Edited by S. W?lfl. Public Library of Science, 3(10), p. e3613. doi: 10.1371/journal.pone.0003613.

Lindsten, T. *et al.* (2000) 'The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues.', *Molecular cell*, 6(6), pp. 1389–99. PMID: 11163212.

Ling, Y. *et al.* (2004) 'Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription', *Nucleic Acids Research*, 32(2), pp. 598–610. doi: 10.1093/nar/gkh195.

Litovchick, L. *et al.* (2007) 'Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence.', *Molecular cell*, 26(4), pp. 539–51. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.015.

Liu, L. *et al.* (2012) 'Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells.', *Nature cell biology*, 14(2), pp. 177–85. doi: 10.1038/ncb2422.

Liu, S. and Lu, B. (2010) 'Reduction of protein translation and activation of autophagy protect against PINK1 pathogenesis in *Drosophila melanogaster*', *PLoS genetics*, 6(12), p. e1001237. doi: 10.1371/journal.pgen.1001237.

Liu, W. *et al.* (2011) 'Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), pp. 12920–12924. doi: 10.1073/pnas.1107332108.

Liu, Y. *et al.* (2016) 'PINK1 is required for timely cell-type specific mitochondrial clearance during *Drosophila* midgut metamorphosis', *Developmental Biology*. Elsevier, 419(2), pp. 357–372. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.08.028.

Liu, Z. *et al.* (2000) 'Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.', *Nature*, 408(6815), pp. 1004–8. doi: 10.1038/35050006.

Liu, Z. *et al.* (2013) 'miR-106a Represses the Rb Tumor Suppressor p130 to Regulate Cellular Proliferation and Differentiation in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma', *Molecular Cancer Research*, 11(11), pp. 1314–1325. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0131.

Liwak, U., Faye, M. D. and Holcik, M. (2012) 'Translation control in apoptosis', *Experimental Oncology*, 34(3), pp. 218–230. PMID: 23070007.

Lockshin, R. A. and Williams, C. M. (1965) 'Programmed Cell Death - I. Cytology of

degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm.', *Journal of insect physiology*, 11, pp. 123–33. PMID: 14287218.

Lopez-Bigas, N. *et al.* (2008) 'Genome-wide Analysis of the H3K4 Histone Demethylase RBP2 Reveals a Transcriptional Program Controlling Differentiation', *Molecular Cell*, 31(4), pp. 520–530. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.004.

López-García, P. and Moreira, D. (2015) 'Open Questions on the Origin of Eukaryotes', *Trends in Ecology & Evolution*, 30(11), pp. 697–708. doi: 10.1016/j.tree.2015.09.005.

López Del Amo, V. *et al.* (2015) 'Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy.', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 24(1), pp. 21–36. doi: 10.1093/hmg/ddu416.

Loson, O. C. *et al.* (2013) 'Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission', *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), pp. 659–667. doi: 10.1091/mbc.E12-10-0721.

Lu, M. *et al.* (2007) 'XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization.', *Molecular cell*, 26(5), pp. 689–702. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.006.

Lücking, C. B. *et al.* (1998) 'Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group.', *Lancet (London, England)*, 352(9137), pp. 1355–6. PMID: 9802278.

Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A. (1998) 'Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes.', *Molecular and cellular biology*, 18(2), pp. 753–61. PMID: 9447971.

Lüthi, A. U. and Martin, S. J. (2007) 'The CASBAH: a searchable database of caspase substrates.', *Cell death and differentiation*, 14(4), pp. 641–50. doi: 10.1038/sj.cdd.4402103.

Ma, W. *et al.* (2015) 'Radiation-induced microRNA-622 causes radioresistance in colorectal cancer cells by down-regulating Rb', *Oncotarget*. Impact Journals, 6(18), pp. 15984–15994. doi: 10.18632/oncotarget.3762.

Macchi, M. *et al.* (2013) 'The Drosophila inner-membrane protein PMI controls cristae biogenesis and mitochondrial diameter', *Journal of Cell Science*, 126(3), pp. 814–824. doi:

10.1242/jcs.115675.

Mace, P. D. *et al.* (2010) 'Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2.', *Journal of molecular biology*, 400(1), pp. 8–15. doi: 10.1016/j.jmb.2010.04.055.

Malik, B. R., Godena, V. K. and Whitworth, A. J. (2015) 'VPS35 pathogenic mutations confer no dominant toxicity but partial loss of function in *Drosophila* and genetically interact with parkin', *Human Molecular Genetics*, p. ddv322. doi: 10.1093/hmg/ddv322.

Martin, O. J. *et al.* (2014) 'A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth.', *Circulation research*, 114(4), pp. 626–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302562.

Martinez, A. *et al.* (2017) 'Quantitative proteomic analysis of Parkin substrates in *Drosophila* neurons', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 29. doi: 10.1186/s13024-017-0170-3.

Martinou, J. C. and Youle, R. J. (2011) 'Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics.', *Dev Cell*. Elsevier Inc., 21(1), pp. 92–101. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.017.

Matsushima, Y. *et al.* (2017) '*Drosophila* protease ClpXP specifically degrades DmLRPPRC1 controlling mitochondrial mRNA and translation', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 8315. doi: 10.1038/s41598-017-08088-6.

Means, J. C., Muro, I. and Clem, R. J. (2006) 'Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system.', *Cell death and differentiation*, 13(7), pp. 1222–34. doi: 10.1038/sj.cdd.4401821.

Meier, P. *et al.* (2000) 'The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1', *The EMBO Journal*, 19(4), pp. 598–611. doi: 10.1093/emboj/19.4.598.

Meinander, A. *et al.* (2012) 'Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling.', *The EMBO journal*, 31(12), pp. 2770–83. doi: 10.1038/emboj.2012.121.

Melber, A. and Haynes, C. M. (2018) 'UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication.', *Cell research*, 28(3), pp. 281–295. doi: 10.1038/cr.2018.16.

Michiorri, S. *et al.* (2010) 'The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy', *Cell Death and Differentiation*, 17(6), pp. 962–974. doi: 10.1038/cdd.2009.200.

Miles, W. O. *et al.* (2014) 'Post-transcriptional gene expression control by NANOS is up-regulated and functionally important in pRb-deficient cells', *The EMBO Journal*, 33(19), pp. 2201–2215. doi: 10.15252/embj.201488057.

Milet, C. *et al.* (2010) 'The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells', *Cell Cycle*. United States, 9(1), pp. 97–103. doi: 10.4161/cc.9.1.10251.

Milet, C. *et al.* (2014) 'Mutating RBF Can Enhance Its Pro-Apoptotic Activity and Uncovers a New Role in Tissue Homeostasis', *PloS One*, 9(8), p. e102902. doi: 10.1371/journal.pone.0102902.

Mishra, P. *et al.* (2014) 'Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation', *Cell Metabolism*, 19(4), pp. 630–641. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.011.

Mohan, C. *et al.* (2015) 'Detection of End-Stage Apoptosis by ApopTag® TUNEL Technique', in. Humana Press, New York, NY, pp. 43–56. doi: 10.1007/978-1-4939-1661-0_5.

Moon, N.-S. *et al.* (2005) 'Drosophila E2F1 Has Context-Specific Pro- and Antiapoptotic Properties during Development', *Developmental Cell*, 9(4), pp. 463–475. doi: 10.1016/j.devcel.2005.08.015.

Moon, N.-S., Di Stefano, L. and Dyson, N. (2006) 'A Gradient of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Determines the Sensitivity of rbf1 Mutant Cells to E2F-Dependent Apoptosis', *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), pp. 7601–7615. doi: 10.1128/MCB.00836-06.

Morais, V. A. *et al.* (2014) 'PINK1 Loss-of-Function Mutations Affect Mitochondrial Complex I Activity via NdufA10 Ubiquinone Uncoupling', *Science*, 344(6180), pp. 203–207. doi: 10.1126/science.1249161.

Morata, G. and Ripoll, P. (1975) 'Minutes: Mutants of Drosophila autonomously affecting cell division rate', *Developmental Biology*, 42(2), pp. 211–221. doi: 10.1016/0012-1606(75)90330-9.

Morey, M., Corominas, M. and Serras, F. (2003) 'DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of the selD/sps1 homolog in Drosophila.', *Journal of cell science*, 116(Pt 22), pp. 4597–604. doi: 10.1242/jcs.00783.

Morishita, J. *et al.* (2013) 'CDK7 regulates the mitochondrial localization of a tail-anchored proapoptotic protein, Hid.', *Cell Rep*, 5, pp. 1481–1488. doi:

10.1016/j.celrep.2013.11.030.

Morita, M. *et al.* (2013) 'mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation.', *Cell metabolism*. Elsevier, 18(5), pp. 698–711. doi: 10.1016/j.cmet.2013.10.001.

Morley, S. J. (2001) 'The regulation of eIF4F during cell growth and cell death', *Prog Mol Subcell Biol*. Springer, Berlin, Heidelberg, 27, pp. 1–37. doi: 10.1007/978-3-662-09889-9_1.

Morris, E. J. and Dyson, N. J. (2001) 'Retinoblastoma protein partners.', *Advances in cancer research*, 82, pp. 1–54. PMID: 11447760.

Müller, H. *et al.* (1997) 'Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization.', *Molecular and cellular biology*, 17(9), pp. 5508–20. PMID: 9271426.

Munro, S. *et al.* (2010) 'Lysine methylation regulates the pRb tumour suppressor protein', *Oncogene*, 29(16), pp. 2357–2367. doi: 10.1038/onc.2009.511.

Munro, S., Carr, S. M. and La Thangue, N. B. (2012) 'Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct?', *Oncogene*, 31(40), pp. 4343–52. doi: 10.1038/onc.2011.603.

Murakawa, T. *et al.* (2015) 'Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation', *Nature Communications*, 6(1), p. 7527. doi: 10.1038/ncomms8527.

Muro, I. *et al.* (2006) 'The Drosophila caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process.', *Development*, 133(17), pp. 3305–3315. doi: 10.1242/dev.02495.

Muro, I., Hay, B. A. and Clem, R. J. (2002) 'The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC.', *The Journal of biological chemistry*, 277(51), pp. 49644–50. doi: 10.1074/jbc.M203464200.

Nahle, Z. *et al.* (2002) 'Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F', *Nature Cell Biology*, 4(11), pp. 859–864. doi: 10.1038/ncb868.

Nakamura, N. *et al.* (2006) 'MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology', *EMBO reports*, 7(10), pp. 1019–1022. doi: 10.1038/sj.embor.7400790.

Nakazawa, M. *et al.* (2016) 'The Human Bcl-2 Family Member Bcl-rambo Localizes to

Mitochondria and Induces Apoptosis and Morphological Aberrations in *Drosophila*’, *PLOS ONE*. Edited by S. B. Bratton. Public Library of Science, 11(6), p. e0157823. doi: 10.1371/journal.pone.0157823.

Nan, J. *et al.* (2017) ‘Molecular regulation of mitochondrial dynamics in cardiac disease.’, *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V., 1864(7), pp. 1260–1273. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.006.

Narasimha, A. M. *et al.* (2014) ‘Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation.’, *eLife*, 3. doi: 10.7554/eLife.02872.

Narendra, D. P. *et al.* (2010) ‘PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin’, *PLoS Biology*. Edited by D. R. Green, 8(1), p. e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.

Nargund, A. M. *et al.* (2012) ‘Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation’, *Science*, 337(6094), pp. 587–590. doi: 10.1126/science.1223560.

Nargund, A. M. *et al.* (2015) ‘Mitochondrial and Nuclear Accumulation of the Transcription Factor ATFS-1 Promotes OXPHOS Recovery during the UPRmt’, *Molecular Cell*, 58(1), pp. 123–133. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.008.

Neufeld, T. P. *et al.* (1998) ‘Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing.’, *Cell*. UNITED STATES, 93, pp. 1183–1193. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81462-2.

Niemann, A. *et al.* (2009) ‘GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance.’, *Neurobiology of disease*, 36(3), pp. 509–20. doi: 10.1016/j.nbd.2009.09.011.

Novak, I. *et al.* (2010) ‘Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance.’, *EMBO reports*, 11(1), pp. 45–51. doi: 10.1038/embor.2009.256.

Oka, S. *et al.* (2015) ‘A correlation of reactive oxygen species accumulation by depletion of superoxide dismutases with age-dependent impairment in the nervous system and muscles of *Drosophila* adults.’, *Biogerontology*, 16(4), pp. 485–501. doi: 10.1007/s10522-015-9570-3.

Okatsu, K. *et al.* (2012) ‘PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria’, *Nature Communications*, 3, p. 1016. doi: 10.1038/ncomms2016.

Okatsu, K. *et al.* (2015) ‘Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin

receptor.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 209(1), pp. 111–28. doi: 10.1083/jcb.201410050.

Oktaba, K. *et al.* (2008) 'Dynamic Regulation by Polycomb Group Protein Complexes Controls Pattern Formation and the Cell Cycle in *Drosophila*', *Developmental Cell*, 15(6), pp. 877–889. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.005.

Olson, M. R., Holley, C. L., Gan, E. C., *et al.* (2003) 'A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation.', *The Journal of biological chemistry*, 278(45), pp. 44758–68. doi: 10.1074/jbc.M308055200.

Olson, M. R., Holley, C. L., Yoo, S. J., *et al.* (2003) 'Reaper Is Regulated by IAP-mediated Ubiquitination', *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), pp. 4028–4034. doi: 10.1074/jbc.M209734200.

Ordureau, A. *et al.* (2014) 'Quantitative Proteomics Reveal a Feedforward Mechanism for Mitochondrial PARKIN Translocation and Ubiquitin Chain Synthesis', *Molecular Cell*, 56(3), pp. 360–375. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.007.

Orvedahl, A. *et al.* (2011) 'Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors.', *Nature*, 480(7375), pp. 113–7. doi: 10.1038/nature10546.

Palmer, C. S. *et al.* (2011) 'MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery', *EMBO reports*, 12(6), pp. 565–573. doi: 10.1038/embor.2011.54.

Park, J. *et al.* (2006) 'Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin', *Nature*, 441(7097), pp. 1157–1161. doi: 10.1038/nature04788.

Pascucci, B. *et al.* (2016) 'Overexpression of parkin rescues the defective mitochondrial phenotype and the increased apoptosis of Cockayne Syndrome A cells.', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.9913.

Perez-Garijo, A. and Steller, H. (2015) 'Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease', *Development*, 142(19), pp. 3253–3262. doi: 10.1242/dev.127878.

Pinton, P. *et al.* (2008) 'Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis', *Oncogene*, 27(50), pp. 6407–6418. doi: 10.1038/onc.2008.308.

Plun-Favreau, H. *et al.* (2007) 'The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1.', *Nature cell biology*, 9(11), pp. 1243–52. doi: 10.1038/ncb1644.

Poole, A. C. *et al.* (2010) 'The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a

substrate of the PINK1/parkin pathway', *PLoS ONE*, 5(4). doi: 10.1371/journal.pone.0010054.

Pridgeon, J. W. *et al.* (2007) 'PINK1 Protects against Oxidative Stress by Phosphorylating Mitochondrial Chaperone TRAP1', *PLoS Biology*. Edited by H. Y. Zoghbi, 5(7), p. e172. doi: 10.1371/journal.pbio.0050172.

Pyakurel, A. *et al.* (2015) 'Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis', *Molecular Cell*, 58(2), pp. 244–254. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.021.

Qi, Y. *et al.* (2016) 'Loss of *Drosophila* i-AAA protease, dYME1L, causes abnormal mitochondria and apoptotic degeneration', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 23(2), pp. 291–302. doi: 10.1038/cdd.2015.94.

Qin, X. Q. *et al.* (1992) 'Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product.', *Genes & development*, 6(6), pp. 953–64. PMID: 1534305.

Quinn, L. *et al.* (2003) 'Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions', *The EMBO journal*, 22(14), pp. 3568–3579. doi: 10.1093/emboj/cdg355.

Rahman, M. and Kylsten, P. (2011) 'Rhomboid-7 over-expression results in Opa1-like processing and malfunctioning mitochondria.', *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc., 414(2), pp. 315–320. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.047.

Rai, M., Katti, P. and Nongthomba, U. (2014) '*Drosophila* Erect wing (Ewg) controls mitochondrial fusion during muscle growth and maintenance by regulation of the Opa1-like gene', *Journal of Cell Science*, 127(1), pp. 191–203. doi: 10.1242/jcs.135525.

Raj, N. *et al.* (2012) 'Ubiquitination of Retinoblastoma Family Protein 1 Potentiates Gene-specific Repression Function', *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), pp. 41835–41843. doi: 10.1074/jbc.M112.422428.

Rajabi, H. N., Takahashi, C. and Ewen, M. E. (2014) 'Retinoblastoma Protein and MyoD Function Together to Effect the Repression of Fra-1 and in Turn Cyclin D1 during Terminal Cell Cycle Arrest Associated with Myogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), pp. 23417–23427. doi: 10.1074/jbc.M113.532572.

Rajalingam, K. *et al.* (2006) 'IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells.', *PLoS pathogens*, 2(10), p. e114. doi: 10.1371/journal.ppat.0020114.

Rana, A. *et al.* (2017) 'Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife

prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*', *Nature Communications*, 8(1), p. 448. doi: 10.1038/s41467-017-00525-4.

Rea, S. *et al.* (2000) 'Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases.', *Nature*, 406(6796), pp. 593–599. doi: 10.1038/35020506.

Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S. (1976) 'Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice', *Developmental Biology*, 53(2), pp. 217–240. doi: 10.1016/0012-1606(76)90225-6.

Rera, M. *et al.* (2011) 'Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog.', *Cell Metab.* Elsevier Inc., 14(5), pp. 623–634. doi: 10.1016/j.cmet.2011.09.013.

Rhiner, C. *et al.* (2010) 'Flower Forms an Extracellular Code that Reveals the Fitness of a Cell to its Neighbors in *Drosophila*', *Developmental Cell*, 18(6), pp. 985–998. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.010.

Rival, T. *et al.* (2011) 'Inner-membrane proteins PMI/TMEM11 regulate mitochondrial morphogenesis independently of the DRP1/MFN fission/fusion pathways.', *EMBO Rep*, 12(3), pp. 223–230. doi: 10.1038/embor.2010.214.

Robertson, K. D. *et al.* (2000) 'DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.', *Nature genetics*, 25(3), pp. 338–342. doi: 10.1038/77124.

Robinow, S., Draizen, T. A. and Truman, J. W. (1997) 'Genes that induce apoptosis: transcriptional regulation in identified, doomed neurons of the *Drosophila* CNS', *Developmental Biology*, 190(2), pp. 206–213. doi: 10.1006/dbio.1997.8696.

Rodriguez, J. *et al.* (2000) 'Polypeptides differentially expressed in imaginal discs define the peroxiredoxin family of genes in *Drosophila*.', *European journal of biochemistry*. Blackwell Science Ltd, 267(2), pp. 487–97. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01022.x.

Ropero, S. and Esteller, M. (2007) 'The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer', *Molecular Oncology*, pp. 19–25. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.001.

Roy, G. *et al.* (2004) 'The *Drosophila* poly(A) binding protein-interacting protein, dPaip2, is a novel effector of cell growth.', *Molecular and cellular biology*, 24(3), pp. 1143–54. doi: 10.1128/MCB.24.3.1143.

Rubin, S. M. *et al.* (2005) 'Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: A mechanism for phosphorylation-induced E2F release', *Cell*, 123(6), pp. 1093–1106. doi:

10.1016/j.cell.2005.09.044.

Rubin, S. M. (2013) 'Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 38(1), pp. 12–19. doi: 10.1016/j.tibs.2012.10.007.

Ryoo, H. D. *et al.* (2002) 'Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1.', *Nature cell biology*, 4(6), pp. 432–8. doi: 10.1038/ncb795.

Saddic, L. A. *et al.* (2010) 'Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2', *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), pp. 37733–37740. doi: 10.1074/jbc.M110.137612.

Samant, S. A. *et al.* (2014) 'SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 34(5), pp. 807–19. doi: 10.1128/MCB.01483-13.

Samuel, T. *et al.* (2006) 'Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases.', *The Journal of biological chemistry*, 281(2), pp. 1080–90. doi: 10.1074/jbc.M509381200.

Sandoval, H. *et al.* (2008) 'Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells.', *Nature*, 454(7201), pp. 232–5. doi: 10.1038/nature07006.

Sandu, C., Ryoo, H. D. and Steller, H. (2010) 'Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death', *The Journal of Cell Biology*, 190(6), pp. 1039–1052. doi: 10.1083/jcb.201004086.

Sankaran, V. G., Orkin, S. H. and Walkley, C. R. (2008) 'Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 22(4), pp. 463–75. doi: 10.1101/gad.1627208.

Santabárbara-Ruiz, P. *et al.* (2015) 'ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during Drosophila Regeneration', *PLOS Genetics*. Edited by G. P. Copenhaver. Public Library of Science, 11(10), p. e1005595. doi: 10.1371/journal.pgen.1005595.

Santel, A. *et al.* (2003) 'Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells.', *Journal of cell science*, 116(Pt 13), pp. 2763–74. doi: 10.1242/jcs.00479.

Santel, A. and Fuller, M. T. (2001) 'Control of mitochondrial morphology by a human

mitofusin.', *Journal of Cell Science*, 114(Pt 5), pp. 867–874. doi: mitochondrial fusion fzo human gtpase dynamin related protein mitofusin outer-membrane protein dynamin-related gtpase saccharomyces-cerevisiae coiled coils fusion yeast reticulum fzo1p maintenance fission.

Sarraf, S. A. *et al.* (2013) 'Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization', *Nature*. Nature Publishing Group, 496(7445), pp. 372–376. doi: 10.1038/nature12043.

Sauve, V. *et al.* (2015) 'A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin', *The EMBO Journal*, 34(20), pp. 2492–2505. doi: 10.15252/embj.201592237.

Schotta, G. *et al.* (2002) 'Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing', *EMBO Journal*, 21(5), pp. 1121–1131. doi: 10.1093/emboj/21.5.1121.

Schweers, R. L. *et al.* (2007) 'NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp. 19500–5. doi: 10.1073/pnas.0708818104.

Schweichel, J. U. and Merker, H. J. (1973) 'The morphology of various types of cell death in prenatal tissues.', *Teratology*, 7(3), pp. 253–66. doi: 10.1002/tera.1420070306.

Shapiro, P. J. *et al.* (2008) 'Regulation of the Drosophila apoptosome through feedback inhibition.', *Nature cell biology*, 10(12), pp. 1440–6. doi: 10.1038/ncb1803.

Sherr, C. J. and McCormick, F. (2002) 'The RB and p53 pathways in cancer.', *Cancer cell*, 2(2), pp. 103–12. PMID: 12204530.

Shiba-Fukushima, K. *et al.* (2012) 'PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy', *Scientific Reports*, 2(1), p. 1002. doi: 10.1038/srep01002.

Shin, J.-H. *et al.* (2011) 'PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease.', *Cell*, 144(5), pp. 689–702. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.010.

Siddique, H. R. *et al.* (2008) 'Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic Drosophila melanogaster: role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis.', *Journal of applied toxicology : JAT*, 28(6), pp. 734–48. doi: 10.1002/jat.1332.

Silke, J. *et al.* (2005) 'Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance.', *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 102(45), pp. 16182–7. doi: 10.1073/pnas.0502828102.

Silvander, J. S. G. *et al.* (2017) 'Keratins regulate β -cell mitochondrial morphology, motility, and homeostasis.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, p. fj.201700095R. doi: 10.1096/fj.201700095R.

Simon, V. R., Karmon, S. L. and Pon, L. A. (1997) 'Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Cell motility and the cytoskeleton*, 37(3), pp. 199–210. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:3<199::AID-CM2>3.0.CO;2-2.

Singh, P. *et al.* (2011) 'Pdc4 directly binds the coding region of c-myc mRNA and suppresses its translation', *Oncogene*, 30(49), pp. 4864–4873. doi: 10.1038/onc.2011.202.

Smirnova, E. *et al.* (2001) 'Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells', *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), pp. 2245–2256. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245.

Smith, R. W. P., Blee, T. K. P. and Gray, N. K. (2014) 'Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans.', *Biochemical Society transactions*, 42(4), pp. 1229–37. doi: 10.1042/BST20140111.

Song, Z., McCall, K. and Steller, H. (1997) 'DCP-1, a *Drosophila* Cell Death Protease Essential for Development', *Science*, 275(5299), pp. 536–540. doi: 10.1126/science.275.5299.536.

Soubannier, V. *et al.* (2012) 'A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes.', *Current biology : CB*, 22(2), pp. 135–41. doi: 10.1016/j.cub.2011.11.057.

Spratt, D. E., Walden, H. and Shaw, G. S. (2014) 'RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions', *Biochemical Journal*, 458(3), pp. 421–437. doi: 10.1042/BJ20140006.

Srinivasula, S. M. *et al.* (2001) 'A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.', *Nature*, 410(6824), pp. 112–6. doi: 10.1038/35065125.

Srinivasula, S. M. *et al.* (2002) 'sickle, a novel *Drosophila* death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein.', *Current biology : CB*, 12(2), pp. 125–30. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00657-1.

Srivastav, S. *et al.* (2015) 'Folic acid supplementation rescues anomalies associated with knockdown of parkin in dopaminergic and serotonergic neurons in Drosophila model of Parkinson's disease', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 460(3), pp. 780–785. doi: 10.1016/J.BBRC.2015.03.106.

Steele, L. *et al.* (2009) 'Retinoblastoma family protein promotes normal R8-photoreceptor differentiation in the absence of rhinoceros by inhibiting dE2F1 activity', *Developmental Biology*, 335(1), pp. 228–236. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.004.

De Stefani, D., Patron, M. and Rizzuto, R. (2015) 'Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1853(9), pp. 2006–2011. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.04.008.

Stevaux, O. *et al.* (2002) 'Distinct mechanisms of E2F regulation by Drosophila RBF1 and RBF2.', *EMBO J*. England, 21, pp. 4927–4937.

Stevens, D. A. *et al.* (2015) 'Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), pp. 11696–701. doi: 10.1073/pnas.1500624112.

Von Stockum, S. *et al.* (2016) 'Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view', *Neurobiology of Disease*. Elsevier Inc., 90, pp. 58–67. doi: 10.1016/j.nbd.2015.11.002.

Stoven, S. *et al.* (2003) 'Caspase-mediated processing of the Drosophila NF-kappaB factor Relish', *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100, pp. 5991–5996. doi: 10.1073/pnas.1035902100.

Strobeck, M. W. *et al.* (2002) 'Compensation of BRG-1 Function by Brm', *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 4782–4789. doi: 10.1074/jbc.M109532200.

Sukhanova, M. J. *et al.* (2011) 'RBF and Rno promote photoreceptor differentiation onset through modulating EGFR signaling in the Drosophila developing eye.', *Dev Biol*, 359, pp. 190–198. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.08.018.

Suzuki, M. *et al.* (2003) 'The Solution Structure of Human Mitochondria Fission Protein Fis1 Reveals a Novel TPR-like Helix Bundle', *Journal of Molecular Biology*, 334(3), pp. 445–458. doi: 10.1016/j.jmb.2003.09.064.

Suzuki, Y. *et al.* (2001) 'A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.', *Molecular cell*, 8(3), pp. 613–21. PMID: 11583623.

Swatek, K. N. and Komander, D. (2016) 'Ubiquitin modifications.', *Cell research*, 26(4), pp. 399–422. doi: 10.1038/cr.2016.39.

Tanaka-Matakatsu, M. *et al.* (2009) 'Regulation of apoptosis of rbf mutant cells during *Drosophila* development', *Developmental Biology*, 326(2), pp. 347–356. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.11.035.

Tanaka, A. *et al.* (2010) 'Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin.', *The Journal of cell biology*, 191(7), pp. 1367–80. doi: 10.1083/jcb.201007013.

Tanaka, A. and Youle, R. J. (2008) 'A Chemical Inhibitor of DRP1 Uncouples Mitochondrial Fission and Apoptosis', *Molecular Cell*. Cell Press, 29(4), pp. 409–410. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2008.02.005.

Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008) 'Apoptosis: controlled demolition at the cellular level', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), pp. 231–241. doi: 10.1038/nrm2312.

Tenev, T. *et al.* (2002) 'Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1.', *The EMBO journal*, 21(19), pp. 5118–29. PMID: 12356728.

Tenev, T. *et al.* (2007) 'The antiapoptotic activity of insect IAPs requires activation by an evolutionarily conserved mechanism.', *Cell death and differentiation*, 14(6), pp. 1191–201. doi: 10.1038/sj.cdd.4402118.

Tettweiler, G. *et al.* (2005) 'Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP', *Genes & Development*, 19(16), pp. 1840–1843. doi: 10.1101/gad.1311805.

Thomas, D. M. M. *et al.* (2001) 'The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation', *Molecular Cell*, 8(2), pp. 303–16. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00327-6.

Thomas, R. J. *et al.* (2017) 'HPV/E7 induces chemotherapy-mediated tumor suppression by ceramide-dependent mitophagy.', *EMBO molecular medicine*. EMBO Press, 9(8), pp. 1030–1051. doi: 10.15252/emmm.201607088.

Trempe, J.-F. *et al.* (2013) 'Structure of Parkin Reveals Mechanisms for Ubiquitin Ligase Activation', *Science*, 340(6139), pp. 1451–1455. doi: 10.1126/science.1237908.

Tsang, W. P. *et al.* (2010) 'Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer', *Carcinogenesis*, 31(3), pp. 350–358. doi: 10.1093/carcin/bgp181.

Uchida, C. *et al.* (2005) 'Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-

dependent degradation', *The EMBO Journal*, 24(1), pp. 160–169. doi: 10.1038/sj.emboj.7600486.

Uchida, C. (2016) 'Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures', *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/5959721.

Unoki, M. and Nakamura, Y. (2001) 'Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway.', *Oncogene*, 20(33), pp. 4457–65. doi: 10.1038/sj.onc.1204608.

Valente, E. M. *et al.* (2001) 'Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36.', *American journal of human genetics*, 68(4), pp. 895–900. PMID: 11254447.

Vandel, L. *et al.* (2001) 'Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase', *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), pp. 6484–6494. doi: 10.1128/MCB.21.19.6484-6494.2001.

Varadi, A., Tsuboi, T. and Rutter, G. A. (2005) 'Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells.', *Molecular biology of the cell*, 16(6), pp. 2670–80. doi: 10.1091/mbc.E04-11-1001.

Varkey, J. *et al.* (1999) 'Altered Cytochrome c Display Precedes Apoptotic Cell Death in Drosophila', *The Journal of Cell Biology*, 144(4), pp. 701–710. doi: 10.1083/jcb.144.4.701.

Vaute, O. *et al.* (2002) 'Functional and physical interaction between the histone methyltransferase Suv39H1 and histone deacetylases', *Nucleic Acids Research*, 30(2), pp. 475–481. doi: 10.1093/nar/30.2.475.

Vazquez-Pianzola, P. *et al.* (2007) 'Different modes of translation for hid, grim and sickle mRNAs in Drosophila.', *Cell death and differentiation*, 14(2), pp. 286–95. doi: 10.1038/sj.cdd.4401990.

Verhagen, A. M. *et al.* (2000) 'Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.', *Cell*, 102(1), pp. 43–53. PMID: 10929712.

Verona, R. *et al.* (1997) 'E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization.', *Molecular and cellular biology*, 17(12), pp. 7268–82. PMID: 9372959.

Verstreken, P. *et al.* (2005) 'Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions.', *Neuron*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA, 47(3), pp. 365–78. doi:

10.1016/j.neuron.2005.06.018.

Viatour, P. and Sage, J. (2011) 'Newly identified aspects of tumor suppression by RB', *Disease Models & Mechanisms*, 4(5), pp. 581–585. doi: 10.1242/dmm.008060.

Vincow, E. S. *et al.* (2013) 'The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), pp. 6400–6405. doi: 10.1073/pnas.1221132110.

Vuillier, C. *et al.* (2018) 'E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its subcellular localization dynamics to trigger cell death.', *EMBO reports*. EMBO Press, 19(2), pp. 234–243. doi: 10.15252/embr.201744046.

Wagner, K. M. *et al.* (2009) 'Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005160.

Vande Walle, L., Lamkanfi, M. and Vandenabeele, P. (2008) 'The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview', *Cell Death and Differentiation*, 15(3), pp. 453–460. doi: 10.1038/sj.cdd.4402291.

Wang, S. L. *et al.* (1999) 'The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID.', *Cell*, 98(4), pp. 453–63. PMID: 10481910.

Wang, X. *et al.* (2011) 'PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility', *Cell*, 147(4), pp. 893–906. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.018.

Wasiak, S., Zunino, R. and McBride, H. M. (2007) 'Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death.', *The Journal of cell biology*, 177(3), pp. 439–50. doi: 10.1083/jcb.200610042.

Wauer, T. *et al.* (2015) 'Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis', *The EMBO Journal*, 34(3), pp. 307–325. doi: 10.15252/emboj.201489847.

Wauer, T. and Komander, D. (2013) 'Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state.', *The EMBO journal*, 32(15), pp. 2099–112. doi: 10.1038/emboj.2013.125.

Wei, M. C. *et al.* (2001) 'Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.', *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), pp. 727–30. doi: 10.1126/science.1059108.

Wells, J. *et al.* (2003) 'Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase', *Oncogene*, 22(10), pp.

1445–1460. doi: 10.1038/sj.onc.1206264.

Wenzel, P. L. *et al.* (2007) 'Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population', *Genes and Development*, 21(1), pp. 85–97. doi: 10.1101/gad.1485307.

White, K. *et al.* (1994) 'Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*.', *Science (New York, N.Y.)*, 264(5159), pp. 677–83. PMID: 8171319.

Wilson, R. *et al.* (2002) 'The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis', *Nature Cell Biology*, 4(6), pp. 445–450. doi: 10.1038/ncb799.

Wing, J. P. *et al.* (2002) 'Drosophila Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis.', *Nature cell biology*, 4(6), pp. 451–6. doi: 10.1038/ncb800.

Wing, J. P., Schwartz, L. M. and Nambu, J. R. (2001) 'The RHG motifs of *Drosophila* Reaper and Grim are important for their distinct cell death-inducing abilities.', *Mechanisms of development*, 102(1–2), pp. 193–203. PMID: 11287192.

Wong, S. and Weber, J. D. (2007) 'Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1', *The Biochemical journal*, 407(3), pp. 451–460. doi: 10.1042/BJ20070151.

Wu, Z. *et al.* (1999) 'Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1.', *Cell*. UNITED STATES, 98, pp. 115–124. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80611-X.

Xin, S. *et al.* (2002) 'The role of RBF in developmentally regulated cell proliferation in the eye disc and in Cyclin D/Cdk4 induced cellular growth.', *Development*. England, 129, pp. 1345–1356.

Xu, D. *et al.* (2006) 'The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*.', *Cell death and differentiation*, 13(10), pp. 1697–706. doi: 10.1038/sj.cdd.4401920.

Yamano, K. *et al.* (2015) 'Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation.', *The Journal of biological chemistry*, 290(42), pp. 25199–211. doi: 10.1074/jbc.M115.671446.

Yamano, K. and Youle, R. J. (2013) 'PINK1 is degraded through the N-end rule pathway', *Autophagy*, 9(11), pp. 1758–1769. doi: 10.4161/auto.24633.

Yan, N. *et al.* (2004) 'Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal

of inhibition by Reaper, Hid and Grim', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), pp. 420–428. doi: 10.1038/nsmb764.

Yi, M., Weaver, D. and Hajnóczky, G. (2004) 'Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit.', *The Journal of cell biology*, 167(4), pp. 661–72. doi: 10.1083/jcb.200406038.

Yonashiro, R. *et al.* (2006) 'A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics.', *The EMBO journal*, 25(15), pp. 3618–26. doi: 10.1038/sj.emboj.7601249.

Yoo, S. J. *et al.* (2002) 'Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms.', *Nature cell biology*. EMBO Press, 4(6), pp. 416–24. doi: 10.1038/ncb793.

Yoo, S. J. (2005) 'Grim stimulates Diap1 poly-ubiquitination by binding to UbcD1', *Mol Cells*, 20(3), pp. 446–451. doi: 930 [pii].

Yoon, Y. *et al.* (2003) 'The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1.', *Molecular and cellular biology*, 23(15), pp. 5409–20. doi: 10.1128/MCB.23.15.5409-5420.2003.

Youle, R. J. and Strasser, A. (2008) 'The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), pp. 47–59. doi: 10.1038/nrm2308.

Yu, S.-Y. *et al.* (2002) 'A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing Drosophila eye.', *Development*, 129(13), pp. 3269–3278. PMID: 12070100.

Yun, J. *et al.* (2014) 'MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin.', *Elife*, 3, p. e01958. doi: 10.7554/eLife.01958.

Zachariou, A. *et al.* (2003) 'IAP-antagonists exhibit non-redundant modes of action through differential DIAP1 binding.', *The EMBO journal*, 22(24), pp. 6642–52. doi: 10.1093/emboj/cdg617.

Zacksenhaus, E. *et al.* (1993) 'A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity.', *Molecular and cellular biology*, 13(8), pp. 4588–99. PMID: 8336704.

Zhang, L. *et al.* (2013) 'TRAP1 rescues PINK1 loss-of-function phenotypes', *Human Molecular Genetics*, 22(14), pp. 2829–2841. doi: 10.1093/hmg/ddt132.

Zhang, L. *et al.* (2014) 'Integrated Stability and Activity Control of the *Drosophila* Rbf1 Retinoblastoma Protein', *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), pp. 24863–24873. doi: 10.1074/jbc.M114.586818.

Zhang, Z. *et al.* (2016) 'Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis', *FASEB Journal*, 30(1), pp. 466–476. doi: 10.1096/fj.15-274258.

Zhou, L. and Steller, H. (2003) 'Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in drosophila embryos', *Developmental Cell*, pp. 599–605. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00085-6.

Zhuang, M. *et al.* (2013) 'Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator.', *Molecular cell*, 49(2), pp. 273–82. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.022.

Zid, B. M. *et al.* (2009) '4E-BP Extends Lifespan upon Dietary Restriction by Enhancing Mitochondrial Activity in *Drosophila*', *Cell*. Elsevier, 139(1), pp. 149–160. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.034.

Zimmermann, K. C. *et al.* (2002) 'The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells.', *The Journal of cell biology*. EMBO Press, 156(6), pp. 1077–87. doi: 10.1083/jcb.20112068.

Ziviani, E., Tao, R. N. and Whitworth, A. J. (2010) '*Drosophila* Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), pp. 5018–5023. doi: 10.1073/pnas.0913485107.

Zou, H. *et al.* (1999) 'An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.', *The Journal of biological chemistry*, 274(17), pp. 11549–56. PMID: 10206961.

Titre : Étude des évènements mitochondriaux impliqués dans le contrôle de l'apoptose par *rbf1*, l'homologue de drosophile du gène suppresseur de tumeur *rb*

Résumé : Le gène *rb* est le premier suppresseur de tumeur découvert chez l'homme. Il prévient l'apparition de tumeurs notamment en régulant négativement le cycle cellulaire. Le rôle de pRb dans le contrôle de l'apoptose est plus complexe et les mécanismes moléculaires contrôlés par ce facteur de transcription ne sont pas complètement élucidés. Il existe un homologue de *rb* chez la drosophile : *rbf1*. J'ai contribué à caractériser les évènements mitochondriaux induits au cours de l'activation de l'apoptose par Rbf1 dans le disque imaginal d'aile, un tissu en prolifération de la larve de drosophile. Dans cette voie d'apoptose, la protéine Debcl, seule membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 chez la drosophile, est activée et induit le recrutement et l'oligomérisation de Drp1, protéine effectrice principale de la fission mitochondriale. C'est ainsi qu'est déclenchée la fragmentation mitochondriale et l'accumulation d'espèces activées de l'oxygène (EAOs) mitochondriales. Ces deux évènements participent à la transmission du signal apoptotique. J'ai par ailleurs pu mettre en évidence l'implication de facteurs participant au maintien du contrôle qualité mitochondriale. Celui-ci s'assure de l'intégrité des mitochondries et, le cas échéant, déclenche la digestion des éléments défectueux par mitophagie. Enfin, j'ai contribué à l'étude des liens entre la traduction et l'apoptose induite par Rbf1. Dans cette étude, nous montrons que la poly-A binding protein (PABP) peut supprimer le phénotype d'encoche induit par Rbf1 chez l'adulte alors que la mort cellulaire induite au cours du stade larvaire n'est pas inhibée mais augmentée. Ces résultats nous ont poussé à étudier les mécanismes de compensation induits par l'appareil traductionnel, ce qui nous a permis de montrer qu'une modulation de la traduction pourrait permettre de compenser la perte de tissu consécutive à l'apoptose induite par Rbf1 sans impliquer une inhibition de l'apoptose.

Mots clés : apoptose, mitochondrie, drosophile

Title : Study of mitochondrial events involved in the control of apoptosis by *rbf1*, the *Drosophila* homolog of the tumor suppressor gene *rb*

Summary : The gene *rb* is the first tumor suppressor discovered in humans. It prevents the appearance of tumors by regulating negatively the cell cycle. The role of pRb in apoptosis is more complex and the molecular mechanisms triggered by this transcription factor are not completely elucidated. There is a *rb* homologue in *Drosophila*: *rbf1*. I participated in the characterization of mitochondrial events induced during activation of apoptosis by Rbf1 in a proliferating tissue of this model organism, the wing disc. In this apoptosis pathway, the Debcl protein, the only *Drosophila* pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, is activated and induces recruitment and oligomerization of Drp1, the main effector of mitochondrial fission. This triggers the mitochondrial fragmentation and the accumulation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). Both events participate to the transmission of the apoptotic signal. I have also been able to highlight the implication of factors involved in maintaining mitochondrial quality control which ensures the integrity of the mitochondria and, if necessary, triggers the degradation of damaged elements by mitophagy. Finally, I have contributed to the study of the links between translation and apoptosis induced by Rbf1. In this study, we show that the Poly-A Binding Protein (PABP) can suppress the Rbf1-induced notch phenotype in adults while cell death induced during larval stage was not inhibited but increased. These results prompted us to study the compensation mechanisms induced by the translational apparatus, which allowed us to show that a mRNA translation-related mechanism could counteract the loss of tissue resulting from Rbf1-induced apoptosis independently of apoptosis inhibition.

Key words : apoptosis, mitochondria, *Drosophila*