



HAL
open science

Etude fonctionnelle de Shavenbaby dans l'homéostasie du système rénal chez la drosophile

Jérôme Bohère

► **To cite this version:**

Jérôme Bohère. Etude fonctionnelle de Shavenbaby dans l'homéostasie du système rénal chez la drosophile. Génétique animale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30158 . tel-01923261

HAL Id: tel-01923261

<https://theses.hal.science/tel-01923261>

Submitted on 15 Nov 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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Jérôme Bohère

le vendredi 6 octobre 2017

Titre :

Etude fonctionnelle de Shavenbaby dans l'homéostasie du système rénal chez la Drosophile

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie cellulaire

Unité de recherche :

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Cédric Polesello

Dr. Hélène Chanut-Delalande

Jury :

Pr. David Cribbs, président

Dr. Pauline Spéder, rapportrice

Dr. François Leulier, rapporteur

Dr. Cédric Maurange, rapporteur

« L'absence de preuve n'est pas une preuve d'absence »

François Payre

Remerciements :

Le bon déroulement et l'achèvement de mes travaux de thèse ont été possibles grâce à l'aide de plusieurs personnes qui ont contribué par leurs directives, leur collaboration, leurs conseils mais aussi leur soutien.

Je remercie dans un premier temps François Payre et Serge Plaza qui m'ont accueilli dans leur équipe de recherche. François, j'estime être très chanceux d'avoir pu faire ma thèse dans ton équipe et sous ta direction. Toutes les réunions et les discussions que nous avons pu avoir ont été très enrichissantes et j'espère pouvoir mettre en pratique tout ce que tu as pu m'apprendre dans ma carrière future. Serge, bien que tu codiriges maintenant une autre équipe à l'INRA, tu as été très impliqué et disponible au cours de mon Master 2, de ma thèse et tu reste encore disponible pour mon papier et je te remercie pour ton aide.

Je voudrais également remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse Cédric Polesello et Hélène Chanut-Delalande pour leur encadrement. Cédric, tu m'as permis d'acquérir une rigueur scientifique solide, de développer un esprit critique envers mon travail. Au début de mon doctorat, tu t'es engagé à défendre mes intérêts et respecter les échéances de mon doctorat et tu l'as fait. Hélène, j'ai passé avec succès mon Master 2 et le concours de l'école doctorale grâce à toi et tu as continué pendant ma thèse à m'apprendre à rester attentif au moindre détail. Votre encadrement à tous les deux, fut un subtil mélange d'exigence, de fermeté et de justesse. Je suis heureux d'avoir pu partager ces quatre à cinq années avec vous deux pour votre disponibilité de tous les instants, votre accessibilité et votre sympathie.

Je remercie bien sur nos collaborateurs, tout d'abord Dani Osman dont les observations préliminaires dans l'intestin ont permis d'initier ce projet ainsi que les membres de l'équipe de Yuji Kageyama : Kohsuke Akino, Yuya Yamabe, Sachi Inagaki qui ont contribué, parallèlement au départ puis, conjointement à ce travail.

La réussite de cette thèse repose aussi sur le soutien constant de tous les membres de l'équipe. Bien qu'extérieurs à mon projet de thèse, ils ont été constamment disponibles et toujours de bon conseil. Leur dynamisme insuffle une excellente ambiance de travail au sein de l'équipe.

Je voudrais aussi remercier Jennifer Zanet, pour ton implication sur les tests luciférases qui n'ont malheureusement pas été concluants néanmoins tu as toujours été disponible et accessible à tous moments. Je remercie particulièrement Philippe "King of Molecular Biology" Valenti justement pour tes conseils en matière de Biologie Moléculaire, même si j'en ai fait très peu, mais aussi pour ta bonne humeur, ta discographie fournie, ta bienveillance et tes débats politiques matinaux en pièce à mouche. J'adresse mes remerciements et mes encouragements aux thésards de l'équipe : Maleaume Soulard, Sandy Al Hayek, Alexandra Mancheno-Ferris (qui a aussi contribué significativement à ce projet) et Maylis Gallois. Si j'ai réussi à aller jusqu'au bout je ne me fais aucun soucis pour vous tous. Je remercie bien sur les autres membres de l'équipe actuelle ou passée qui m'ont conseillé et épaulé à un moment ou un autre: Anne Pelissier-Monnier, Simon

Marques-Pietro, Emilie Benrabah, Audrey Montigny, Ahmad Alexandre Alsawadi, Delphine Menoret, Pierre Ferrer, Azza Dib et Yvan Latapie.

Je voudrais remercier ma famille sans qui je n'aurais pas pu arriver là où j'en suis aujourd'hui. Au cours de mes premières années universitaires je ne pense pas que vous ayez imaginé un seul instant que je soutienne un jour une thèse. Cependant, vous m'avez soutenu tout au long de mon parcours et j'espère que vous êtes fiers aujourd'hui. Je remercie spécialement Jade Hebras (Jadou) pour ta patience, plus précisément d'avoir supporté mes sautes d'humeurs et mon caractère tout ce temps mais aussi, et surtout, pour ton réconfort de tout instants.

Rétrospectivement, quand j'y repense, il se sera passé beaucoup de choses pendant ces cinq années à côtoyer les membres de l'équipe Payre: certains évènements tristes, voir même parfois plutôt inquiétants... mais heureusement d'autres beaucoup plus réjouissants. Notamment, je me rappelle de grands moments festifs et de partage dont une sacrée soirée à la Tantina de Burgos ou pour la médaille d'argent CNRS de François (celle-là je m'en souviendrai longtemps).

Bref, ce fut très intense mais j'en garderai de nombreux souvenirs et j'adresse, encore une fois, tous mes remerciements à l'équipe Payre au complet et une très bonne continuation à tous.

Table des matières

<u>REMERCIEMENTS :</u>	2
<u>TABLE DES MATIERES</u>	4
<u>ABREVIATIONS</u>	7
<u>AVANT-PROPOS</u>	8
<u>INTRODUCTION</u>	12
I- Le Renouveaulement du système digestif chez la Drosophile	13
1- <u>Fonction et organisation de l'intestin :</u>	13
2- <u>Le lignage des cellules souches intestinales :</u>	15
3- <u>Différents stress influencent l'activité des cellules souches intestinales :</u>	18
4- <u>Le micro-environnement et la niche : facteurs régulateurs des cellules souches intestinales :</u>	19
a- <u>L'effet de l'environnement local :</u>	19
b- <u>Influence des tissus environnants sur la prolifération des cellules souches intestinales :</u>	24
II- La voie de signalisation Hippo : un régulateur majeur de la prolifération	27
1- <u>Le cœur de l'Hippo :</u>	27
2- <u>Yorkie s'associe avec plusieurs facteurs de transcription pour réguler différents gènes cibles :</u>	31
3- <u>Que les forces (mécaniques) soient avec Hippo :</u>	34
4- <u>Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le renouvellement intestinal :</u>	36
5- <u>La voie de signalisation Hippo est conservée chez les mammifères :</u>	38
6- <u>Régulation de la voie de signalisation Hippo par l'architecture du cytosquelette d'actine chez les mammifères :</u>	39
III- Les tubules de Malpighi : un modèle émergeant dans l'étude des cellules souches somatiques	41
1- <u>Les cellules souches rénales chez les mammifères : un mythe ?</u>	42
2- <u>Le découplage de la fonction rénale : néphrocytes et tubules de Malpighi :</u>	44
3- <u>Le développement des tubules de Malpighi</u>	45
4- <u>La répartition fonctionnelle des tubules de Malpighi :</u>	46
5- <u>Les cellules souches rénales : ce n'est pas la taille qui compte :</u>	49
6- <u>Les facteurs régulateurs des cellules souches rénales</u>	50
IV- Shavenbaby contrôle la formation des trichomes	53
1- <u>Le locus ovo/shavenbaby :</u>	53
2- <u>Shavenbaby est nécessaire et suffisant pour la formation des trichomes :</u>	55
3- <u>Régulation de l'expression de shavenbaby :</u>	58
4- <u>Shavenbaby coordonne l'expression de gènes directement impliqués dans la formation des trichomes :</u>	62

- 5- La régulation temporelle de l'activité transcriptionnelle de Shavenbaby : _____ 64
 - a- Polished-rice enclenche la conversion de l'activité transcriptionnelle de Shavenbaby dépendante du protéasome : _____ 64
 - b- L'hormone stéroïdienne ecdysone contrôle via les peptides Polished-rice la temporalité de la différenciation épidermique : _____ 66

RESULTATS _____ **70**

I- Résumé de la publication _____ **71**

II- Manuscrit _____ **72**

III- Résumé de la publication _____ **73**

IV- Manuscrit _____ **75**

V- Résultats supplémentaires et conclusion _____ **76**

- 1- Comment est régulée l'expression de shavenbaby dans les cellules souches rénales ? _____ 76
- 2- L'ecdysone contrôle-t-elle la temporalité de l'expression de polished-rice dans les cellules souches rénales ? _____ 77
- 3- Comment visualiser directement l'apoptose dans les cellules souches rénales ? _____ 80
- 4- L'expression de shavenbaby est elle régulée par Yorkie pour assurer la survie des cellules souches rénales ? _____ 80
- 5- Quels sont les gènes cibles de Shavenbaby dans les cellules souches rénales ? _____ 82

DISCUSSION _____ **83**

I- Le « shadowing » dans les cellules souches somatiques _____ **84**

- 1- Redondance et robustesse du programme épidermique gouverné par shavenbaby : _____ 85
- 2- Des enhanceurs « shadow » différents dans les cellules souches rénales ? _____ 87
- 3- Une redondance fonctionnelle des voies de signalisation dans les cellules souches rénales ? _____ 87

II- Le contrôle systémique des cellules souches rénales par l'ecdysone _____ **89**

- 1- L'expression de polished-rice est très variable dans les cellules souches rénales : _____ 89
- 2- L'ecdysone contrôle-t-elle l'activité des cellules souches rénales en réponse au statut nutritif ? _____ 91

III- L'identification et l'étude des cellules souches somatiques : un travail de longue haleine _____ **93**

- 1- Deux sources apparentes de cellules souches intestinales chez les mammifères : _____ 93
- 2- Quelle est la descendance des cellules souches rénales chez la Drosophile ? _____ 96

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ **101**

Abréviations

- 20E : 20-Hydroxyecdysone
- Aph-4 : alkaline phosphatase 4
- BMP : Bone Morphogenetic Protein
- CE : cellule étoilée
- Chip : Chromatin Immunoprecipitation
- DIAP1 : Drosophila Inhibitor of Apoptosis
- Dilp : Drosophila Insulin like peptide
- Dpp : Decapentaplegic
- DSS : Dextran Sodium Sulfate
- EC : Entérocyte
- EcR : ecdysone Receptor
- Hh : Hedgehog
- Hnt : Hindsight
- Hpo : Hippo
- Hth : Homothorax
- InR : Insulin Receptor
- LacZ : β -galactosidase
- Mad : Mother Against Dpp
- MARCM : Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
- Mats : Mob As Tumor Suppressor
- MEC : Matrice extracellulaire
- MMP : Métalloprotéinase
- OVOL: ovo-like
- Pan : Pangolin
- Pnt : Pointed
- pre-EE : précurseur de cellule entéroendocrine
- Pri : Polished-rice
- Pros : Prospero
- ReDDM : Repressible Dual Differential stability cell Marker
- CP : cellule principale
- CSI : Cellule Souche Intestinale
- CSR : cellule souche rénale
- CSS : cellules souche somatique
- Ct : cut
- EE : cellule entéroendocrine
- EGF : Epidermal Growth Factor
- Esg : Escargot
- Ft : Fat
- GFP : Green Fluorescent Protein
- G-TRACE: Gal4 Technique for Real-time and Clonal Expression
- RFP : Red Fluorescent Protein
- RNA-seq: RNA sequencing
- Rpr : Reaper
- Sav : Salvador
- Scrib : Scribble
- Sd : Scalloped
- Svb : Shavenbaby
- Tai : Taiman
- TAZ : transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
- TEAD : TEA Domain
- TM : tubules de Malpighi
- Tsh : Teashirt
- Ubr3 : Ubr3 ubiquitine ligase
- Upd : Unpaired
- Wg : Wingless
- Wts : Warts
- YAP : Yes-associated Protein
- Yki: Yorkie

Avant-propos

Le maintien de la fonction des organes tout au long de la vie nécessite un renouvellement constant des cellules endommagées par les agressions de l'environnement. Le maintien de l'équilibre entre l'élimination des cellules abîmées et leur renouvellement, l'homéostasie, est essentielle au bon fonctionnement des organes. Le renouvellement cellulaire est très inégal en fonction des propriétés intrinsèques de chaque organe. Par exemple, au sein de l'intestin ou des cellules sanguines, il est très important (Mayhew, 1999; Potten et al., 1987). Les cellules intestinales sont ainsi entièrement renouvelées tous les 5 à 6 jours. Au contraire, d'autres tissus sont *a priori* très peu renouvelés. C'est le cas du cerveau, du rein ou du cœur (Carlson, 2005; Ihunwo et al., 2016). Cependant, en cas de lésions ou de stress (infections, blessures), ces organes peuvent aussi présenter des capacités régénératives nécessaires pour assurer le remplacement des cellules éliminées. Dans le cas du cœur, organe moins exposé aux agressions du milieu externe, le renouvellement cellulaire peut être assuré par la **dédifférenciation** des cellules matures qui vont proliférer pour colmater la blessure (Szibor et al., 2014). Les organes à fort renouvellement cellulaire comme l'intestin nécessitent une régénération active tout au long de la vie, cette dernière étant assurée par des **cellules souches somatiques** également connues sous le nom de cellules souches adultes. L'étude du comportement de ces cellules souches adultes, notamment les mécanismes qui régissent la balance prolifération-différenciation, est devenue un enjeu majeur pour les raisons suivantes :

- une altération du nombre des cellules souches pourrait être à l'origine de la dégénérescence tissulaire liée au vieillissement et au développement de tumeurs (Clevers 2011; Jones and Rando 2011).
- les cellules souches possèdent des caractéristiques communes avec les cellules souches cancéreuses impliquées dans la tumorigenèse (Visvader and Lindeman 2008).
- leur utilisation en thérapie cellulaire suscite de nombreux espoirs en médecine régénératrice (Kiskinis and Eggan 2010).

Les **cellules souches somatiques** sont des cellules **non différenciées** qui peuvent présenter une activité très faible, dans certains cas inexistante, on parle alors de cellules **quiescentes**. Ces cellules quiescentes peuvent être en pause mitotique tout le long de leur existence. C'est notamment cet état basal qui complique l'identification des cellules souches dans de nombreux organes et tissus. L'influence de l'environnement distant (systémique) ou local (microenvironnement ou niche) participe à maintenir les cellules souches somatiques dans leur état de quiescence (Cheung and Rando, 2013). A l'inverse, suite à un stress, cet environnement peut contraindre les cellules souches somatiques à sortir de leur quiescence en les poussant à proliférer et à se différencier progressivement

en un ou plusieurs types cellulaires pour compenser la perte des cellules (Lane et al., 2014). En fonction des besoins du tissu et des signaux auxquels elles sont soumises, les cellules souches somatiques peuvent effectuer deux types de divisions, symétrique ou asymétrique (Overton et al., 2002). Dans le cadre du renouvellement cellulaire naturel, la **division asymétrique** va permettre de produire une cellule en cours de différenciation afin de se substituer aux cellules endommagées, et une nouvelle cellule souche somatique permettant de maintenir constant le nombre de cellules souches (Overton et al., 2002). La **division symétrique**, plus utilisée en condition de stress, permet de donner naissance à deux cellules souches somatiques identiques et d'augmenter ainsi le nombre de cellules souches adultes. Occasionnellement, les cellules souches peuvent donner naissance à deux cellules qui se différencieront pour renouveler plus efficacement le tissu (Overton et al., 2002). Dans ce dernier cas, le nombre de cellules souches sera réduit.

Bien que la dynamique et la fonction des cellules souches somatiques ne soient plus à démontrer, leur mode de régulation reste encore mal compris. L'identification et l'étude des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'activité des cellules souches somatiques représentent donc un champ d'investigation essentiel pour appréhender le maintien de l'homéostasie d'un organe ou d'un tissu.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé comme modèle d'étude le système rénal de la Drosophile (*drosophila melanogaster*) pour étudier le comportement de cellules souches adultes. Les tubules de Malpighi sont un composant essentiel du système rénal chez la Drosophile qui assurent les fonctions excrétoires et dont le renouvellement cellulaire est soutenu par des cellules souches rénales (Singh et al., 2007). Bien que possédant de nombreuses similitudes avec les cellules souches intestinales et des propriétés singulières (capacité migratoire, reprogrammation), les cellules souches rénales n'ont reçu que très peu d'attention.

Des observations préliminaires obtenues dans l'équipe de François Payre, que j'ai rejoint pour effectuer mon Master 2 Recherche « Gènes, Cellules et Développement », m'ont conduit à effectuer mes travaux de thèse sur le système rénal et plus spécifiquement sur les cellules souches rénales. En effet, peu avant le début de ma thèse, des expériences exploratoires avaient permis de mettre en évidence que le gène *shavenbaby*, dont l'activité contrôle la morphogénèse épidermique et qui focalise l'activité du groupe depuis une quinzaine d'années, est exprimé spécifiquement dans les cellules souches rénales.

L'objectif de mon projet de thèse découle directement de ces observations et porte sur l'étude de la fonction de *svb* et de ses partenaires dans les cellules souches rénales.

Mes investigations nous ont permis d'établir que la fonction première de *Svb* est de protéger les cellules souches rénales de l'apoptose en contrôlant, de concert avec la protéine Yorkie, membre la voie de signalisation Hippo, l'expression du gène *DIAP1* codant pour une protéine à l'activité anti-apoptotique.

Dans l'introduction qui suit, je présenterai les connaissances nécessaires à la compréhension de mes travaux. Tout d'abord du fait des similitudes des cellules souches rénales et intestinales, je décrirai les mécanismes moléculaires qui régissent la régulation des cellules souches intestinales. J'apporterai une attention particulière à la voie de signalisation Hippo dont un des membres Yorkie interagit physiquement avec *Svb*. J'introduirai le système rénal adulte ainsi que nos connaissances sur le facteur de transcription Shavenbaby. Les résultats seront présentés sous la forme d'un manuscrit qui est actuellement en révision à Nature Communications. Enfin, je discuterai des différentes perspectives sous-jacentes à mon travail.

Introduction

I- Le Renouvellement du système digestif chez la Drosophile

Le système intestinal est un des plus gros organes de l'organisme qui possède la plus grande surface de contact permanent avec le milieu extérieur. Il n'est donc pas limité à son rôle dans l'absorption mais fait aussi office de barrière protectrice contre les composants néfastes qui proviennent de l'alimentation.

La Drosophile adulte se nourrit essentiellement de fruits en décompositions. Cette caractéristique l'expose à des micro-organismes potentiellement pathogènes pouvant aboutir à l'altération ou la mort des cellules intestinales. Un des moyens de protection contre ces agressions est de remplacer constamment les cellules endommagées et éliminées. Ce constant renouvellement (« turn over » en anglais) est assuré par les cellules souches intestinales (CSI) identifiées en 2007 par deux études différentes (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006). Sa relative simplicité, ainsi que la forte conservation évolutive des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'activité des CSI, font du système intestinal de la Drosophile un modèle adapté pour l'étude des CSI et plus généralement des cellules souches somatiques.

1- Fonction et organisation de l'intestin :

Le système digestif larvaire mis en place pendant l'embryogenèse dégénère en grande partie pour être reconstitué grâce à l'action de précurseurs nommés AMP (« Adult Midgut Precursor ») pendant la métamorphose (Jiang and Edgar, 2009; Micchelli et al., 2011). Ces groupes de cellules vont proliférer par divisions symétriques et ensuite se différencier par divisions asymétriques conduisant à la reformation d'un intestin. Chez le jeune adulte, la maturation (acquisition de la taille finale et production des différents types cellulaires) de ce nouvel organe nécessite trois jours. L'intestin est alors composé d'un épithélium monostratifié qui permet l'absorption des nutriments et fait également office de barrière protégeant l'organisme contre de possibles pathogènes du milieu extérieur (Davis and Engström, 2012). L'intestin est régionalisé en trois parties qui assurent des fonctions différentes : l'**intestin antérieur** où la nourriture peut être stockée dans le jabot,

l'intestin moyen dans lequel les nutriments sont absorbés suite au passage par le proventricule et l'intestin postérieur où l'absorption des nutriments est achevée et la quantité d'eau et d'électrolytes ajustée (Figure 1). L'intestin moyen qui partage la plus forte homologie avec l'intestin grêle des mammifères a été la région la plus étudiée et je me focaliserai donc à décrire ses spécificités.

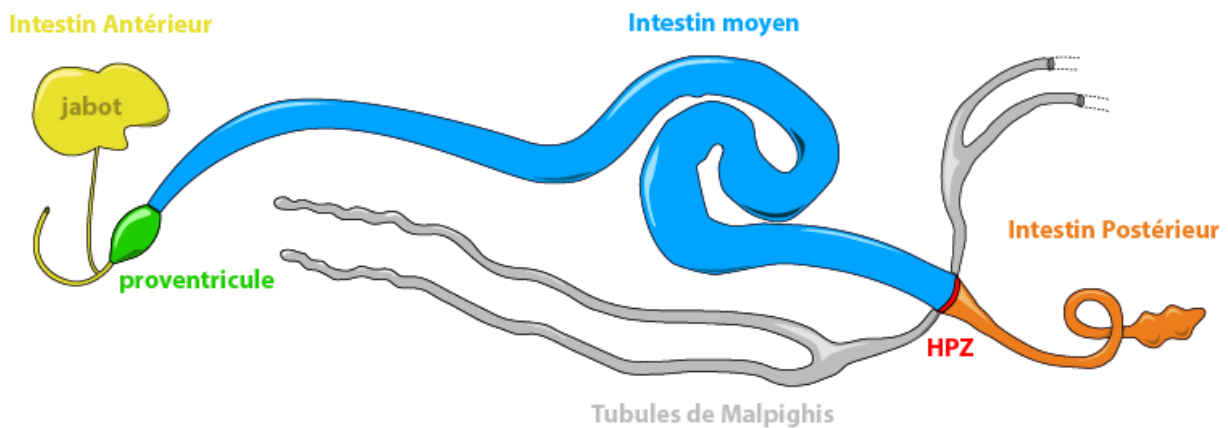


Figure 1 : Le système digestif de la Drosophile est divisé en plusieurs régions :

Schéma du système digestif de la Drosophile avec ses différentes parties : l'intestin antérieur est composé de l'œsophage et du jabot (jaune). Le proventricule (vert) est situé à la jonction entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen (bleu). Les tubules de Malpighi (gris) sont connectés au système intestinal à la jonction entre l'intestin moyen et postérieur (orange) proche de la « Hindgut Proliferation Zone » (HPZ).

L'intestin moyen est composé de deux types de cellules différenciées : les **entérocytes (EC)**, cellules polyploïdes qui assurent l'absorption des nutriments ainsi que la sécrétion d'enzymes digestives et les cellules **entéro-endocrines (EE)** diploïdes qui sécrètent divers hormones et peptides impliqués dans l'immunité et la régulation des fonctions intestinales. Les AMP assurent également la mise en place d'un troisième type cellulaire, les CSI, sous l'action du facteur de transcription Hindsight (Hnt) (Baechler et al., 2016) (Figure 2). Les CSI ont la capacité de proliférer et de se différencier pour renouveler en adéquation avec les besoins de l'organe les EC et EE (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006).

De par sa relative simplicité et son accessibilité, l'intestin moyen s'est imposé comme un modèle de choix dans l'étude des cellules souches somatiques et des mécanismes de renouvellement cellulaire.

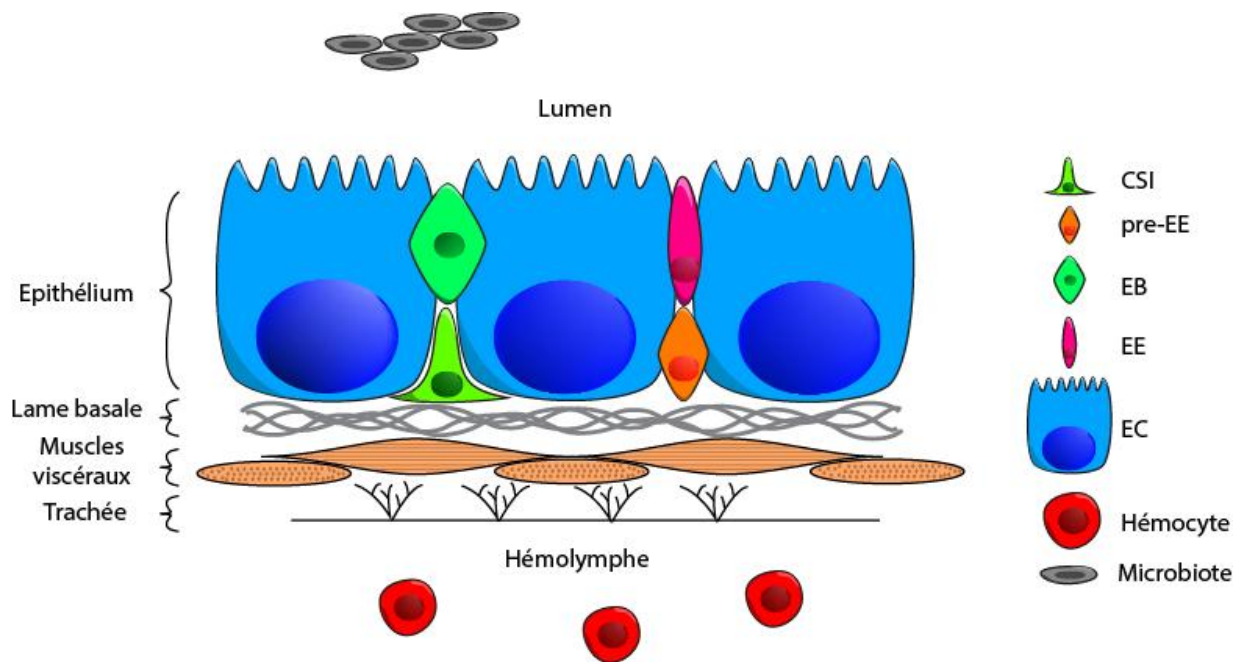


Figure 2 : L'épithélium intestinal de la *Drosophile* est composé de plusieurs types cellulaires et d'un environnement complexe :

Les fonctions intestinales sont assurées par deux types de cellules différenciées : les entérocytes (EC) et les cellules entéro-endocrines (EE). L'épithélium intestinal comprend aussi des cellules souches intestinales (CSI) en position basale et des progéniteurs : entéroblastes (EB) et cellule pré-entéroendocrine (pre-EE). L'épithélium repose sur la lame basale, une matrice extracellulaire spécialisée. Des muscles viscéraux longitudinaux et circulaires entourent tout l'intestin. Un réseau très dense de trachées permet l'apport de l'oxygène à tous ces types cellulaires. L'intestin est totalement immergé dans l'hémolymphe qui contient des cellules sanguines circulantes, les hémocytes. Enfin, l'épithélium intestinal est en contact permanent avec des micro-organismes (Microbiote) provenant de l'alimentation.

2- Le lignage des cellules souches intestinales :

L'identification des CSI en 2006 par deux groupes différents a permis de jeter les bases de la compréhension des mécanismes qui soutiennent le renouvellement de l'intestin (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006).

Ces deux études ont permis de démontrer, grâce à l'utilisation d'une stratégie de lignage qui permet de suivre la progéniture d'une cellule suite à une division mitotique, que les CSI ont la capacité après une division asymétrique de se différencier progressivement en EC et EE. Les CSI expriment les gènes *escargot* (*esg*) et *Delta* (*Dl*, ligand de la voie de signalisation Notch) (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006). *Esg* code un facteur de transcription à doigts de zinc de la famille Snail/Slug (Whiteley et al., 1992) présent dans d'autres types de cellules souches (Kiger et al., 2000; Voog et al., 2014). Bien

qu'utilisé initialement comme marquer des CSI, la fonction de ce gène n'a été adressée que récemment. Il permet le maintien des CSI dans un état indifférencié en réprimant l'expression des gènes de différenciation (Korzelius et al., 2014).

Les CSI, suite à une division asymétrique, donnent naissance à un progéniteur appelé **entéroblaste (EB)** incapable de proliférer et qui se trouve dans un état indifférencié transitionnel (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006) (Figure 3). L'expression d'*esg* y est maintenue mais elle est antagonisée par le micro-ARN *mir-8* qui va déstabiliser son ARNm et réprimer sa traduction favorisant ainsi la différenciation des EB (Antonello et al., 2015). Le choix de l'EB de se différencier en EC ou EE semble sous le contrôle de la voie de signalisation Notch. En effet, la CSI voisine exprime *Dl* et active la signalisation Notch dans l'EB. Le modèle initial propose que si la voie de signalisation Notch est fortement active, l'EB se différencie en EC. Si la signalisation Notch est faiblement active ou inactive, l'EB se différencie en EE (Bardin et al., 2010; Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006, 2007; Perdigoto et al., 2011). Cependant, des observations récentes proposent un mécanisme différent et suggèrent l'existence d'un progéniteur spécifique pour les EE, la cellule mère entéroendocrine ou cellule **pre-entéroendocrine (pre-EE)** (Biteau and Jasper, 2014; Guo and Ohlstein, 2015; Kapuria et al., 2012; Wang et al., 2015; Zeng and Hou, 2015) (Figure 3). La ségrégation asymétrique de déterminants moléculaires, tel que *prospero (pros)*, promeut la différenciation des CSI en EE (Guo and Ohlstein, 2015). L'identification d'autres acteurs majeurs de la spécification des EE agissant indépendamment de la voie de signalisation Notch suggèrent l'implication de plusieurs mécanismes parallèles dans ce processus (Wang et al., 2015). Néanmoins, des observations récentes suggèrent que les EB possèdent tout de même le potentiel de se différencier en EE. En effet, des expériences de lignage permettant de suivre spécifiquement la descendance des EB au sein desquels la voie de signalisation Notch est active, ont permis d'affirmer qu'une très faible proportion de EE pouvait être générée par les EB (Beehler-Evans and Micchelli, 2015). Il semble donc à la lueur des différentes études que le lignage au sein de l'intestin moyen soit plus complexe que ce que l'on pouvait croire initialement du fait de la probable plasticité cellulaire et de la multiplicité des facteurs impliqués.

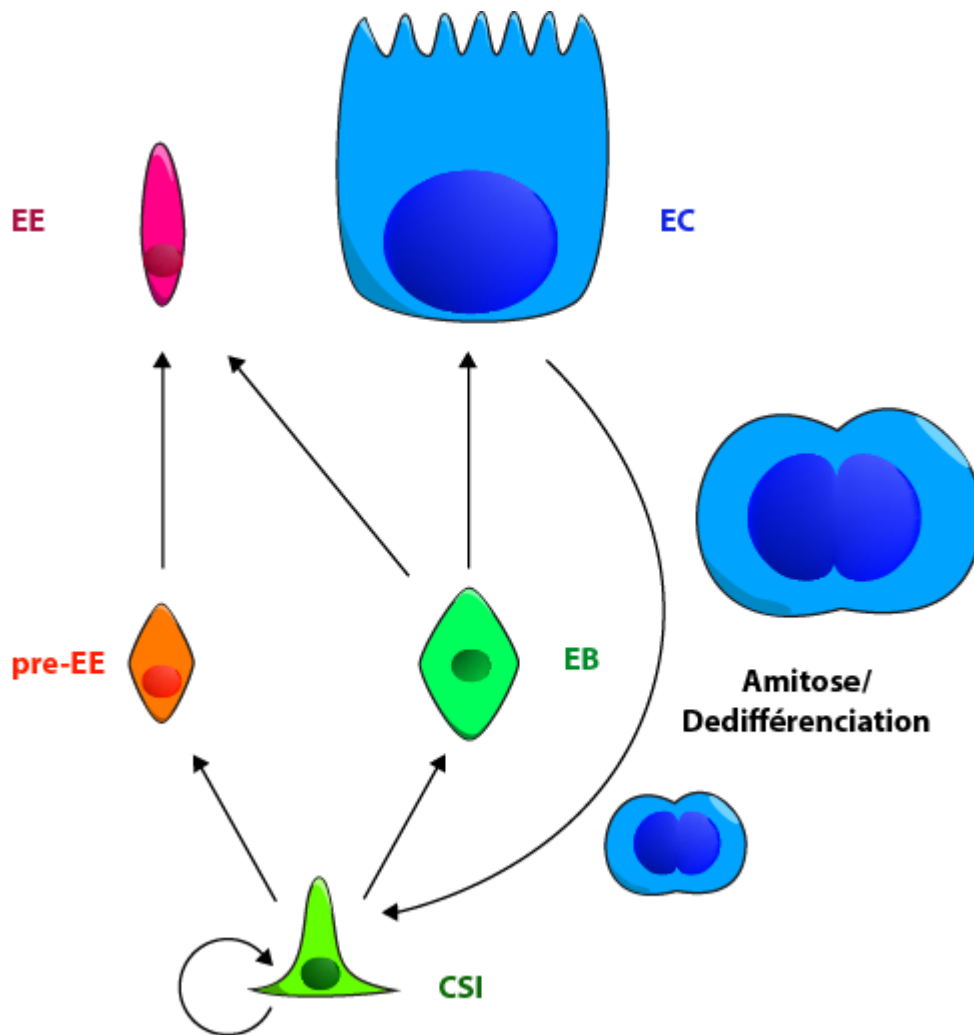


Figure 3 : Les cellules souches intestinales renouvellent les entérocytes et les cellules entéoendocrines : Représentation schématique du lignage des cellules souches intestinales. Les cellules souches intestinales (CSI) ont la capacité de proliférer et de subir une division asymétrique pour donner naissance à un entéroblaste (EB) ou un progéniteur de EE (pre-EE). Le pre-EE se différencie progressivement en EE tandis que le EB se différencie en entérocyte (EC). Il semblerait que les EB aient le potentiel de se différencier en EE. Dans certaines conditions de stress (déprivation en nourriture) les EC possèdent la particularité de pouvoir se dédifférencier via un processus d'amitose pour rétablir un état proche des CSI et participer au renouvellement de l'intestin.

3- Différents stress influencent l'activité des cellules souches intestinales :

L'environnement de l'organisme peut impliquer différents types de réponses de l'intestin. Ces agents extérieurs suite à leur ingestion peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères voire dans certains cas endommager de manière irréversible le système digestif.

L'ingestion de micro-organismes via l'alimentation, composée essentiellement dans la nature de fruits en décomposition, va agir sur le renouvellement de l'intestin de la Drosophile. La totalité des micro-organismes ingérés par la Drosophile et présents dans son tractus gastro-intestinal représente le microbiote (Figure 3). Lorsque le microbiote comprend des agents pathogènes (bactéries, virus...) il peut créer des dommages au système intestinal. Outre l'implication des défenses immunitaires, la régénération de l'intestin par les CSI constitue un des aspects importants de la lutte contre les agressions extérieures. En effet, l'infection en laboratoire par voie orale de différents types de bactéries pathogènes (*P. entomophila*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*...) provoque des dommages au système intestinal qui induit une réponse proliférative des CSI afin de remplacer les cellules endommagées (Apidianakis et al., 2009; Buchon et al., 2009a, 2009b, 2010; Cronin et al., 2009; Vodovar et al., 2005) (Figure 4). Il est intéressant de noter qu'en fonction de la nature des microorganismes qui composent le microbiote, celui-ci peut aussi avoir des effets bénéfiques. En effet, les drosophiles qui se développent sur un milieu axénique (exempt de tous germes) sont plus sensibles à l'infection de bactéries pathogènes. Ceci s'explique par l'induction d'un renouvellement de base plus efficace du tissu intestinal mais aussi par l'activation des défenses immunitaires (Bonfini et al., 2016).

Tout comme pour les bactéries pathogènes, l'ingestion d'agents toxiques présents dans l'environnement peut induire une réponse proliférative des CSI. En effet, il a été montré que l'absorption de Dextran Sulfate Sodium (DSS) provoque des dommages à la lame basale de l'intestin et promeut la prolifération des CSI (Amcheslavsky et al., 2009) (Figure 4). Les mêmes effets ont été observés lors d'un traitement à la Bléomycine, un antibiotique cytotoxique produisant des dommages à l'ADN des cellules épithéliales (Amcheslavsky et al., 2009) (Figure 4). Enfin, l'utilisation du paraquat permet d'induire un stress oxydatif via la production d'espèces réactives de l'oxygène qui activent la régénération de l'intestin par les CSI (Choi et al., 2008).

Les agents infectieux ou chimiques de l'environnement entraînent donc des dommages au système intestinal, qui induit alors la prolifération des CSI afin de se régénérer. En laboratoire, l'utilisation d'infections bactériennes et d'agents chimiques toxiques permet donc d'étudier les mécanismes de régénération de l'intestin.

4- Le micro-environnement et la niche : facteurs régulateurs des cellules souches intestinales :

L'activation de la régénération de l'intestin suite aux stress implique l'existence de senseurs qui détectent ces dommages et activent en réponse le renouvellement, par les CSI, des cellules endommagées. L'implication d'un contrôle par des acteurs internes et externes au tissu pour percevoir les dommages au niveau de l'intestin et pour coordonner la réponse des CSI à l'échelle de l'organisme est effectivement primordiale. Je présenterai dans ce paragraphe les acteurs du contrôle local et systémique qui jouent un rôle dans la régulation du comportement des CSI.

a- L'effet de l'environnement local :

Les entéroblastes et les entérocytes :

Les cellules épithéliales intestinales sont les principales cibles des dommages infligés par les infections bactériennes et les agents cytotoxiques. En effet, la présence de *P. entomophila*, *E. coli* (Ecc15), *P. aeruginosa* ainsi que la bléomycine provoque l'activation de l'apoptose spécifiquement dans les EC et leur élimination dans le lumen (Amcheslavsky et al., 2009; Apidianakis et al., 2009; Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2009). De façon surprenante l'inhibition de l'apoptose des EC suite à ces agressions abolit la réponse proliférative des CSI. De plus, en absence d'infection, l'expression d'un gène pro-apoptotique *reaper* (*rpr*) dans les EC est suffisant pour induire la prolifération des CSI (Jiang et al., 2012). Cela montre donc que les EC endommagés participent à la régulation des CSI (Amcheslavsky et al., 2009; Apidianakis et al., 2009; Jiang et al., 2009). Au niveau moléculaire, il a été mis en évidence que les EC stressés ou en apoptose, secrètent le ligand de la voie de signalisation JAK/STAT, Unpaired (Upd). En se fixant à son récepteur Domeless présent à la surface des CSI, Upd est capable d'activer la voie de signalisation JAK/STAT dans les CSI promouvant leur prolifération et favorisant le renouvellement des cellules épithéliales (Buchon et al., 2009a; Cronin et al., 2009; Jiang et al., 2009). Les EC

peuvent aussi communiquer leur stress aux CSI par la sécrétion d'un des ligands de la voie de signalisation EGF, Keren. Tout comme la voie de signalisation JAK/STAT, l'activation de la voie de signalisation EGF promeut la prolifération des CSI (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2012). Les EC endommagés à la suite d'une agression pathogène ou chimique participent donc à la régulation de l'activité des CSI de façon non cellulaire autonome via l'activation de la voie de signalisation EGF et JAK/STAT.

De la même façon, il a aussi été mis en évidence que les EB participent positivement à la régulation de la prolifération des CSI (Figure 4). Suite à une infection (*P. entomophila*, *Ecc15*), les EB secrètent Spitz, un autre ligand du récepteur EGFR, ainsi que Upd pour activer respectivement les voies de signalisation EGF et JAK/STAT dans les CSI et promouvoir leur prolifération (Buchon et al., 2010; Jiang et al., 2012; Tian et al., 2015). L'expression de *upd* dans les EB est contrôlée par la voie de signalisation Hedgehog (Hh), activée dans ces cellules suite à la production du ligand Hh par les EC (Tian et al., 2015). De façon similaire les EB, suite à une infection (*P. entomophila*) ou un traitement au DSS, secrètent le ligand Wingless (Wg) pour activer la voie de signalisation Wnt dans les CSI et promouvoir leur prolifération via l'activation de l'expression de *myc* (Cordero et al., 2012). Enfin, les EB peuvent aussi participer à l'ajustement du nombre de CSI en fonction de l'alimentation. En effet, la nature du régime alimentaire, pauvre (mélasse) ou riche (mélasse + levure), influence la prolifération des CSI (Choi et al., 2011). La modification du bol alimentaire, comme une période de carence, est capable de limiter la production d'Insuline (Kannan and Fridell, 2013) dont la conséquence est de réduire l'activation de cette signalisation dans l'organisme. Au sein des EB, la perte de la signalisation Insuline, qui peut être simulée par une perte de fonction du récepteur à l'Insuline (InR), a pour conséquence de modifier les propriétés d'adhésion des EB aux CSI. Cela se traduit par une accumulation de la DE-cadhérine au niveau des jonctions entre ces deux types cellulaires. Cette modification de l'architecture cellulaire des EB semble bien responsable de l'effet non cellulaire autonome observé sur la prolifération des CSI (Amcheslavsky et al., 2009; Choi et al., 2011). En effet, la perte de fonction de la DE-cadhérine, spécifiquement dans les EB, perturbe l'association EB/CSI et favorise la surprolifération des CSI (Choi et al., 2011).

Les cellules souches sont décrites dans de nombreux systèmes pour être particulièrement résistantes à l'apoptose. C'est le cas des CSI dont le nombre reste stable tout au long de la vie et ne diminue que très tardivement lors de la surexpression du gène pro-apoptotique *reaper* (*rpr*) (Ma et al., 2016). Cependant il vient d'être montré que lors d'une situation de

stress extrême (déprivation de nourriture pendant 2 jours), le nombre de CSI est considérablement réduit (Lucchetta and Ohlstein, 2017). Cette étude a ainsi mis en évidence une manière originale de former *de novo* des CSI. En effet dans ces conditions de fort stress, les EC, cellules fortement polyploïdes, vont se dédifférencier via un processus nommé amitose permettant de revenir à un état de diploïdie proche de celui des CSI afin de rétablir leur nombre et de maintenir l'homéostasie du tissu (Lucchetta and Ohlstein, 2017) (Figure 4).

Les EB et les EC, qui sont donc les cellules principalement endommagées lors de stress infectieux ou chimiques, sont capables d'activer de façon indirecte la prolifération des CSI, favorisant ainsi leur renouvellement. A l'inverse, suite à une forte déplétion des CSI, les EC ont aussi la capacité de se dédifférencier afin de réacquérir des capacités « souches » pour rétablir l'homéostasie du tissu.

Le rétrocontrôle des cellules entéroendocrines :

La population des EE au sein de l'épithélium intestinal est très faible en comparaison de celle des EC. Pour maintenir l'homéostasie de l'intestin, il est important de limiter leur nombre (Amcheslavsky et al., 2014) car elles ne participent pas à l'absorption proprement dite et peuvent avoir, du fait de leur fonction, un effet systémique. Pour cela, les EE expriment le ligand D1 qui induit de façon paracrine l'activation de la voie de signalisation Notch dans les CSI. Ceci permet de réprimer la production de EE en favorisant la production des EC (Guo and Ohlstein, 2015). Récemment, il a été mis en évidence que les EE sécrètent aussi le ligand Slit qui se fixe à son récepteur Robo spécifiquement exprimé par les CSI. Cette fixation permet de réprimer l'expression de gène *prospero* (*pros*) acteur majeur de la différenciation des EE et donc de réduire leur production (Biteau and Jasper, 2014). Les EE sont aussi capables d'influencer l'activité des CSI par la sécrétion d'hormones agissant sur les muscles viscéraux (Amcheslavsky et al., 2014; Scopelliti et al., 2014). Je détaillerai ce mécanisme dans le paragraphe traitant de la fonction de ces muscles dans la niche. L'ensemble des données recueillies établissent que les EE régulent plusieurs aspects de l'activité des CSI en influençant leur choix de différenciation et en contrôlant leur prolifération (Figure 4).

Le contrôle de la matrice :

La matrice extra-cellulaire (MEC) est un composant majeur de l'environnement tissulaire intestinal. Sa composition peut différer en fonction des propriétés et des fonctions des tissus et des organes qu'elle soutient, ainsi qu'au cours du temps. Au sein de l'intestin, la

MEC joue aussi un rôle important dans la régulation des CSI. La lame basale, qui constitue la MEC et entoure l'épithélium digestif, est en contact permanent avec les CSI qui se trouvent en position basale, proche du muscle viscéral (Figure 3). La MEC sert en premier lieu d'ancrage aux CSI et permet leur maintien dans un environnement propice à leur fonction. En effet, les CSI expriment les gènes *multiple edematous wings (mew)* et *myospheroid (mys)* codant respectivement pour l' α -intégrine et la β -intégrine. Ce système protéique assure l'adhésion des CSI à la lame basale. Cette interaction est primordiale à la prolifération des CSI pour l'homéostasie du tissu ou en réponse à des signaux prolifératifs (Lin et al., 2013). Les CSI assurent aussi la sécrétion de la protéine Perlecan codée par le gène *terribly reduced optic lobes (trol)*. La présence de cet heparan sulfate protéoglycan à la surface des CSI est nécessaire à leur ancrage sur la lame basale, ainsi que pour maintenir leur identité. En effet, la perte de fonction de *trol* conduit au détachement des CSI, à la perte de l'expression de *Dl* et donc à la perte de leur caractère souche (You et al., 2014). Comme évoqué plus haut, la MEC est une structure dynamique, flexible, qui évolue avec le temps. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont capables du fait de leur activité protéolytique de moduler la composition de la MEC ainsi que de modifier le recyclage de nombreux substrats. Les deux MMP (MMP1 et 2) présentes chez la Drosophile sont exprimées dans l'intestin et ce dans tous les types cellulaires. Leur expression augmente au fil du temps ou lors d'un stress oxydatif (paraquat) favorisant la prolifération des CSI, possiblement en augmentant la sensibilité des CSI aux signaux prolifératifs comme les ligands de la voie EGF (Lee et al., 2012).

La MEC joue donc un rôle déterminant dans l'homéostasie de l'intestin et dans le contrôle de la prolifération des CSI à la fois dans l'espace et dans le temps (Figure 4).

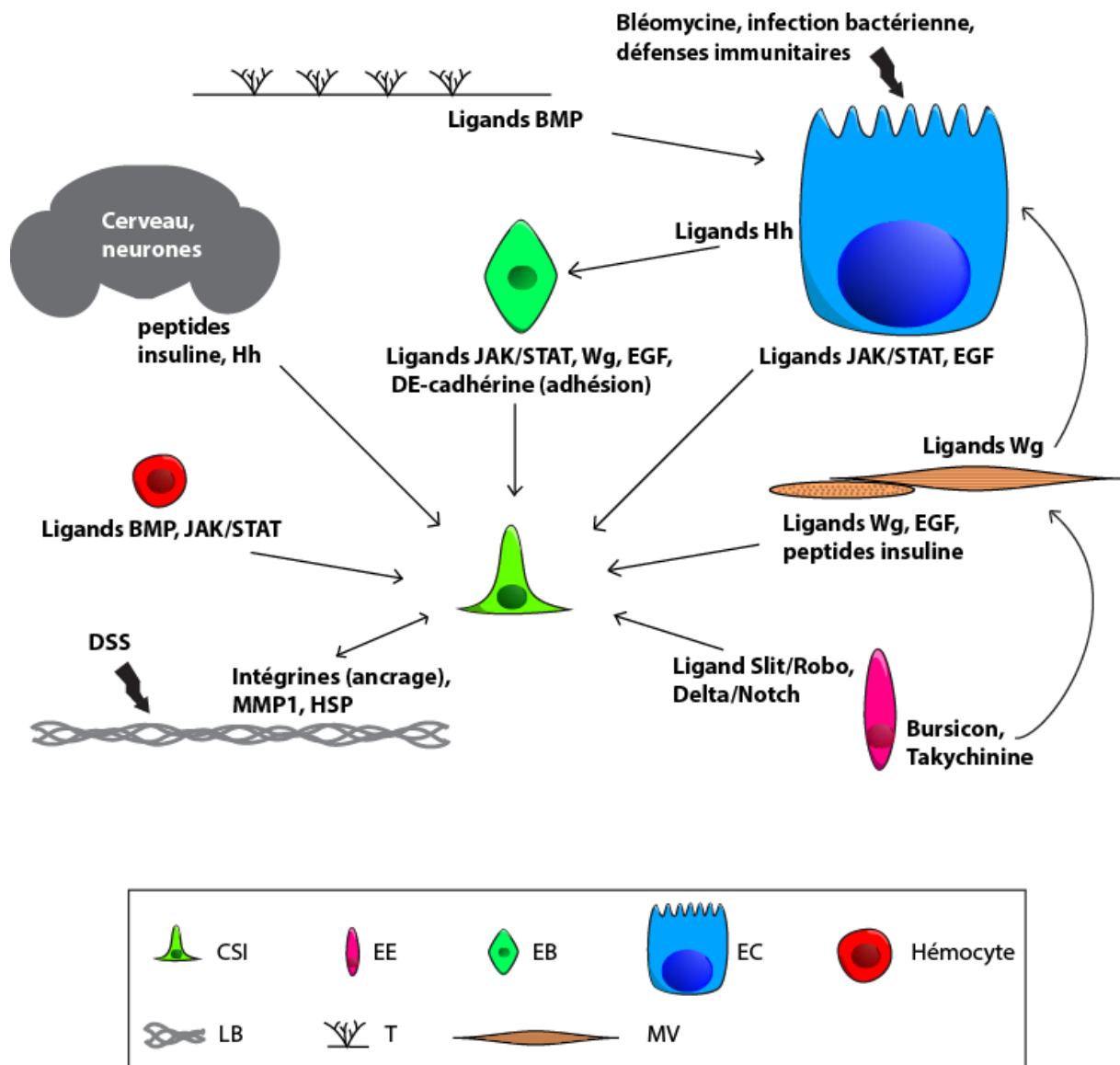


Figure 4 : Les cellules souches intestinales intègrent les informations transmises par un grand nombre d'éléments de son environnement :

Les entérocytes (EC), entéroblastes (EB), cellules entéro-endocrines (EE), muscles viscéraux (MV), hémocytes agissent localement sur l'activité des cellules souches intestinales (CSI). La lame basale (LB) fait office d'ancrage pour les CSI afin qu'elles conservent leur identité. La trachée (T) agit indirectement via les EC sur le comportement des CSI. Enfin le cerveau et les neurones constituent un élément de contrôle systémique pour réguler l'activité des CSI. Le contrôle de l'homeostasie du système intestinal par ces éléments est effectué via la sécrétion de différents signaux moléculaires dont la production est influencée par divers stress (Dextran Sodium Sulfate (DSS), bléomycine, infection bactérienne et réponses immunitaires)

b- Influence des tissus environnants sur la prolifération des cellules souches intestinales :

Le relai des muscles viscéraux :

La fonction première des muscles viscéraux qui entourent l'intestin est d'assurer le déplacement du bol alimentaire le long du tractus gastro-intestinal (Figure 3). Ils sont composés de muscles circulaires et longitudinaux. Bien que séparés par la lame basale de l'intestin, ces muscles influencent le comportement des CSI (Figure 4). Tout d'abord, au cours du développement durant la maturation de l'intestin, ils participent à définir le nombre de CSI, leur ablation entraînant une réduction du nombre de CSI (Aghajanian et al., 2016). Dans l'intestin mature, les muscles viscéraux jouent le rôle de **niche** et influencent le comportement des CSI. Les cellules musculaires sécrètent le ligand Wg qui va activer la voie de signalisation Wg dans les CSI et ainsi favoriser leur auto-renouvellement. Il a notamment été montré que l'altération de la voie de signalisation Wg simulée soit par la perte de fonction du récepteur *frizzled* (récepteur de Wg), ou du facteur de transcription terminal *pangolin*, réduit le nombre de CSI (Lin and Xi, 2008). Inversement, un gain de fonction consécutif à la surexpression de *wg* ou de *armadillo* (codant pour la β -catenin) active la prolifération des CSI (Lin and Xi, 2008). Cependant le rôle de la voie de signalisation Wg semble plus complexe. Un autre modèle propose que la sécrétion du ligand Wg par les muscles viscéraux active principalement la signalisation Wg dans les EC et non dans les CSI. Dans ce cas l'activation de la voie de signalisation Wg dans les cellules musculaires inhibe la sécrétion des ligands Upd2 et Upd3 par les EC, inactivant ainsi la voie de signalisation JAK/STAT au sein des CSI et donc leur prolifération (Tian et al., 2016). Un troisième modèle propose que les EB soit la seule source du ligand Wg (Cordero et al., 2012). Si l'implication de la voie Wg semble évidente, la source du ligand Wg fait encore débat entre muscles viscéraux et EB, remettant en cause la notion de niche pour les muscles viscéraux.

Si la sécrétion de Wg par les cellules musculaires peut être soumise à débat, d'autres études indépendantes soutiennent le fait que ce tissu agit de façon cellulaire non autonome sur la prolifération des CSI. Il a notamment été montré que les cellules musculaires sont capables de sécréter Vein, un ligand de la voie de signalisation EGF, dont la fixation sur son récepteur, présent à la surface des CSI, favorise leur prolifération (Biteau and Jasper, 2011). La sécrétion de Vein est elle-même contrôlée de façon non cellulaire autonome par les EE qui sécrètent des hormones, comme le bursicon, pour réprimer son expression (Scopelliti et al., 2014). Sur le même schéma, les EE suite à la

prise alimentaire, sécrètent la tachykinine capable d'induire l'expression de *dilp3* (*drosophila insulin like peptide 3*) dans les muscles. La fixation de *dilp3* sur son récepteur (InR) permet l'activation de la voie de signalisation de l'Insuline au sein des CSI favorisant ainsi leur état prolifératif (Amcheslavsky et al., 2014). De plus, le niveau d'expression de *dilp3* par les muscles augmente très rapidement (1 jour) après la prise alimentaire et la perte de fonction spécifique de *dilp3* dans les muscles viscéraux abolit la prolifération des CSI, même après une prise alimentaire (O'Brien et al., 2011).

Pour finir, et ce même si le rôle de la voie de signalisation Wg reste controversée, il est clairement établi que les muscles viscéraux intègrent directement, ou par l'intermédiaire des EE, des signaux environnementaux pour réguler l'activité des CSI.

Les deux facettes du système respiratoire :

Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules intestinales ont besoin d'oxygène pour fonctionner. Chez la Drosophile, le réseau trachéal, assurant l'apport d'oxygène, est intimement lié aux cellules intestinales (Figure 3). Les cellules trachéales les plus distales (proches des cellules intestinales) expriment *Decapentaplegic (Dpp)*, le ligand chez la Drosophile de la voie de signalisation BMP. La perte d'expression de *Dpp* dans les trachées induit une surprolifération des CSI (Li et al., 2013). En effet, en situation normale le ligand *Dpp* produit par les trachées active la voie de signalisation BMP dans les ECs permettant leur survie. La trachée régule donc l'homéostasie du système intestinal en contrôlant indirectement la prolifération des CSI, via le maintien de la survie des ECs (Figure 4).

L'apport des hémocytes à la régénération :

Le tube digestif est complètement immergé dans l'hémolymphe qui contient des cellules sanguines en libre circulation, les hémocytes (Figure 3). En situation normale, il existe 2 populations d'hémocytes, les plasmatocytes capables de phagocyter des corps étrangers, et les cellules à cristaux impliquées dans les processus de cicatrisation (Wang et al., 2014). Une étude très intéressante a pu montrer que les plasmatocytes sont attachés à la lame basale proche de l'épithélium intestinal et influent sur le comportement des CSI (Ayyaz et al., 2015). Ainsi, suite à une infection bactérienne, un des 2 types de ces cellules phagocytaires s'accumulent dans l'intestin et sécrète les molécules diffusibles *Dpp* et *Upd3* qui activent respectivement les voies de signalisation BMP et JAK/STAT favorisant la prolifération des CSI et donc la régénération intestinale (Ayyaz et al., 2015; Chakrabarti et al., 2016). Les cellules sanguines sont donc capables d'identifier une condition de stress et

d'y répondre en favorisant la régénération du tissu intestinal par l'intermédiaire des CSI (Figure 4).

Le contrôle systémique du renouvellement intestinal :

Le système digestif est contrôlé à travers la production d'hormones par le système nerveux permettant de moduler la digestion en fonction de l'environnement extérieur (Figure 4). Ainsi, le cerveau par l'intermédiaire des neurones sécréteurs d'Insuline expriment différents types de *dilp* (il existe 8 membres) et l'expression de *dilp2* et *dilp5* augmente 4 jours après la prise alimentaire (O'Brien et al., 2011). De même, il a été montré que suite à un stress par exposition de l'intestin au DSS (Dextran Sulfate Sodium), la production de Dilp2 par les neurones sécréteurs du cerveau est nécessaire pour maintenir la prolifération des CSI (Amcheslavsky et al., 2009). Tout porte à croire que le contrôle systémique de la prolifération des CSI via la sécrétion de Dilp2 et Dilp5, qui survient tardivement, assure un contrôle de la réponse nutritionnelle à l'échelle de l'organisme entier tandis que les muscles viscéraux agissent localement sur les CSI par l'intermédiaire de Dilp3 (O'Brien et al., 2011).

De plus, des projections neuronales sont situées aux alentours des muscles viscéraux et sont donc à proximité des CSI (Cognigni et al., 2011). Il a été montré que les EC sécrètent le ligand Hh et activent la voie de signalisation dans ces neurones qui agissent de manière non cellulaire autonome pour favoriser la prolifération des CSI en stimulant la signalisation JAK/STAT (Han et al., 2015). L'influence systémique du cerveau et des neurones ajoute donc un niveau supplémentaire au contrôle à distance de l'activité des CSI.

L'ensemble des travaux présentés ici montrent que de nombreux acteurs agissent localement (EC, EE), à distance (muscles viscéraux, trachées, hémocytes) ou de façon systémique (cerveau) et qu'ils peuvent dialoguer entre eux pour s'adapter aux différentes conditions nutritives ou de stress pour contrôler la balance prolifération/différenciation et maintenir ainsi l'homéostasie de l'intestin.

II- La voie de signalisation Hippo : un régulateur majeur de la prolifération

En plus des voies de signalisation Wg, Hh, EGF, BMP et Notch qui participent à la régulation de l'activité des CSI, une autre voie découverte dans les années 2000 joue un rôle central dans ces mécanismes, la voie de signalisation Hippo. La voie de signalisation Hippo est un acteur clef de la régulation de la croissance des organes et de l'homéostasie tissulaire. Cette voie de signalisation, régulée notamment par les forces physiques appliquées à la cellule, va influencer la prolifération et l'apoptose (Harvey et al., 2003; Jia, 2003; Lai et al., 2005; Pantalacci et al., 2003; Thompson and Cohen, 2006; Udan et al., 2003; Wu et al., 2003) afin d'assurer au cours du développement une croissance adaptée des organes et un renouvellement tissulaire adéquat en fonction des besoins de l'organisme. Bien qu'identifiée chez la Drosophile, la voie de signalisation Hippo est conservée au cours de l'évolution (Lin and Pearson, 2014) et sa dérégulation participe à l'initiation et à l'agressivité des cancers du poumon, foie, colon, sein, ovaire... (Moroishi et al., 2015; Siew et al., 2008; Steinhardt et al., 2008). J'aborderai brièvement dans cette partie les similitudes fonctionnelles et mécanistiques de la voie entre la Drosophile et les mammifères. Je détaillerai tout d'abord les acteurs et mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation Hippo et je porterai ensuite une attention particulière aux acteurs associés au cytosquelette d'actine qui régulent la voie de signalisation en amont. Je présenterai enfin le rôle de la voie de signalisation Hippo dans la régulation des CSI.

1- Le cœur de l'Hippo :

Le premier membre de la voie de signalisation Hippo, nommé *warts* (*wts*) a été identifié en 1995. L'induction de clones mitotiques de cellules mutantes pour *wts* provoque une hyperplasie dans la patte, l'aile, l'œil et dans d'autres tissus (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995). Les autres membres qui sont les gènes *salvador* (*sav*) (Kango-Singh, 2002; Tapon et al., 2002), *hippo* (*hpo*) (Harvey et al., 2003; Jia, 2003; Pantalacci et al., 2003; Udan et

al., 2003; Wu et al., 2003) et *mob as tumor suppressor (mats)* (Lai et al., 2005), qui constituent avec Wts le cœur de cette signalisation, ont été identifiés grâce à des cribles génétiques recherchant des gènes de type « suppresseur de tumeur ». La dérégulation de ces gènes provoque des phénotypes de surprolifération (Figure 5) similaire à celle induite par la perte de fonction de *wts* et des études biochimiques ont révélé que les produits de ces gènes interagissent physiquement. Cela a permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe Hippo/Sav/Wts/Mats (complexe Hippo par la suite), qui contrôle la prolifération des cellules en agissant sur l'expression des gènes *cyclinE* et *DIAP1* ce dernier codant pour une protéine inhibitrice d'apoptose (Huang et al., 2005).

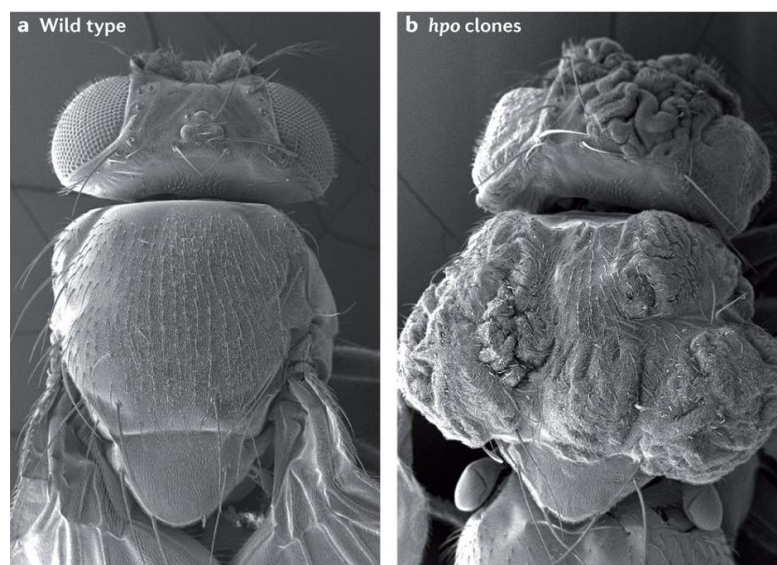


Figure 5 : Hippo est un suppresseur de tumeur :

Images de microscopie électronique montrant la cuticule d'une Drosophile adulte sauvage (a Wild type) ou présentant une hyperprolifération déformant la cuticule suite à l'induction de clones mitotiques homozygotes mutants pour *hippo* (b *hpo* clones) (Halder and Johnson, 2011).

Après la découverte du complexe Hippo, d'autres études ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires qui associent les membres de ce complexe. Dans ce paragraphe, je présenterai les interactions et le rôle respectif des 4 membres du complexe Hippo ainsi que l'effet de ce complexe sur l'un des éléments clés de la voie de signalisation, l'effecteur nucléaire Yorkie (Yki).

Hpo code une protéine de la famille des kinases Ste20 (Harvey et al., 2003; Wu et al., 2003). Son activité est stabilisée par la protéine chaperonne Sav (Justice et al., 1995;

Kango-Singh, 2002; Tapon et al., 2002). Hpo, en phosphorylant Sav, stabilise leur interaction mutuelle (Aerne et al., 2015; Wu et al., 2003). Hpo peut alors phosphoryler Wts, kinase de la famille des NDR (Nuclear DBF2 related), ainsi que Mats, protéine chaperonne qui interagit avec Wts pour renforcer son activité kinase (Justice et al., 1995; Wei et al., 2007; Wu et al., 2003). Cette cascade de kinases, au sein de laquelle Hpo joue un rôle central, permet l'inactivation d'un seul effecteur nucléaire, Yki. Yki a été identifié dans un crible double hybride car il interagit avec Wts (Wu et al., 2008) (Figure 6). Yki est un coactivateur transcriptionnel dont la phosphorylation par Wts entraîne son inactivation qui se traduit par sa rétention dans le cytoplasme. L'interaction entre Yki et Wts s'effectue par l'intermédiaire des deux domaines WW portés par Yki qui reconnaissent les motifs PPxY de Wts (au nombre de 5). La protéine 14-3-3 qui reconnaît la forme phosphorylée de Yki participe activement à sa rétention cytoplasmique (Huang et al., 2005; Oh and Irvine, 2008; Ren et al., 2010a). La fonction du complexe Hippo est d'inhiber l'activité transcriptionnelle de Yki, qui lorsqu'elle est présente dans le noyau promeut la prolifération cellulaire en augmentant l'expression de *cyclin E* et *DIAP1* (Figure 6).

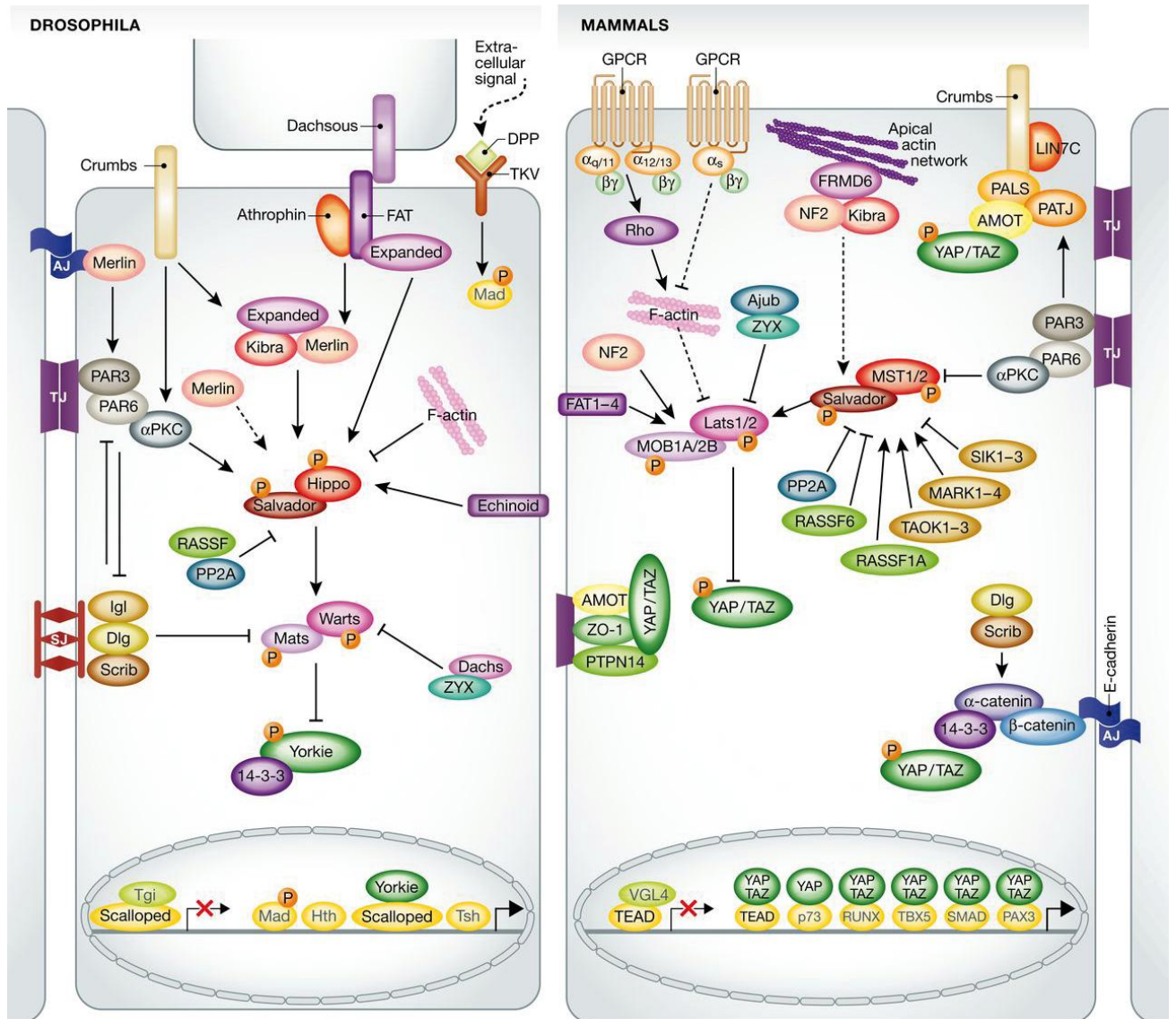


Figure 6 : Schéma illustrant la conservation et la diversité des acteurs moléculaires contrôlant la voie de signalisation Hippo chez la Drosophile et les mammifères (Mo et al., 2014).

2- Yorkie s'associe avec plusieurs facteurs de transcription pour réguler différents gènes cibles :

Une des questions essentielles à la compréhension de la voie de signalisation Hippo a été d'identifier les mécanismes qui permettent au co-facteur de transcription Yki de contrôler l'expression génique. En effet, Yki ne peut pas se lier directement à l'ADN et doit donc s'associer à un ou des facteurs de transcription pour contrôler l'expression de ses gènes cibles. Le premier d'entre eux à être identifié fut *Scalloped (Sd)* qui appartient aux facteurs de transcription de la famille TEAD (Campbell et al., 1992; Goulev et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Depuis, il a été mis en évidence que Yki pouvait avoir d'autres partenaires comme Homothorax (Hth), Teashirt (Tsh) ou encore Mad, lui permettant de réguler l'expression de groupes de gènes différents en fonction du contexte cellulaire et tissulaire (Oh and Irvine, 2011; Peng et al., 2009).

Une coquille comme partenaire du York :

La protéine Sd était initialement connue pour agir avec son partenaire Vestigial (Vg), pour influencer sur le développement du disque imaginal d'aile (Simmonds et al., 1998). Différentes approches, essentiellement moléculaires (crible double hybride), ont permis d'identifier une interaction physique entre Yki et Sd. (Campbell et al., 1992; Giot, 2003; Goulev et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2008) (Figure 6). La partie C-terminale de Sd s'associe avec le domaine NH (N-terminal homology) de Yki (Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Il a été montré que 50-60% des sites occupés par Yki, identifiés par ChiP (Chromatin Immunoprecipitation), comprennent un ou plusieurs sites putatifs de liaison à Sd (Oh et al., 2013) suggérant que la majeure partie des gènes cibles de la voie de signalisation Hippo est régulée grâce à la formation du complexe Yki/Sd. Les cibles transcriptionnelles identifiées par différentes études du complexe Yki/Sd sont *DIAP1* (*drosophila inhibitor of apoptosis 1*), *bantam*, *cyclin E* (Shu and Deng, 2017; Zhang et al., 2008) et *myc* (Neto-Silva et al., 2010; Ziosi et al., 2010). DIAP1 est une protéase inhibant les caspases initiateurs et effectrices qui initient le processus d'apoptose (Hawkins et al., 1999; Meier et al., 2000; Tenev et al., 2005; Yan et al., 2004). Il est intéressant de noter que l'action de la voie de signalisation Hippo sur DIAP1 peut également s'effectuer au niveau de la protéine. En effet, DIAP1 peut être phosphorylée et déstabilisée par la protéine kinase Hpo (Pantalacci et al., 2003). La Cycline E est une cycline régulatrice du cycle cellulaire gouvernant le passage de la transition G1/S en initiant la réplication de l'ADN (Hwang and Clurman, 2005). *Bantam* est un micro-ARN impliqué dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose via l'inhibition de gènes pro-apoptotiques (Brennecke

et al., 2003). Enfin *myc*, une cible commune avec la voie de signalisation Wg, promeut la synthèse ribosomale et régule l'apoptose, la prolifération et le métabolisme (Dang, 1999). Un nombre important des membres de la voie de signalisation Hippo, dont certains seront évoqués plus tard et agissant en amont du complexe Hippo, comme Merlin (mer) et Expanded (Ex) (voir paragraphe II-3) sont des cibles transcriptionnelles de la voie de signalisation (Hamaratoglu et al., 2006).

L'association de Yki avec Sd permet donc d'activer l'expression d'un groupe de gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et l'initiation de la prolifération cellulaire. Cependant, la voie de signalisation Hippo est active dans tous les tissus alors que l'expression de *sd* est plus restreinte (Campbell et al., 1992; Srivastava et al., 2004; Zhang et al., 2008). Par exemple, l'expression de *sd* ne semble pas nécessaire à la survie cellulaire dans l'œil alors que la voie de signalisation Hippo y contrôle la prolifération (Campbell et al., 1992). De plus, les analyses réalisées à l'échelle du génome (Oh et al., 2013), comme mentionné précédemment, montrent qu'une partie des gènes cibles de Yki ne comprennent pas de site consensus de fixation pour Sd (Oh et al., 2013; Slattery et al., 2013). Prises ensemble, ces observations supposent que la fonction de Yki est indépendante de Sd et nécessite donc l'association de Yki avec d'autres facteurs de transcription.

Mad about Yorkie

L'hypothèse mentionnée précédemment s'est avérée juste puisqu'il a été montré par la suite que Yki est capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que Mad (Mother of Dpp), Taiman, Teashirt et Homothorax (Figure 6). Outre la spécificité tissulaire que ces interactions peuvent révéler, elles permettent aussi d'élargir le répertoire des gènes cibles de Yki. Tout comme la voie de signalisation Hippo, la voie de signalisation Decapentaplegic (Dpp, BMP chez les vertébrés) impacte sur la prolifération cellulaire au sein des disques imaginaux et notamment le disque imaginal d'aile (Akiyama and Gibson, 2015; Harmansa et al., 2015; Matsuda and Affolter, 2017; Restrepo et al., 2014). Mad est le facteur de transcription de la famille Smad qui est l'effecteur nucléaire de la voie de signalisation Dpp. Il a été montré qu'il s'associe à Yki par l'intermédiaire de son motif PPxY aux domaines WW de Yki. Cette interaction permet notamment de réguler directement l'expression de *bantam* (Oh and Irvine, 2011). Cependant, si la mutation des sites WW de Yki abolit totalement l'activation transcriptionnelle de *bantam* (suivie par l'activité d'un *enhancer* identifié grâce des tests luciférase), la mutation de l'unique motif PPxY de Mad n'entraîne qu'une réduction de son expression. Il semble donc dans ce cas que l'interaction entre Yki et Mad intervienne pour augmenter le niveau d'expression

d'un sous ensemble des cibles de Yki, ici *bantam*, et permettre une étroite coopération entre deux voies de signalisation majeures pour contrôler la croissance tissulaire.

Yorkie un partenaire volage

La croissance tissulaire est également contrôlée au niveau systémique. L'hormone ecdysone sécrétée par la glande prothoracique diffuse dans l'hémolymphe pour activer son récepteur, EcR (ecdysone Receptor), présent à la surface des cellules (Yamanaka et al., 2013a). Cela permet de coordonner ainsi la croissance des tissus avec celle de l'organisme (Andersen et al., 2013). Taiman (Tai), un coactivateur du récepteur EcR, agit donc au sein de certains tissus cibles de l'ecdysone (Bai et al., 2000; Jang et al., 2009; König et al., 2011). Il a été mis en évidence que cette protéine peut aussi s'associer à Yki, tout comme Mad, par l'intermédiaire de sites PPxY (Zhang et al., 2015). Tout comme pour Mad, l'activité de Tai est requise pour contrôler un sous-ensemble de gènes cibles « classiques » de Yki. Un gain de fonction de *Tai* permet notamment, dans le disque d'aile, d'augmenter la transcription de *DIAP1* et *ex*, mais pas de *bantam* et *Cyclin E*. A l'inverse, l'interaction Yki/Tai permet d'élargir le répertoire des cibles de Yki. Cette interaction permet par exemple de réguler des gènes tels que *piwi* et *nanos*, deux ARN régulant l'auto-renouvellement des cellules souches germinales (Cox et al., 2000; Wang and Lin, 2004).

Si les deux exemples précédents ont mis en évidence que Yki peut avoir différents partenaires qui modulent le répertoire de gènes cibles du couple « canonique » Yki/Sd dans le disque imaginal d'aile, deux autres facteurs de transcription ont été identifiés pour interagir avec Yki, cette fois dans le disque imaginal d'œil-antenne (Peng et al., 2009). En effet, dans ce tissu, Yki peut s'associer au couple Teashirt/Homotorax (Tsh/Hth). Même si dans ce cas, le mode d'interaction moléculaire n'est pas défini, ce complexe protéique participe au maintien de l'expression de *bantam*. Ici aussi, comme pour Mad, l'expression d'autres gènes cibles canoniques comme *DIAP1* et *ex* n'est pas affectée (Peng et al., 2009).

Yki est donc un effecteur central de la voie de signalisation Hippo qui peut directement intégrer des informations provenant d'autres voies de signalisation comme Dpp et donne une grande flexibilité par la diversité de ses partenaires. Si le mode de régulation de ses cibles transcriptionnelles au sein du disque imaginal d'aile est bien établi, son action dans les autres tissus, en absence de Sd, reste toutefois mal comprise. L'interaction avec le

couple Tsh/Hth ne permet effectivement pas d'expliquer la régulation de l'ensemble des gènes régulés par la voie de signalisation Hippo dans le disque imaginal d'œil-antenne.

3- Que les forces (mécaniques) soient avec Hippo :

Bien entendu une des grandes questions dans la compréhension de toute voie de signalisation est de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires qui régulent en amont son activité. La façon dont le cœur de la voie de signalisation Hippo est régulée est complexe et multiple. Je m'attacherai ici à décrire le lien étroit qu'il existe entre cette voie de signalisation et le cytosquelette d'actine. Nous verrons que si ce dernier permet de façonner ou maintenir la forme des cellules, son lien étroit avec la membrane plasmique, sa flexibilité lui permettent d'influencer la voie de signalisation Hippo.

L'arrangement et la dynamique du cytosquelette d'actine fournissent les forces nécessaires pour soutenir le mouvement et la migration des cellules, déterminer la forme cellulaire ainsi que les tensions corticales requises pour maintenir les contacts cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire. Ces fonctions reposent sur les capacités de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine grandement influencées et régulées par les protéines de liaison (ABPs, *Actin Binding Protein*) à l'actine filamenteuse (F-actine). Les ABPs régulent la polymérisation et la dépolymérisation de la F-actine (Insall and Machesky, 2009). Plusieurs études supportent que la voie de signalisation Hippo puisse agir comme un senseur de l'état du cytosquelette d'actine.

En effet, la polymérisation et l'accumulation de la F-actine dans les disques imaginaux d'ailes induisent une surprolifération via l'activation de Yki et de ses gènes cibles comme *ex* et *DIAP1* (Fernandez et al., 2011; Fernández et al., 2014; Jezowska et al., 2011; Sansores-Garcia et al., 2011). La perte de fonction des protéines Capping Alpha et Beta, qui inhibent en temps normal la polymérisation de l'actine, entraîne une croissance du tissu dépendante de l'import de Yki dans le noyau (Fernandez et al., 2011). De plus, un crible recherchant des régulateurs de la voie de signalisation Hippo et réalisé en culture cellulaire (cellules S2), suggère que 2 autres ABPs, Diaphanous et Cofilin, sont aussi importantes dans le contrôle de l'activité de Yki (Sansores-Garcia et al., 2011). Diaphanous est une protéine de la famille des formines qui favorise la polymérisation de l'actine (Mulinari et al., 2008; Somogyi and Rørth, 2004). La Cofilin à l'inverse est un facteur qui induit la dépolymérisation de l'actine (Gunsalus et al., 1995).

Les jonctions adhérentes jouent un rôle primordial dans l'association mécanique des cellules épithéliales. Elles établissent un lien entre la membrane plasmique des cellules et leur cytosquelette d'actine. Merlin (Mer) et Expanded (Ex), de la famille des protéines à domaine FERM, sont des constituants des jonctions adhérentes. Ces 2 protéines sont aussi les 2 premiers éléments identifiés pour agir sur le complexe Hippo (Hamaratoglu et al., 2006). Mer et Ex forment un complexe avec Kibra, une protéine chaperonne possédant un domaine WW, et se localisent dans la partie apicale des cellules épithéliales. Mer et Kibra participent au recrutement de Wts à l'apex cellulaire où il peut être phosphorylé par Hpo, conduisant à l'inhibition de Yki (Genevet et al., 2010; Yu et al., 2010) (Figure 6). En culture de cellules S2, un traitement à la Latrunculine B, inhibiteur de la polymérisation de l'actine, favorise l'interaction entre Mer et Wts et donc la répression de Yki (Genevet et al., 2010; Yin et al., 2013). Ex peut également s'associer avec la protéine transmembranaire Crumbs qui peut faciliter son activité en soutenant sa localisation apicale (Grzeschik et al., 2010; Ling et al., 2010; Robinson et al., 2010) ou inhiber l'activité de Ex en induisant sa dégradation (Chen et al., 2010; Ribeiro et al., 2014). Les trois domaines PPxY d'Ex lui permettent de séquestrer Yki dans le cytoplasme et cela indépendamment du complexe Hippo (Badouel et al., 2009; Oh et al., 2009). Ex peut aussi réguler l'activité de la voie de signalisation Hippo via deux autres régulateurs de la croissance Fat et Dachsous (Figure 6). Le couple Fat (Ft)/Dachsous (Ds) est composé de deux proto-cadhérines particulières qui forment des hétérodimères entre la membrane de deux cellules voisines grâce à l'action de la kinase four-jointed (Ft) (Cho and Irvine, 2004; Matakatsu and Blair, 2004). Ft/Ds participe à l'activation de Ex et Wts et donc indirectement à l'inactivation de Yki et de ses gènes cibles (Bennett and Harvey, 2006; Cho et al., 2006; Feng and Irvine, 2007; Silva et al., 2006; Tyler and Baker, 2007; Willecke et al., 2006). La régulation de la voie de signalisation Hippo par Ft/Ds est médiée par l'inhibition de la zyxine, protéine de la famille LIM, qui antagonise Ex et interagit avec Wts, et qui conduit à l'activation de Yki et de ses gènes cibles (Gaspar et al., 2015; Rauskolb et al., 2011). La zyxine est impliquée dans la mécanotransduction et le contrôle de la dynamique du cytosquelette d'actine (Harvey, 2015).

Si le cytosquelette d'actine influence la voie de signalisation Hippo (Figure 6), cette dernière est aussi capable de modifier l'assemblage de la F-actine. En effet, la perte de fonction *d'ex*, *hpo* ou *wts* conduit à une forte accumulation de la F-actine à l'apex des cellules (Fernandez et al., 2011; Fernández et al., 2014; Jezowska et al., 2011).

Pour résumer, la voie de signalisation Hippo est capable de sentir l'état du cytosquelette d'actine pour moduler son activité proliférative afin d'éviter une surcroissance des tissus. Une fois de plus la régulation de l'activité de Yki est au centre de ce processus.

4- Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le renouvellement intestinal :

Comme nous venons de le voir, la voie de signalisation Hippo joue un rôle crucial dans la balance prolifération-apoptose et de ce fait dans le contrôle de la croissance tissulaire. Cependant, elle a aussi été impliquée dans d'autres processus développementaux tels que la croissance axonale (Sakuma et al., 2016), le déterminisme des photorécepteurs (Jukam et al., 2013), la mise en place des axes du corps (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007), et plus récemment dans le contrôle de l'homéostasie de l'intestin où elle agit de manière cellulaire autonome et cellulaire non autonome sur la prolifération des cellules souches intestinales (CSI).

Comme on pouvait le supposer, la dérégulation de la voie de signalisation Hippo dans les CSI engendre une augmentation de leur prolifération (Huang et al., 2014; Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010b; Shaw et al., 2010). La surexpression de *yki* ou la perte de fonction de *wts* conduit à une surprolifération des CSI (Figure 7) en suivant un schéma classique, c'est-à-dire en augmentant la transcription de *DIAP1* et *cyclin E* (Shaw et al., 2010). Yki est aussi nécessaire dans les CSI pour leur prolifération en réponse à un stress pharmacologique (DSS) ou immun (infection par *P. entomophila*) (Ren et al., 2010b). Ces stress engendrent une surexpression des gènes *DIAP1*, *cycE*, *bantam*, *myc* et *ex*, qui est inhibée en absence de *yki* (Huang et al., 2014; Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2013). L'activité de Yki est également régulée par son association avec la protéine Brahma, facteur essentiel du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. La formation d'un complexe Sd/Yki/Brahma promeut l'activation des gènes cibles de Yki et donc la prolifération des CSI. De façon intéressante, cette étude a mis en évidence un système de rétrocontrôle de la voie de signalisation Hippo. En effet, l'activation de la signalisation Hippo a pour conséquence l'activation des caspases, favorisant ainsi la mort cellulaire programmée. Ces caspases vont inhiber l'action du complexe Sd/Yki/Brahma en inactivant la protéine Brahma grâce à un clivage protéolytique (Jin et al., 2013). L'activité de Yki est également régulée par l'action de la protéine Pez (une protéine à domaine FERM) qui interagit avec Kibra, pour activer la voie de signalisation Hippo dans les CSI et limiter leur prolifération (Poernbacher et al., 2012). De plus, afin de restreindre l'activité de Yki et

donc la prolifération des CSI, il semblerait que la signalisation Hippo soit activée dans ces cellules par l'interaction entre *ds* exprimé dans les EC et les EE et *fat* exprimé dans les CSI (Karpowicz et al., 2010).

L'activité de la voie de signalisation Hippo est donc finement régulée au sein même des CSI afin d'ajuster la prolifération des CSI en fonction du contexte environnemental. Elle peut également influencer la prolifération cellulaire de façon non cellulaire autonome. Il a été montré que suite à un traitement à la bléomycine, stressant spécifiquement les EC (Amcheslavsky et al., 2009), Yki est activé dans les EC pour augmenter l'expression du ligand de la voie de signalisation JAK/STAT, *unpaired (upd)*. La sécrétion de Upd conduit à l'activation de la signalisation JAK/STAT dans les CSI pour promouvoir leur prolifération (Staley and Irvine, 2010). Les mêmes observations ont été faites lors d'une infection bactérienne par *P. entomophila*, connue pour endommager spécifiquement les EC (Shaw et al., 2010; Vodovar et al., 2005). En plus de réguler l'expression de *upd* dans les EC, Yki induit aussi l'expression du ligand EGF dans ces cellules activant la voie EGF dans les CSI pour activer leur prolifération (Ren et al., 2010b). La voie de signalisation Hippo en général et Yki en particulier jouent donc le rôle de senseurs au sein des EC leur permettant de signaler aux CSI qu'ils sont endommagés. En réponse, ces dernières activent le renouvellement cellulaire afin de remplacer les cellules endommagées.

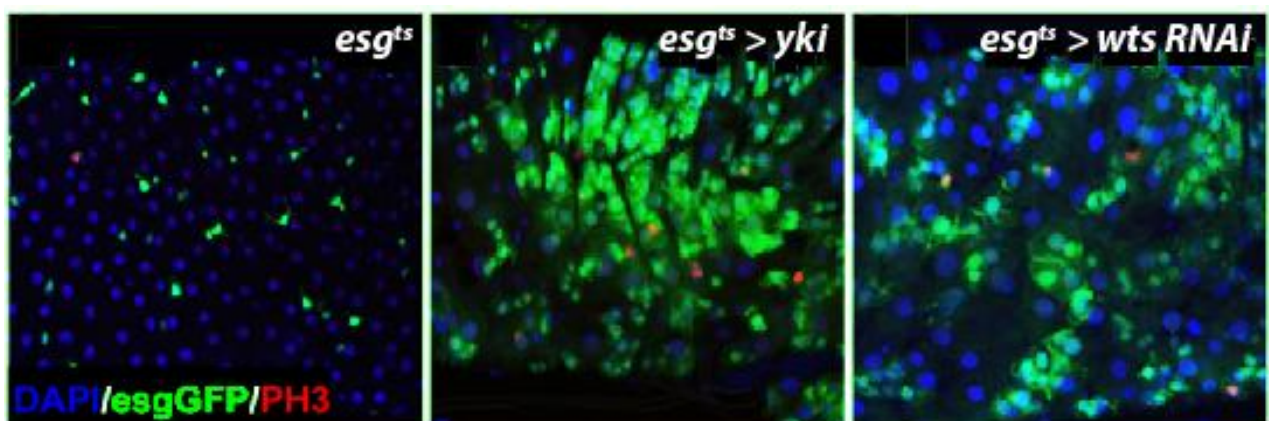


Figure 7 : Yki régule la prolifération des cellules souches intestinales :

Observation des cellules souches intestinales (*esgGFP*) et index mitotique (*PH3*) dans l'intestin moyen de *Drosophila* sauvage (*esg^{ts}*), surexprimant *yki* (*esg^{ts} > yki*) ou un ARN interférant contre l'ARN de *wts* (*esg^{ts} > wts RNAi*). Le noyau des cellules est visualisé en bleu (*DAPI*). (Shaw et al., 2010)

5- La voie de signalisation Hippo est conservée chez les mammifères :

La fonction de la voie de signalisation Hippo ainsi que les mécanismes moléculaires qui régissent son activité sont très bien conservés entre la *Drosophile* et les mammifères, même si des divergences existent (Figure 6) (Fallahi et al., 2016; Pan, 2010). Je présenterai donc brièvement les acteurs homologues identifiés sans rentrer dans les détails moléculaires de la voie de signalisation. Ensuite, je montrerai que les mécanismes de régulation sont comparables et dépendants de la dynamique du cytosquelette d'actine. Enfin, j'aborderai la fonction de la signalisation Hippo dans la régulation des CSI et les points qui à mon sens restent à éclaircir.

Chez les mammifères le complexe Hippo est composé de MST1/2 (orthologue de Hpo) et SAV1 (orthologue de Sav) qui interagissent pour phosphoryler et activer un deuxième complexe formé par MOB1 (orthologue de Mats) et LATS1/2 (orthologue de Wts) (Callus et al., 2006; Chan et al., 2005; Harvey and Tapon, 2007; Pan, 2007; Praskova et al., 2008; Saucedo and Edgar, 2007). L'activation de cette cascade de kinase conduit à l'inactivation et à la dégradation de YAP (Yes Associated Protein), orthologue de Yki, et de son paralogue TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) dans le cytoplasme via 14.3.3 (Kanai et al., 2000; Lei et al., 2008; Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010). Les acteurs ainsi que les mécanismes moléculaires du complexe Hippo sont donc très similaires chez les mammifères (Figure 6). De plus, les homologues humains de Hippo (MST2), Mats (MOB1), Wts (LATS1) et Yki (YAP) sont capables de sauver le phénotype de leur perte de fonction respective chez la *Drosophile* (Edgar, 2006).

Tout comme chez la *Drosophile*, YAP interagit avec les membres de la famille TEAD, orthologues de Sd et au nombre de 4 chez les mammifères (Zhao et al., 2008). Les protéines TEAD s'associent avec YAP/TAZ de façon similaire à Yki/Sd, (Vassilev, 2001; Zhao et al., 2008). Des données de ChIP démontrent que YAP et les facteur TEAD peuvent se fixer à des régions promotrices chevauchantes (70-80%) sur le génome (Zanconato et al., 2015; Zhao et al., 2008). Une analyse par « Gene Ontology » révèle que les gènes cibles de YAP et TEAD sont majoritairement impliqués dans la régulation de la prolifération. De façon analogue à Yki chez la *Drosophile*, YAP/TAZ s'associent donc avec les protéines TEAD afin d'enclencher un programme génétique qui promeut la prolifération.

Chez les mammifères, YAP et TAZ possèdent aussi plusieurs partenaires via l'interaction des domaines WW avec les motifs PPXY de YAP/TAZ. Par exemple YAP s'associe avec Smad

(facteur de transcription de la voie BMP), RUNX (impliqué dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques) et p73 (facteur de transcription pro-apoptotique) tandis que TAZ interagit avec RUNX et Pax3 par exemple (Zhao et al., 2011) (Figure 6). Il semblerait aussi que YAP et la β -catenin puissent aussi s'associer pour activer l'expression de gènes cibles de la voie Wnt (homologue de Wg) (Heallen et al., 2011). En fonction de leurs partenaires, YAP et TAZ peuvent être strictement nécessaires ou renforcer l'activation des gènes cibles canoniques de leurs cofacteurs. YAP permet aussi par exemple de réguler spécifiquement un sous-groupe des gènes cibles de p73 (Strano et al., 2005). Le mode d'interaction entre YAP/TAZ et ses partenaires, ainsi que l'impact de ces complexes sur la régulation des gènes cibles de la voie de signalisation Hippo, révèlent les similarités fonctionnelles entre la Drosophile et les mammifères.

6- Régulation de la voie de signalisation Hippo par l'architecture du cytosquelette d'actine chez les mammifères :

De façon analogue à la Drosophile, l'activité de la voie de signalisation Hippo est contrôlée par la dynamique du cytosquelette d'actine afin de réguler la prolifération des cellules des mammifères en fonction de leur environnement. La forme des cellules, la densité cellulaire, la rigidité de la matrice extracellulaire qui modulent les forces appliquées au cytosquelette d'actine impactent sur la localisation de YAP et TAZ (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2007). L'augmentation des forces mécaniques appliquées aux cellules favorise la phosphorylation et donc la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme tandis que leur réduction accentue la translocation de YAP/TAZ dans le noyau (Wada et al., 2011). De plus, en étirant des cellules à confluence, dont la prolifération est diminuée par inhibition de contact, les cellules réactivent le cycle cellulaire dépendamment de YAP (Benham-Pyle et al., 2015).

NF2 (Neurofibromatosis 2), homologue de Merlin chez les mammifères, est un suppresseur de tumeur qui interagit avec Kibra. NF2 est impliqué dans l'inhibition de contact des cellules à confluence et sa fonction de suppresseur de tumeur est dépendante de YAP (Chiasson-MacKenzie et al., 2015; Zhang et al., 2010) (Figure 6). Ces observations suggèrent fortement que les mécanismes liant le cytosquelette d'actine, le complexe Merlin-Kibra-Expanded et la voie de signalisation Hippo décrit chez la Drosophile (voir paragraphe) sont aussi à l'œuvre chez les mammifères. Cependant à ce jour aucune étude ne s'est consacrée à démontrer cette hypothèse.

Chez les mammifères, les forces appliquées à la cellule impactent aussi sur l'activité de la voie de signalisation Hippo permettant d'ajuster la prolifération des cellules en fonction de la densité et de la forme des cellules. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus sont similaires à ceux décrits chez la Drosophile, cependant le rôle des orthologues de certains acteurs clefs comme Expanded, Kibra ou les protocadhérines Fat/Dachsous reste à déterminer.

III- Les tubules de Malpighi : un modèle émergeant dans l'étude des cellules souches somatiques

Chez la Drosophile, le système rénal assure des fonctions analogues aux reins des mammifères et est aussi renouvelé par des cellules souches. Bien que les **cellules souches rénales (CSR)** participent au maintien de l'homéostasie, elles sont cependant moins actives (quiescentes) que les CSI arguant que le système rénal se renouvelle peu en situation normale. Cependant l'organisation et les mécanismes impliqués dans la mise en place des CSR pourraient se révéler être un modèle de choix pour l'étude de processus qui n'ont pas lieu dans le système intestinal ainsi que pour l'identification de mécanismes possiblement conservés dans le maintien de l'homéostasie du système rénal chez les mammifères. Dans ce chapitre, je présenterai brièvement la fonction et l'organisation du système rénal chez les mammifères et la Drosophile ainsi que les similarités et différences entre ces deux modèles. Après avoir détaillé l'état des connaissances sur la fonction physiologique des cellules différenciés, je reprendrai les évidences de l'existence des CSR ainsi que les mécanismes impliqués dans le contrôle de leur activité chez la Drosophile.

1- Les cellules souches rénales chez les mammifères : un mythe ?

Chez les mammifère, le rein est un exemple illustrant parfaitement la difficulté d'identifier précisément des cellules souches somatiques. Ce dernier est un organe complexe (Figure 8A, B et C) qui assure plusieurs fonctions physiologiques (Scott and Quaggin, 2015):

- La régulation de la quantité d'eau, de sels minéraux et de la balance acido-basique dans l'organisme
- L'excrétion des déchets métaboliques par la filtration de la circulation sanguine
- La sécrétion d'hormones endocrines.

De par l'observation d'une très faible prolifération par incorporation de ^3H -Thymidine (Messier and Leblond, 1960), le rein, par rapport à d'autres organes comme l'intestin cité précédemment, n'a reçu que très peu d'attention quant à l'étude du maintien de son homéostasie. Cependant, l'étude des propriétés régénératrices du rein chez les mammifères, de grand intérêt en médecine régénératrice, a été relancée par l'observation d'une augmentation de la prolifération suite à un stress ischémique (Abbate et al., 1999). Ces observations suggèrent l'existence de cellules endogènes possédant un potentiel de régénération. Bien qu'il possède des capacités de régénération évidente suite à des dommages dans le glomérule, lieu de filtration du sang (Figure 8C), et les tubules rénaux (Nadasdy et al., 1994; Voetseder et al., 2005, 2006, 2008), qui réabsorbent l'eau et ajustent la concentration en électrolytes et acides aminés de l'urine, la nature des cellules qui participent au renouvellement des tubules rénaux fait débat. En effet, une population limitée de cellules des tubules exprime CD133, CD24, marqueurs connus des cellules souches somatiques. Ces cellules ont la capacité de proliférer et se différencier en cellules rénales tubulaires *in vitro* et *in vivo* lorsqu'elle sont greffées dans des souris dont le rein a été endommagé par une injection de glycérol ou suite à l'induction de voies de signalisation de réponse aux dommages comme toll-Like Receptor 2 (Bussolati et al., 2005; Sallustio et al., 2010). D'autre stratégie (expression d'une aldéhyde déhydrogenase spécifique des cellules souches somatiques (Lindgren et al., 2011), identification des gènes dont l'expression est accrue lors de dommages aux tubules (Langworthy et al., 2009) ont également permis d'isoler un sous-groupe de cellules tubulaires qui expriment les marqueurs CD133 et CD24 et possèdent des propriétés de cellules souches somatiques (Figure 8D). Néanmoins d'autres études démontrent que les cellules capables de renouveler les tubules rénaux présentent des caractéristiques de cellules tubulaires différenciées (Lin et al., 2005; Voetseder et al., 2006, 2008) et il a été suggéré que les cellules différenciées du tubules rénales ont la capacité de se dédifférencier afin de

proliférer et d'assurer la régénération des tissus endommagés (Kramann et al., 2015) (Figure 8D).

En conclusion, si les capacités de régénération du rein sont bien identifiées, la nature des cellules qui régénèrent les tubules rénaux est donc encore incertaine. La compréhension des mécanismes qui soutiennent la régénération/le renouvellement du rein nécessitera encore de nombreuses investigations. D'où la nécessité d'étudier les mécanismes de renouvellement du système rénal chez des organismes modèle simple comme la *Drosophile*.

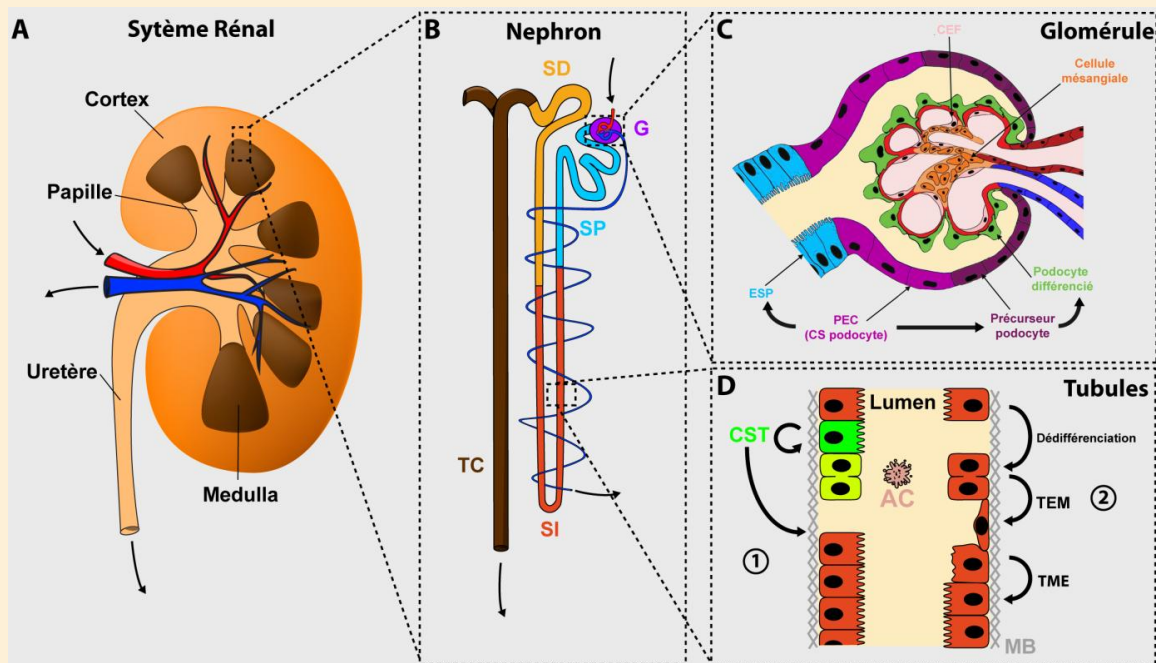


Figure 8 : Deux hypothèses différentes pour la régénération des tubules rénaux :

(A) Schéma de l'anatomie du système rénal des mammifères. Le rein est divisé en plusieurs parties anatomiques tel le cortex ainsi que plusieurs médullas où l'urine est produite puis collectée dans les papilles qui se rejoignent pour former l'uretère.

(B) Représentation schématique de l'organisation du néphron. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Il est formé du glomérule (G) qui est la structure responsable de la filtration des capillaires sanguins. Le filtrat transite ensuite via un tubule rénal divisé en plusieurs segments, le segment proximal (SP), intermédiaire (SI) et distal (SD). Les différentes régions des tubules rénaux, à l'instar des tubules de Malpighi chez la *Drosophile* (voir introduction III-1), sécrètent et réabsorbent les acides aminés, électrolytes (segment proximal) et permettent aussi d'ajuster la concentration en sel dans l'urine (segment distal). L'urine produite par plusieurs néphrons converge vers un tube collecteur (TC).

(C) Représentation schématique de l'organisation du glomérule. Le glomérule est composé de plusieurs type de cellules. A l'extrémité des capillaires sanguins les cellules endothéliales fenestrées (CEF) et les cellules mésangiales sont en contact avec les podocytes qui filtrent le sang. La paroi imperméable du glomérule est composée des cellules endothéliales pariétales (PEC) (Vaughan and Quaggin, 2008) qui ont la capacité de proliférer suite à des dommages pour se différencier en cellules épithéliales tubulaires (ESP) ou migrer progressivement vers les capillaires sanguins pour se différencier en podocytes (Appel et al., 2009; Lazzeri et al., 2007; Ronconi et al., 2009; Sagrinati et al., 2006).

(D) Représentation schématique des deux hypothèses du renouvellement des tubules rénaux :

(1) Un nombre restreint de cellules épithéliales des tubules rénaux constitue le réservoir de cellules souches tubulaires (CST) et a la capacité de proliférer et de renouveler les cellules endommagées après un stress.

(2) les cellules épithéliales différenciées du tubule rénal peuvent se dédifférencier et proliférer suite à une blessure du tubule rénal. Elles vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour migrer via la membrane basale (MB) et coloniser la zone endommagée. Elles peuvent ensuite remplacer les cellules épithéliales apoptotiques (AC) en se redifférenciant via une transition mesenchymo-épithéliale (TME) (Campbell and Wingert, 2012; Kramann et al., 2015) (Adapté de Campbell and Wingert, 2012)

2- Le découplage de la fonction rénale : néphrocytes et tubules de Malpighi :

Chez la Drosophile, contrairement aux mammifères, la fonction rénale qui comprend la filtration de l'hémolymphe et l'excrétion de ce filtrat via la production d'urine, est assurée dans deux parties distinctes. Les néphrocytes en chapelet et péricardiaux sont situés respectivement autour du pharynx, proche du proventricule, et le long de chaque côté du tube cardiaque. Ils assurent la filtration et l'absorption des substances toxiques exogènes et endogènes (métabolites) de l'hémolymphe (Hermle et al., 2016). Les néphrocytes chez la Drosophile assurent des fonctions analogues aux podocytes du glomérule rénal des mammifères et servent de modèle pour étudier les pathologies qui affectent le rein (Helmstädter and Simons, 2017).

La **fonction excrétrice** est assurée par deux paires de tubules, nommés **tubules de Malpighi (TM)**. Une paire se projette vers la partie antérieure et la seconde vers l'extrémité postérieure. Ils sont composés d'un épithélium monocouche et sont connectés au système intestinal à la jonction entre l'intestin moyen et postérieur. La fonction rénale est donc découplée : les néphrocytes filtrent l'hémolymphe des substances toxiques et les TM permettent d'ajuster la quantité d'eau et la concentration en électrolytes présents dans l'organisme. Mes travaux de thèse portent sur l'étude de l'homéostasie des TM, je vais donc focaliser ma description sur cet organe.

3- Le développement des tubules de Malpighi

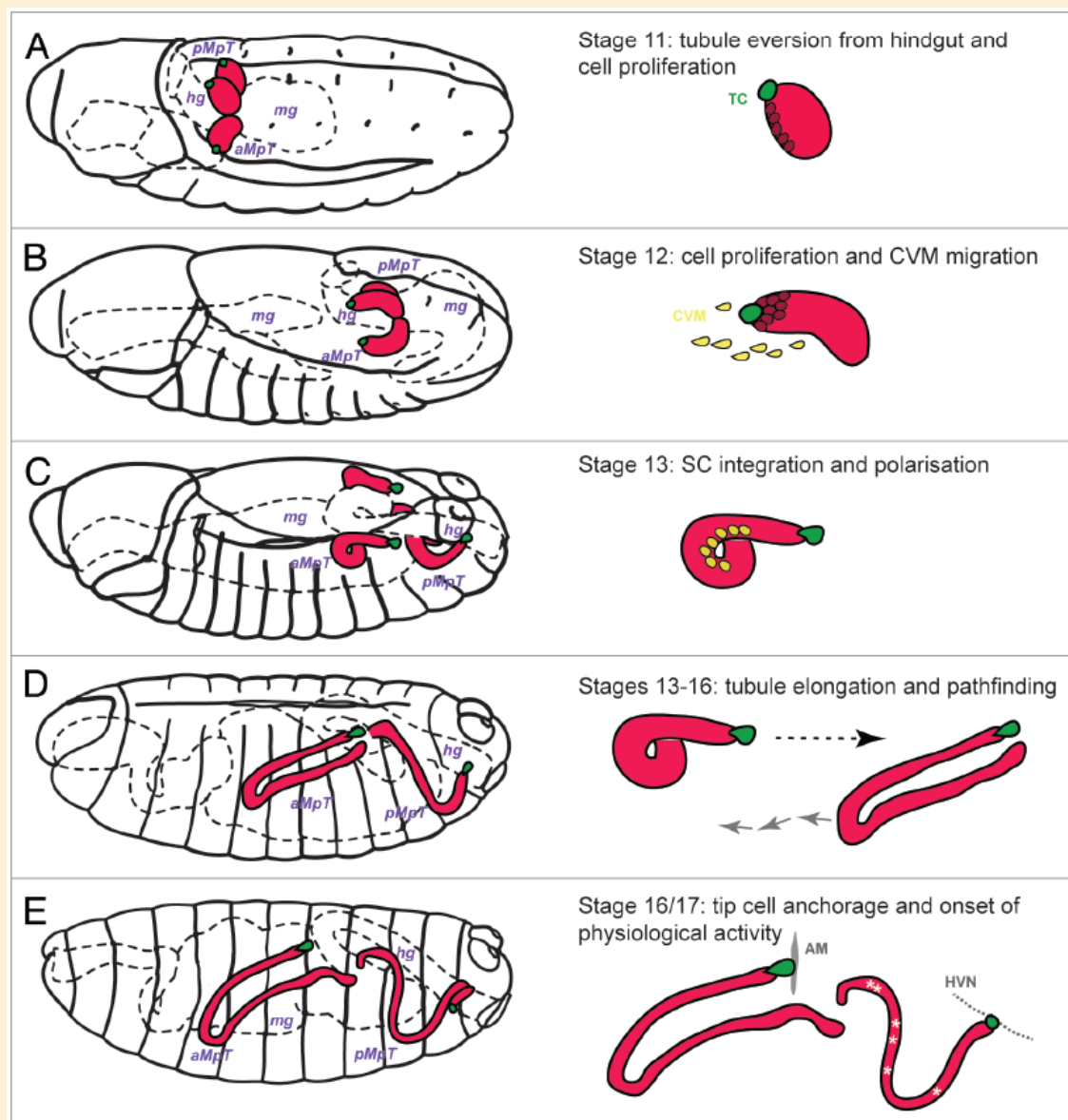


Figure 9 : Développement embryonnaire des tubules de Malpighi (voir pour revue Ainsworth et al., 2000; Denholm, 2013; Jung et al., 2005):

(A) L'intestin moyen va définir un groupe de cellules de l'intestin postérieur d'origine ectodermique qui vont former quatre bourgeons cylindriques suite à leur évagination.

(B) Deux de ces bourgeons vont croître vers la partie antérieure et les deux autres vers la partie postérieure, suite à des divisions cellulaires. La prolifération des cellules des bourgeons est contrôlée par la « tip cell » (vert) A la fin de cette phase de prolifération les cellules des tubes arrêtent de se diviser et leur nombre reste fixe. Dans le même temps, un groupe de cellules d'origine mésodermique (mésoderme viscéral caudal) va migrer vers les tubes en prolifération.

(C) Les cellules d'origine mésodermique vont subir une étape de transition mésenchyme-épithélium et venir s'intercaler en partie distale entre les cellules préexistantes (d'origine ectodermique) des tubes. Elles acquièrent ensuite leur polarité apico-basale, la partie basale étant en contact avec l'hémolymphe tandis que la partie apicale délimite le lumen.

(D) Une fois que le nombre final de cellules est atteint celles-ci subissent une phase de convergence-extension permettant l'allongement directionnel des tubes dirigé par la « tip-cell »

(E) La « tip cell » permet aux tubules de s'allonger et de s'ancrer aux muscles alaires en partie antérieure et autour de l'intestin postérieur.

D'après Denholm, 2013

Ensuite, durant les stades larvaires les TM vont continuer de croître seulement par endoréplication des cellules préexistantes.

4- La répartition fonctionnelle des tubules de Malpighi :

Les TM sont divisés en deux grandes régions : les **tubules inférieurs**, juxtaposés à l'intestin constituent la région la plus proximale, et les **tubules supérieurs** (Figure 10A). Les tubules inférieurs sont divisés en deux régions, la plus proximale étant appelée l'uretère. Les tubules supérieurs peuvent se décomposer en trois parties distinctes : le segment principal, de transition et initial (Figure 10A). Cette structuration est soutenue par des arguments morphologiques et par l'expression différentielle de marqueurs moléculaires (Sozen et al., 1997). Les tubules sont complètement immergés dans le système circulatoire de la Drosophile et assurent le maintien de la balance en eau, ions et acide/base ainsi que l'excrétion des déchets métaboliques présent dans l'hémolymphe. Les TM ont aussi la capacité de participer à la réponse immunitaire suite à l'infection de pathogènes. Ils peuvent notamment produire de peptides antimicrobiens (McGettigan et al., 2005; Tapadia and Verma, 2012). Suite au passage de l'hémolymphe à travers la région distale des tubules, l'urine primaire est ensuite expulsée dans le tractus intestinal grâce à la contraction de muscles squelettiques entourant les tubules. La structuration des muscles est plus dense au niveau des tubules inférieurs (uretère notamment).

Bien que structurés en cinq régions distinctes, il est généralement admis que les TM sont composés uniquement de deux types de cellules différenciées toutes deux polypléides, les **cellules principales** d'origine ectodermique (CP) et les **cellules étoilées** (CE) d'origine mésodermique assurent les fonctions d'osmorégulation et de sécrétions (Denholm et al., 2003). Les CP expriment *cut* (*ct*) qui code pour un facteur de transcription à homéoboite et sont localisées dans la totalité des TM. Les CE expriment le facteur de transcription Teashirt (Tsh) et sont retrouvées uniquement dans les tubules supérieurs (segment principal, de transition et initial). La fonction des CP est d'alimenter un gradient de protons pour faciliter le transport des cations Na^+ et K^+ (Figure 10C). Ce mécanisme est réalisé par l'intermédiaire d'une pompe ATPase (V-ATPase) qui crée un potentiel électrochimique via le transport des ions H^+ (Davies et al., 1996; Du et al., 2006). La création de ce potentiel permet le transfert des ions Na^+ et K^+ au lumen en collaboration avec les transporteurs NHA1/2 de la famille des CPA (*Cation Proton Antiporter*) (Day et al., 2008). Les CE permettent le passage de l'eau de l'hémolymphe au lumen via son transport par des aquaporines ainsi que le passage des ions Cl^- (O'Donnell et al., 1996, 1998) (Figure 10C). Cette vision simple des types cellulaires des TM est remise en cause par l'expression différentielle de plusieurs gènes comme par exemple celui qui code la phosphatase alcaline 4 (*aph-4*), exprimé spécifiquement dans les cellules Cut⁺ au sein des

tubules inférieurs. Cela suggère l'existence d'au moins un sous-groupe cellulaire au sein des CP assurant possiblement des fonctions distinctes (Cabrero et al., 2004; Rosay et al., 1997; Sozen et al., 1997; Yang et al., 2000). En effet, il a été montré que la région des tubules inférieurs, (dépourvue de CE), est capable de réabsorber l'eau ainsi que les ions K^+ et Cl^- tout en sécrétant du Ca^{2+} (O'Donnell and Maddrell, 1995; Rheault and O'Donnell, 2004) (Figure 10C), des propriétés bien distinctes de la fonction des CP. Il est donc probable que les cellules $Aph-4^+$ assurent la fonction réabsorbante des tubules inférieurs, définissant ainsi un troisième type cellulaire : **les cellules réabsorbantes**. De plus, si l'on considère que les cellules dont le profil génétique est différent, assurent des fonctions distinctes nous pouvons ainsi envisager au moins 10 types de cellules dans les TM adultes (Denholm, 2013).

Pour conclure, bien qu'une plus grande variété de cellules soit envisageable, nous admettrons ici que les TM sont composés de 3 types de cellules : les cellules réabsorbantes (Cut^+ et $Aph4^+$) situées dans les tubules inférieurs, les cellules principales (Cut^+) et les cellules étoilées (Tsh^+) situées dans les tubules supérieurs (Figure 10B) (voie pour revue Beyenbach et al., 2010).

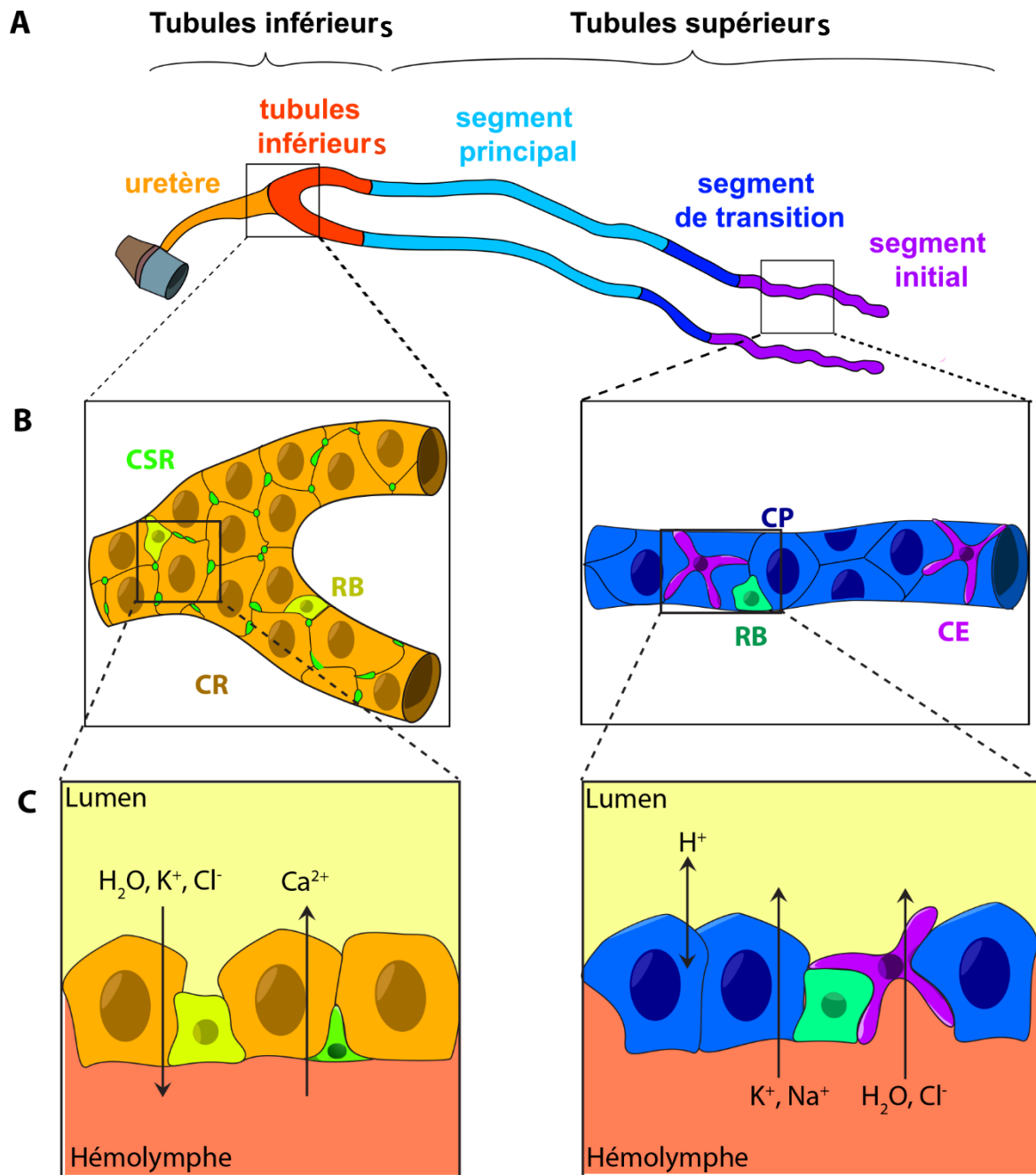


Figure 10 : Les tubules de Malpighi sont divisés en 2 grandes régions composées de types cellulaires distincts et assurant des fonctions différentes :

(A) Les tubules de Malpighi sont divisés en 2 régions : les tubules inférieurs (comprenant l'uretère) et les tubules supérieurs (segment principal, segment de transition et segment initial).

(B) Les cellules qui composent les tubules inférieurs sont les cellules réabsorbantes (CR), les rénalblastes (RB) et les cellules souches rénales (CSR) tandis qu'on retrouve les cellules étoilées (CE) et les cellules principales (CP) dans les tubules supérieurs.

(C) Dans les tubules inférieurs les CR assurent la réabsorption de l'eau et des ions K^+ et Cl^- dans l'hémolymphe tandis qu'elles sécrètent dans le lumen les ions Ca^{2+} . Dans les tubules supérieurs les CP assurent le passage dans le lumen des ions K^+ et Na^+ grâce à un gradient de protons (H^+) tandis que les CE assurent le passage de l'eau et des ions Cl^- .

5- Les cellules souches rénales : ce n'est pas la taille qui compte :

Un quatrième type de cellules diploïdes, appelées initialement « tiny cells » et situées dans la partie proximale des TM (tubules inférieurs), a été identifié (Sozen et al., 1997). Contrairement aux autres types cellulaires évoqués plus haut et qui sont présents dans les TM dès la fin de l'embryogenèse, les « tiny cells » sont uniquement observables chez l'adulte. En effet, si les TM sont les seuls organes qui ne dégèrent pas pendant la métamorphose et qui perdurent chez la *Drosophile* adulte (Riddiford, 1993), les AMP intestinaux qui assurent la reformation de l'intestin durant la pupaison vont participer à générer une partie de l'uretère adulte afin d'assurer la jonction entre les deux organes (Takashima et al., 2013). En suivant le devenir des AMP grâce à des expériences de lignage (G-TRACE), il a été mis en évidence que 16h après la formation de la pupa une partie de ces AMP migre depuis l'intestin moyen pour coloniser l'uretère des TM (Takashima et al., 2013). Ces AMP qui se maintiennent dans la partie proximale des TM durant toute la vie de la *Drosophile* adulte (Takashima et al., 2013) ne sont rien d'autre que les « tiny cells » et sont localisées en partie basale (proche de l'hémolymphe) (Singh et al., 2007). Si la fonction de ces cellules est restée longtemps inconnue, il a été mis en évidence qu'elles sont en réalité des **cellules souches rénales** (CSR) capables d'assurer le renouvellement des CP et CE (Singh et al., 2007) (Figure 11). En effet, les travaux de Singh et al. ont permis d'analyser la prolifération (incorporation BrdU, immunomarquage phospho-Histone H3) et le devenir des CSR (clones mitotiques exprimant constitutivement la GFP, MARCM) (Kirilly et al., 2005; Singh et al., 2007). Ces études montrent que les CSR se divisent très rarement suggérant qu'elles sont quiescentes mais peuvent, suite à une division asymétrique, donner naissance à une CSR et un progéniteur, appelé rénalblaste (RB), qui pourra se différencier en cellules matures (cellules réabsorbantes) dans les tubules inférieurs ou migrer vers les tubules supérieurs pour se différencier en CP et CE (Singh et al., 2007) (Figure 11). Les CSR partagent donc une origine commune avec les CSI et assurent des fonctions analogues dans des tissus différents. Contrairement aux CSI, elles sont moins nombreuses (environ 350 cellules contre 1000 pour les CSI) et clairement individualisées (voir partie résultats). A l'instar des CSI, les CSR expriment *escargot* (*esg*) mais aussi *krüppel* (*kr*) qui est absent des CSI et impliqué dans la formation des TM durant l'embryogenèse (Denholm et al., 2003; Singh et al., 2007). Ceci soutient l'hypothèse selon laquelle les AMP qui migrent dans les TM sont reprogrammés pour acquérir une identité et une fonction différente des CSI.

De façon surprenante, les CSR expriment aussi un marqueur spécifique de cellules neuronales. En effet, elles sont reconnues par un anticorps dirigé contre la peroxydase de raifort, qui marque spécifiquement les neurones périphériques et centraux (Jan and Jan, 1982; Siddiqui and Culotti, 1984; Sozen et al., 1997). Les CSR pourraient donc potentiellement, en plus de renouveler les cellules rénales différenciées, assurer des fonctions neuroendocrines en sécrétant des neurohormones dans l'hémolymphe pour réguler la physiologie des TM (contractilité des muscles, transport ionique, ...) même si aucune étude ne vient soutenir cette hypothèse à ce jour.

Pour résumer, les « tiny cells » sont des CSR multipotentes capables, par division asymétrique, de s'autorenouveler et de se différencier pour remplacer les cellules rénales différenciées (CR, CP et CE).

6- Les facteurs régulateurs des cellules souches rénales

Bien que les CSR et CSI aient été identifiées toutes deux il y a une dizaine d'années, les CSR n'ont reçu que très peu d'attention et l'étude des mécanismes permettant de réguler leur activité est très peu documentée. Cependant certaines fonctions autocrines et non cellulaires autonomes, similaires à celle des CSI, ont pu être mises en lumière.

Les CSR ont la capacité de promouvoir leur propre prolifération. En effet, elles expriment les gènes codant le ligand *upd* ainsi que son récepteur *dome*, membres de la voie de signalisation JAK/STAT. L'activation de cette voie induit une surprolifération des CSR tandis que son inactivation abolit leur potentiel prolifératif et semble pousser les CSR à se différencier (Singh et al., 2007).

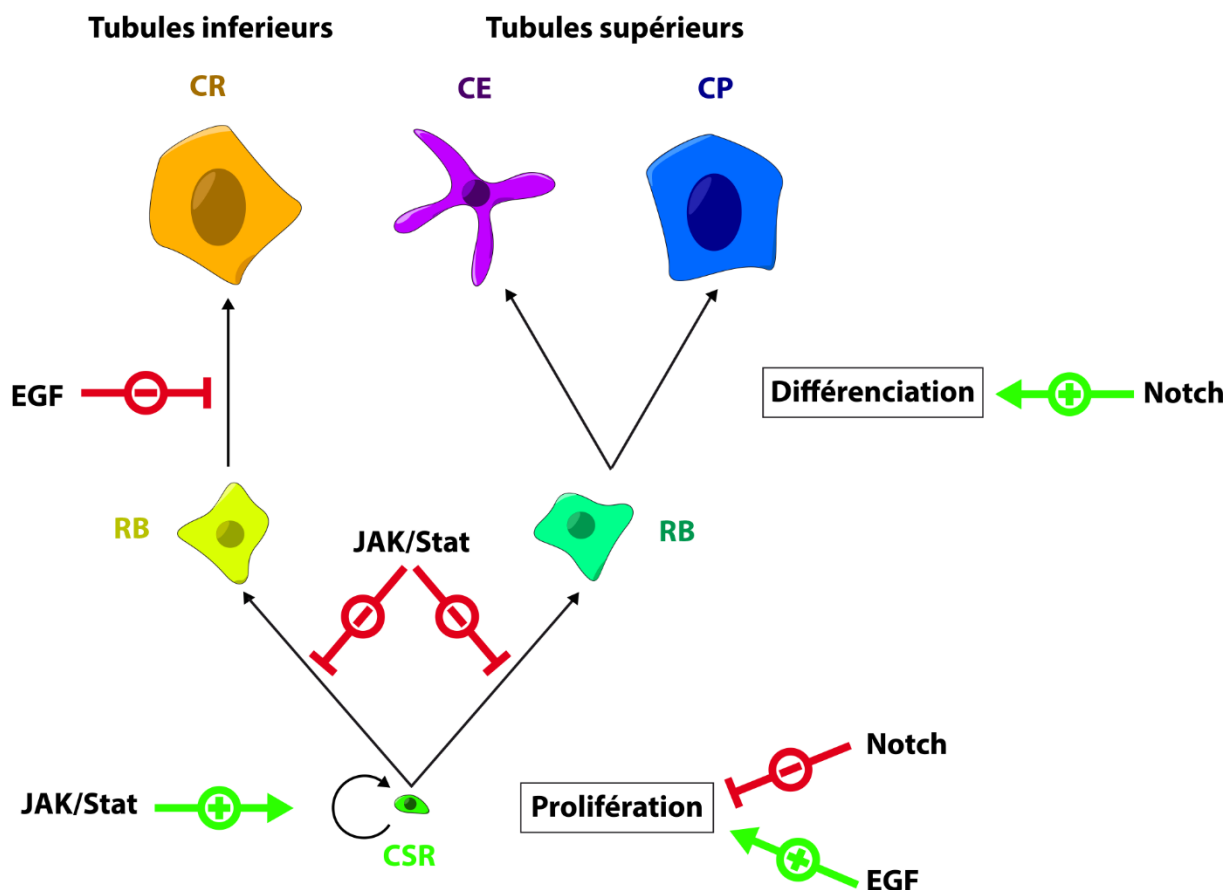


Figure 11 : Les cellules souches rénales assurent le maintien de l'homéostasie des tubules de Malpighi :
 L'autorenouvellement et la prolifération des cellules souches rénales (CSR) sont activés par les voies de signalisation JAK/STAT et EGF tandis que la signalisation Notch inhibe la prolifération des CSR. Suite à une division asymétrique, les CSR vont donner un renalblaste (RB) ou progéniteur rénal. Ce RB peut se différencier progressivement en cellule réabsorbante (CR) dans les tubules inférieurs soit migrer vers les tubules supérieurs et se différencier en cellule étoilée (CE) ou en cellule principale (CP). La voie de signalisation JAK/STAT inhibe la division asymétrique tandis que la signalisation EGF active la différenciation des RB en CR. Enfin l'activation de la voie de signalisation Notch promeut la différenciation des CSR.

Les CSR expriment *Dll*, ce qui permet d'activer la voie Notch dans les RB pour initier leur différenciation en cellules réabsorbantes, les CP et les CE (Li et al., 2014b). Deux autres études ont étudié les signaux internes responsables de la prolifération des CSR. En effet, il a été observé que l'activation de la voie de la signalisation EGF au sein des CSR augmente l'expression de *cycE* et *myc*, favorisant leur prolifération (Li et al., 2015) (Figure 11). Il a été également mis en évidence que la perte de fonction des gènes *scribble (scrib)* et *salvador*, tous les 2 membres de la voie de signalisation Hippo, conduit à une surprolifération des CSR (Doggett et al., 2011; Verghese et al., 2012; Yang et al., 2015; Zeng et al., 2010). De plus la présence de Yki a été révélée dans les cellules des tubules, dont les CSR (Zeng et al., 2010). Ces observations constituent un point très important pour moi et la suite de mes travaux puisque je m'intéresserai à la fonction de la voie de signalisation Hippo et de Yki plus particulièrement au sein de ces cellules.

Bien que de nombreux mécanismes soient conservés entre le système intestinal et le système rénal, l'approfondissement des connaissances sur les 2 organes a été très inégal. Nous pouvons dire que le système rénal a été délaissé au profit de l'intestin. Pourtant, ce modèle présente plusieurs avantages :

- Les processus cellulaires mis en jeu lors de leur mise en place permettent d'étudier les étapes de migration ainsi que de reprogrammation de cellules souches somatiques :
- L'organisation et le nombre des CSR rendent possible et simple la quantification de leur nombre contrairement aux CSI.
- Le fait que les CSR soient majoritairement quiescentes et se divisent très peu permet d'étudier les mécanismes mis en jeu pour limiter la prolifération et l'activité de ces cellules.
- L'étude du fonctionnement des TM a conduit au développement de nombreux outils pouvant offrir des possibilités intéressantes pour mesurer l'impact des cellules souches somatiques sur la physiologie d'un organe.

IV- Shavenbaby contrôle la formation des trichomes

L'équipe de François Payre, dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, s'intéresse depuis plusieurs années à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la morphogenèse épidermique chez la Drosophile. Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier le locus *ovo/shavenbaby (svb)*, codant un facteur de transcription essentiel pour le remodelage des cellules et la formation d'extensions cytoplasmiques apicales dans l'épiderme, appelés trichomes.

Lors de ma thèse, j'ai entrepris avec Cédric Polesello de décrypter la fonction de *svb* dans le système rénal de la Drosophile et plus précisément dans l'homéostasie des cellules souches rénales (CSR). En effet, des résultats préliminaires dans l'équipe avaient permis de montrer que *svb* est exprimé spécifiquement dans ces cellules. Afin de comprendre le cheminement de mes travaux, je vais présenter l'état des connaissances sur le gène *ovo/svb*. Je parlerai de la fonction biologique de *ovo/svb* chez la Drosophile et de ses homologues chez diverses espèces notamment *OVOL* chez les mammifères. *Svb* étant le gène à l'origine de mes travaux de thèse, je vais m'intéresser tout particulièrement à celui-ci et détailler le mode d'action de ce facteur de transcription. Je présenterai également les facteurs et les séquences régulatrices qui définissent spatialement le registre d'expression de *svb*. Enfin, je détaillerai les mécanismes moléculaires à l'origine du contrôle temporel de l'activité transcriptionnelle de *Svb*.

1- Le locus *ovo/shavenbaby* :

Svb est un facteur de transcription à doigt de zinc C2H2 codé par le gène *ovo/shavenbaby* situé sur le chromosome X (Busson et al., 1983; Oliver et al., 1994). Ce locus code 3 isoformes générés par l'activation de 3 promoteurs alternatifs distincts. *OvoA* et *OvoB* sont exprimées dans les cellules germinales tandis que *svb* est exprimé dans les cellules somatiques, notamment dans les cellules épidermiques. Les trois isoformes *OvoA*, *OvoB* et *Svb* possèdent un domaine de fixation à l'ADN ainsi qu'une région d'activation transcriptionnelle. *OvoB* agit comme un activateur transcriptionnel tandis que *OvoA* a une

fonction répresseur grâce à un domaine N-terminal additionnel (Andrews et al., 2000; Mével-Ninio et al., 1995). Enfin, Svb constitue la forme la plus longue avec, en plus des domaines activateur et répresseur, une région spécifique de la forme somatique en partie N-terminale codée par un exon supplémentaire, appelé 1s (Delon et al., 2003) (Figure 12).

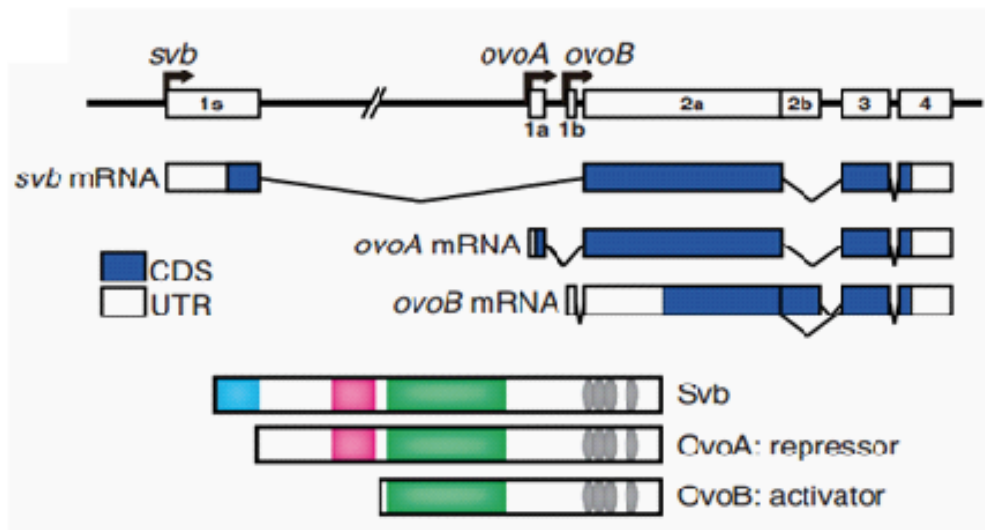


Figure 12 : Le locus *ovo/shavenbaby* code 3 isoformes différents :

Schéma du locus *ovo/svb*, des ARNm transcrits *svb*, *ovoA* et *ovoB* ainsi que des 3 protéines respectives. Les régions codantes sont présentées en bleu (CDS) et les régions non codantes en blanc (UTR). Svb, OvoA et OvoB comprennent 4 doigts de zinc (ovale gris) et une région activatrice (vert) tandis que Svb et OvoA possèdent une région dominante de répression transcriptionnelle (magenta). Svb contient spécifiquement en partie N-terminale l'exon 1s (bleu ciel). (D'après Kondo et al., 2010)

2- *Shavenbaby* est nécessaire et suffisant pour la formation des trichomes :

Les premiers mutants pour *svb* ont été isolés lors de grands cribles génétiques menés par C. Nusslein-Volhard et E. Wieschaus (Wieschaus et al., 1984). En effet, les embryons mutants pour *svb* ont la particularité de présenter une cuticule dépourvue de trichomes, tandis que les embryons sauvages montrent une alternance de cellules à trichome et de cellules à surface lisse (Figure 13A). Des travaux pionniers de l'équipe ont montré que *svb* est nécessaire et suffisant pour la formation des trichomes (Payre et al., 1999; Wieschaus et al., 1984). En effet, les individus mutant pour *svb* ne forment pas de trichomes (Figure 13B, C) tandis que l'expression ectopique de *svb* dans des cellules lisses conduit à la formation de trichomes. De plus, les cellules qui expriment *svb* dans l'épiderme vont former des denticules. De façon intéressante, l'expression ectopique de la forme *OvoA* dans l'épiderme empêche la formation des trichomes tandis que l'expression de *OvoB* induit la formation de trichomes ectopiques (Andrews et al., 2000). Ainsi *svb* détermine le registre spatial des cellules qui vont former un trichome.

Il s'avère que le gène *ovo/svb* ainsi que sa fonction sont conservés chez de nombreuses espèces y compris chez les mammifères (Johnson et al., 2001; Khila et al., 2003; Kumar et al., 2012; Lapan and Reddien, 2012). Par exemple chez la mouche de l'olive, *ovo/shavenbaby* est aussi exprimé dans les cellules germinales et les cellules à trichomes (Khila et al., 2003). *Lin-48*, homologue de *svb* chez *Caenorhabditis elegans*, est requis pour la formation de l'intestin antérieur (Johnson et al., 2001). Chez le planaire *Schmidtea mediterranea*, *ovo* est requis pour la régénération de l'œil (Cross et al., 2015; Lapan and Reddien, 2012). Chez les mammifères, *OVOL1-3* (*ovo*-like), les homologues de *ovo/svb* (Kumar et al., 2012), sont impliqués dans une grande variété de processus biologiques dont certaines fonctions sont similaires à *ovo/svb*. En effet, *OvoL* joue un rôle important au cours de la différenciation épidermique et de la spermatogenèse chez la souris (Dai et al., 1998; Hayashi et al., 2017). De façon intéressante, *OVOL* est exprimé dans le rein chez la souris et sa perte de fonction provoque des défauts de formation et l'apparition d'œdèmes dans les tubules rénaux (Aue et al., 2015; Dai et al., 1998). Chez l'homme, la dérégulation de *OVOL* est souvent associée à l'apparition de cancers colorectaux (Ye et al., 2016), du rein (Ricketts et al., 2012), du sein (Hong et al., 2015; Roca et al., 2014; Watanabe et al., 2014), de la prostate (Roca et al., 2013, 2014), du poumon (Wang et al., 2017). De plus, les cellules cancéreuses dépourvues de la fonction d'*OVOL* ont un fort potentiel à migrer dans d'autres tissus en produisant des métastases, ce qui constitue un facteur important

d'agressivité de ces cancers (Roca et al., 2013, 2014). En effet, *OVOL* réprime la transition épithélio-mésenchymateuse en inhibant les facteurs requis pour cette transition : le microARN mir-200 et le facteur de transcription ZEB (Gregory et al., 2008). L'étude des interactions entre *OvoL* et mir-200/ZEB, par des approches computationnelles mathématiques, a mis en évidence que les cellules ne sont pas seulement dans un état épithélial ou mésenchyme, mais peuvent aussi être sous des états intermédiaires (Hong et al., 2015; Jia et al., 2015). Ainsi les cellules peuvent passer par différents états intermédiaires et basculer soit vers l'état épithélial, soit vers l'état mésenchymateux. Certains états hybrides combinent les caractéristiques des cellules souches cancéreuses, et *OvoL* empêcherait les cellules d'acquérir ces propriétés de cellules souches cancéreuses (Jolly et al., 2015). Enfin, *OvoL* inhibe la propension des cellules souches cancéreuses à former des tumeurs secondaires. Chez les mammifères, il a aussi été démontré *qu'OVOL* est aussi impliqué dans le contrôle de l'activité de progéniteurs (Kitazawa et al., 2016; Lee et al., 2014) et de cellules souches embryonnaires (Kim et al., 2014).

Pour conclure, le locus *ovo/svb* est conservé au cours de l'évolution et semble réguler des mécanismes similaires dans l'épiderme et dans les cellules germinales de la *Drosophile* aux mammifères.

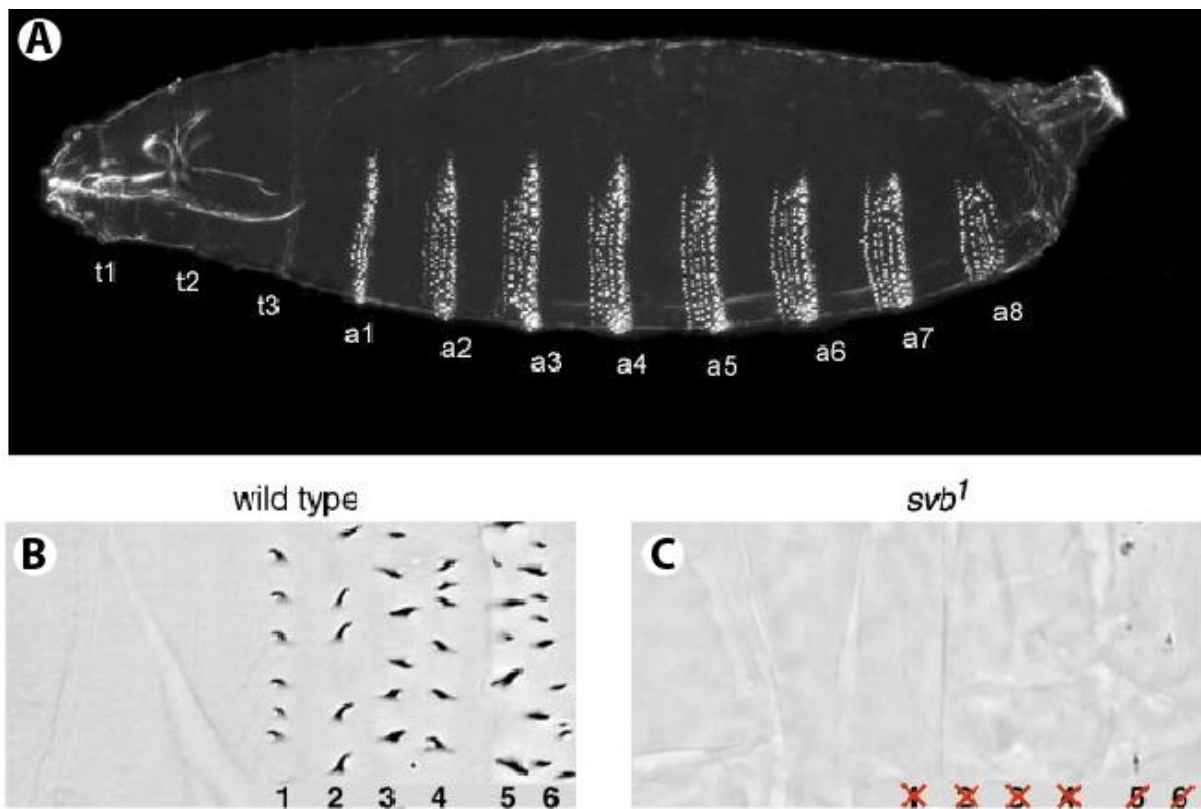


Figure 13 : *svb* est impliqué dans la formation des trichomes chez la Drosophile :

(A) Préparation de cuticule d'une larve sauvage de Drosophile de stade L1 où l'on peut observer les rangées de trichomes sur chaque segment abdominaux (a1-a8).

(B) Cuticule sauvage présentant l'alternance entre des rangées de cellules lisses et 6 rangées de cellules épidermiques présentant des trichomes.

(C) Cuticule d'une larve mutante pour *svb* dépourvue de trichome. (Adapté de Payre et al., 1999)

3- Régulation de l'expression de *shavenbaby* :

L'expression de *svb* dans les cellules épidermiques est stéréotypée dans chaque segment de l'embryon et elle préfigure l'apparition des trichomes (Figure 15C). Le patron des denticules est mis en place par la coordination des voies de signalisation Wg, EGF, Notch et Hh (Payre, 2004) (Figure 15A). L'interaction génétique séquentielle entre ces voies de signalisation va permettre de segmenter l'embryon et de définir les cellules qui expriment *svb* (Figure 14A). Dans le cas de la région ventrale de l'épiderme qui constitue le modèle le plus simple d'intégration des voies, l'équipe a montré que *svb* intègre les voies de signalisation Wg et EGF pour définir les cellules qui vont former un trichome. Ainsi, la signalisation Wg réprime l'expression de *svb* tandis que la signalisation EGF l'active (Payre et al., 1999).

Les efforts convergents de notre équipe et de celle de David Stern ont permis d'identifier les régions *cis*-régulatrices requises pour l'expression de *svb* et de montrer que l'évolution du patron de denticules chez la Drosophile est la conséquence de mutations au sein de ces régions. L'expression épidermique de *svb* est définie par cinq principales régions dites *enhancer* qui ont la particularité de s'étendre sur 90kb en amont du premier exon (Frankel et al., 2012).

Les trois premières régions ont été identifiées à l'aide de lignées rapportrices couvrant les 50kb en amont du gène. Ces trois *enhancers* (7, E et A) sont actifs dans des régions distinctes et récapitulent à eux trois le patron d'expression complet de *svb* dans l'épiderme embryonnaire (McGregor et al., 2007). Un découpage plus précis de la boîte E a permis de mettre en évidence la boîte E10 contenant deux modules E3 et E6 ayant une activité dans des cellules épidermiques distinctes (Frankel et al., 2010) (Figure 14B). Enfin, Alexandre Ahmad Al Sawadi, doctorant au laboratoire, a identifié la séquence minimale de 292pb, appelée E3-14, récapitulant le profil spatial de la boîte E3 (1kb). Puis, l'identification d'autres régions génomiques fortement conservées au cours de l'évolution ainsi que l'utilisation d'autres lignées rapportrices couvrant 41kb en amont de l'*enhancer* A, a permis de mettre en évidence deux régions *cis*-régulatrices additionnelles. De façon étonnante, ces deux régions DG et Z ont des registres d'activité similaires aux *enhancers* précédemment identifiés (Figure 14B). De plus, la délétion simultanée de ces deux régions n'induit pas de létalité et n'entraîne pas de phénotype particulier sur la formation des trichomes (Frankel et al., 2012). Ceci démontre que DG et Z sont des *enhancers* « shadow » qui permettent d'assurer la robustesse d'expression de *svb* en définissant des

régions d'expression redondante pour palier à de possibles mutations délétères (Frankel, 2012; Frankel et al., 2010; Lagha et al., 2012).

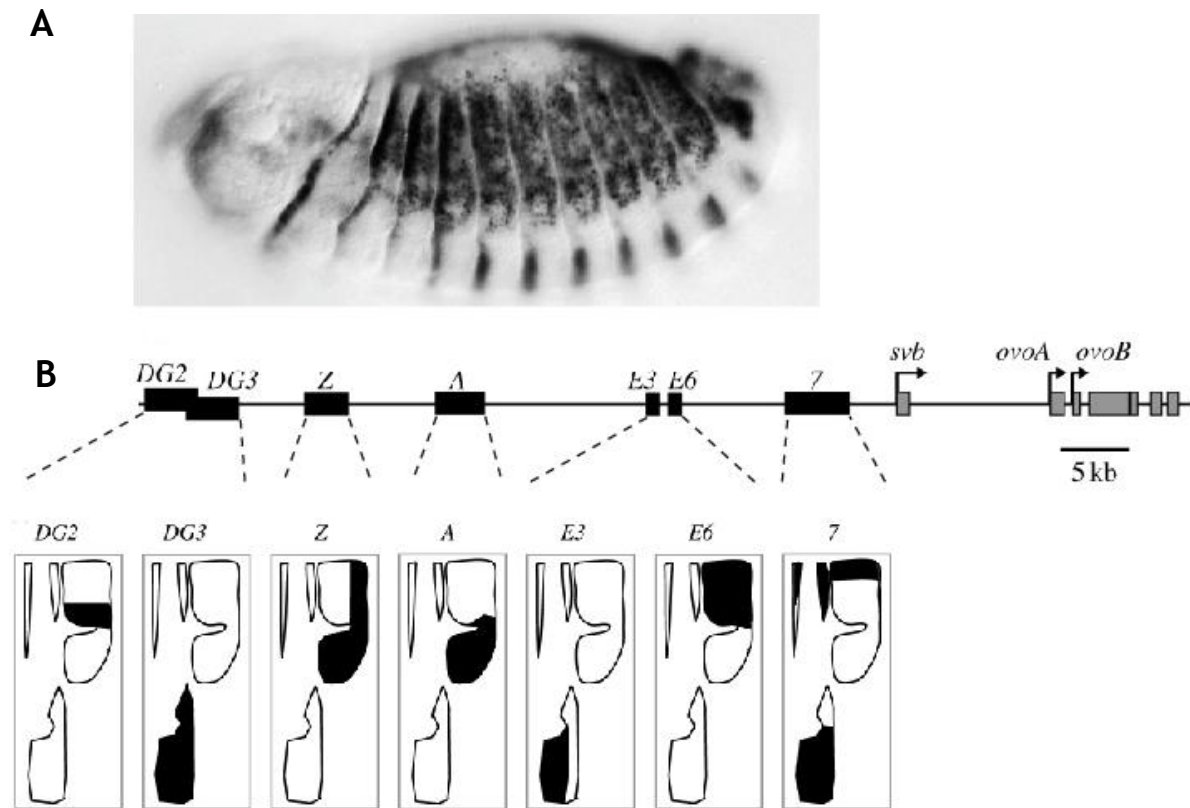


Figure 14 : L'expression de *svb* dans l'embryon est définie par l'activité collective de 3 *enhancers* « pionniers » et 3 *enhancers* « shadow » :

(A) Patron d'expression de *svb* dans un embryon au stade 14 révélé par Hybridation *in situ*.

(B) Représentation des *enhancers* épidermiques DG (DG2 et DG3), Z, A, E (E3 et E6) et 7, identifiés au sein du locus *ovo/svb* chez *Drosophila melanogaster* et schématisation de leur activité respective dans la partie dorsale (haut du rectangle) et ventrale (bas du rectangle) de l'épiderme. L'*enhancer* Z présente une activité redondante avec les *enhancers* A et E6, l'*enhancer* DG3 avec E3 et 7 tandis que le domaine d'activité de l'*enhancer* DG2 est chevauchant avec celui du Z et E6. (Adapté de Stern and Frankel, 2013)

Suite à l'identification des *enhancers* régulant l'expression de *svb*, Alexandre Ahmad Al Sawadi a recherché, par une approche à grande échelle, les facteurs de transcription se fixant sur ces régions régulatrices et requis pour leur activité. Il a criblé par une approche RNAi 400 facteurs de transcription exprimés chez l'embryon et testé si leur déplétion influence l'activité des *enhancers* 7, E et A. Pour compléter ce travail, un crible "one-hybrid" a été entrepris pour rechercher les facteurs se fixant sur les séquences régulatrices de *svb*. Cela a permis d'identifier les facteurs de transcription Pointed (Pnt, voies de signalisation EGF), Scalloped (Sd, voie de signalisation Hippo), SoxNeuro (SoxN) et Pangolin (Pan, voie de signalisation Wg) comme régulateurs de l'expression de *svb* via la régulation des *enhancers* E3-14 et 7. Ces observations ont par exemple permis d'identifier des sites de fixation consensus du facteur Pangolin impliqué dans la voie de signalisation Wg (résultats non publiés).

Pour résumer, *svb* intègre, via plusieurs *enhancers*, les voies de signalisation Wg, EGF, Notch et Hh pour déterminer le registre spatial et la robustesse de son patron d'expression au sein de l'épiderme (Arif et al., 2015; Delon and Payre, 2004; Stern and Frankel, 2013) (Figure 15 A, B et C).

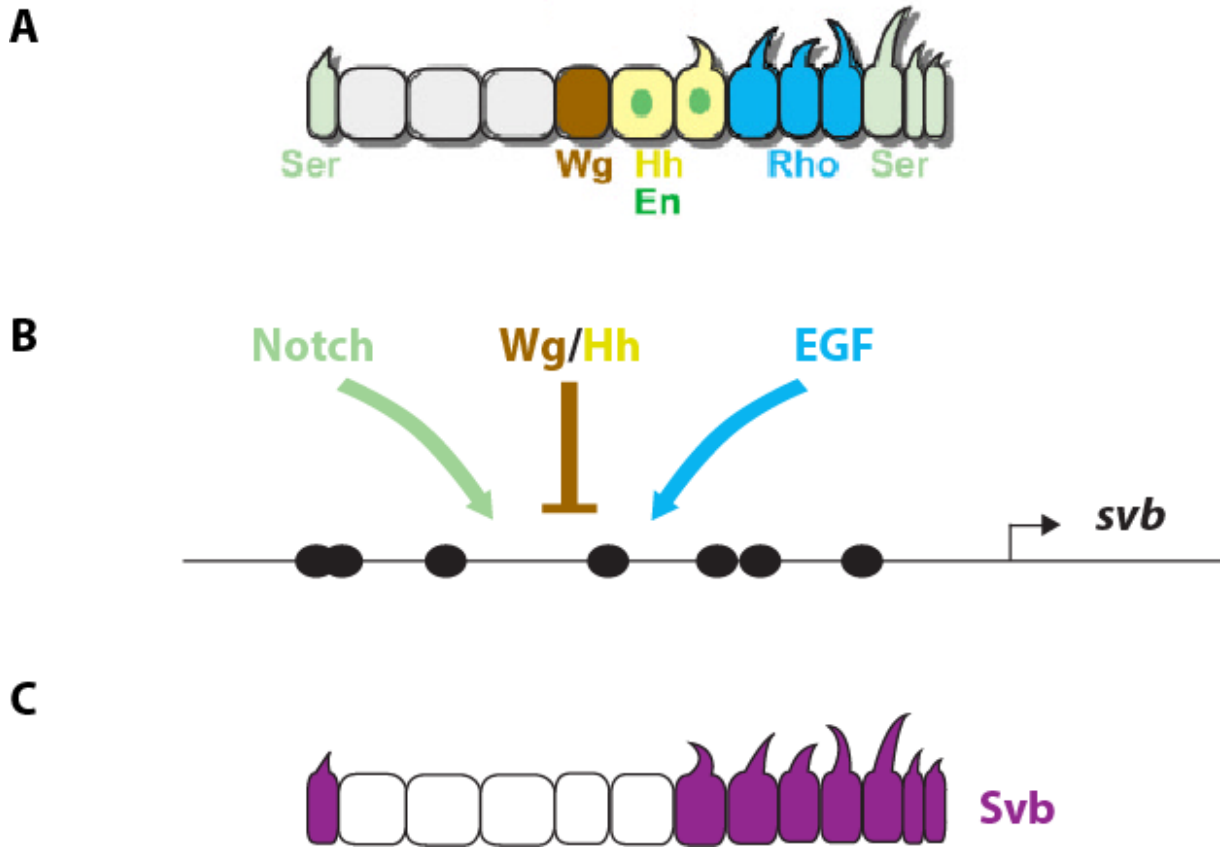


Figure 15 : *svb* intègre dans sa région *cis*-régulatrice les voies de signalisation Notch, Wg, Hh et EGF pour définir son registre spatial d'expression dans les cellules épidermique qui vont former les trichomes :

(A) Dans les cellules épidermiques ventrales les voies de signalisation Wg, qui active l'expression de *engrailed* (En), et Hh sont actives dans deux rangées de cellules lisses tandis que les facteurs rhomboid, (Rho, voie de signalisation EGF) Serrate (Ser, voie de signalisation Notch) sont exprimés dans les cellules qui forment des trichomes.

(B) *svb* intègre via différents *enhancers* les voies de signalisation Notch et EGF qui activent son expression et la voie de signalisation Wg, dont l'activité est maintenue par la voie de signalisation Hh, inhibe l'expression de *svb* dans l'épiderme ventral.

(C) La régulation de l'expression de *svb* par les voies de signalisation Wg, Hh, Notch et EGF permet la mise en place du patron d'expression de *svb* qui préfigure de l'apparition des trichomes. (Adapté de Payre, 2004)

4- *Shavenbaby coordonne l'expression de gènes directement impliqués dans la formation des trichomes :*

Afin de mieux comprendre le rôle de *svb* dans la formation des trichomes, l'équipe a entrepris de rechercher les gènes cibles de ce facteur de transcription par des approches candidates et globales. L'approche candidate était basée sur le profil d'expression des gènes ou bien par l'implication du gène dans la formation du trichome (Chanut-Delalande et al, 2006).

Puis, pour identifier la totalité des gènes cibles de *Svb*, des expériences de RNA-seq ont été réalisées sur des embryons par Delphine Menoret durant sa thèse au sein du laboratoire. Combinées à des données de ChiP, ces expériences ont permis de confirmer les cibles précédemment identifiées et d'observer que *Svb* régule l'expression d'environ 150 gènes différents dont la plupart n'a pas encore été fonctionnellement caractérisée (Menoret et al., 2013). Afin de mieux comprendre comment *Svb* active ses gènes cibles, des analyses systématiques de l'activité des régions non codantes des gènes cibles ont été réalisées dans l'épiderme embryonnaire. Les séquences actives comparées aux séquences non actives par une approche statistique ont mis en évidence qu'une région dépendante de *Svb* contient au moins un site de liaison de *Svb* de 8bp. Selon les gènes cibles, elles peuvent contenir un ou plusieurs sites de liaison à *Svb* mais aussi deux autres motifs qui ne sont pas encore attribués à la liaison de facteurs de transcription. La mutation individuelle des sites de liaison de *Svb* induit une baisse significative de l'activité des *enhancers* cibles de *Svb* (Menoret et al., 2013).

L'ensemble de ces données montrent que *Svb* régule l'expression d'un ensemble de gènes cibles qui participent collectivement et directement à la formation des denticules. Ces gènes sont impliqués dans :

- Le remodelage du cytosquelette d'actine, qui se concentre en partie apicale et permet la déformation de la cellule (Chanut-Delalande et al., 2006).

- La synthèse d'une matrice extracellulaire spécialisée par la production de protéine spécifiques qui permettent de soutenir et maintenir la formation du trichome (Fernandes et al., 2010; Plaza et al., 2010)

- La production de protéines de la cuticule ainsi que d'enzymes requises pour la pigmentation de la cuticule (Andrew and Baker, 2008; Chanut-Delalande et al., 2006; Menoret et al., 2013).

Pour conclure, Svb est le facteur de transcription central dans la morphogénèse épidermique en permettant l'activation, via sa fixation à une combinaison variable de sites de fixation, d'une batterie de gènes effecteurs directement impliqués dans la formation des denticules (Figure 16).

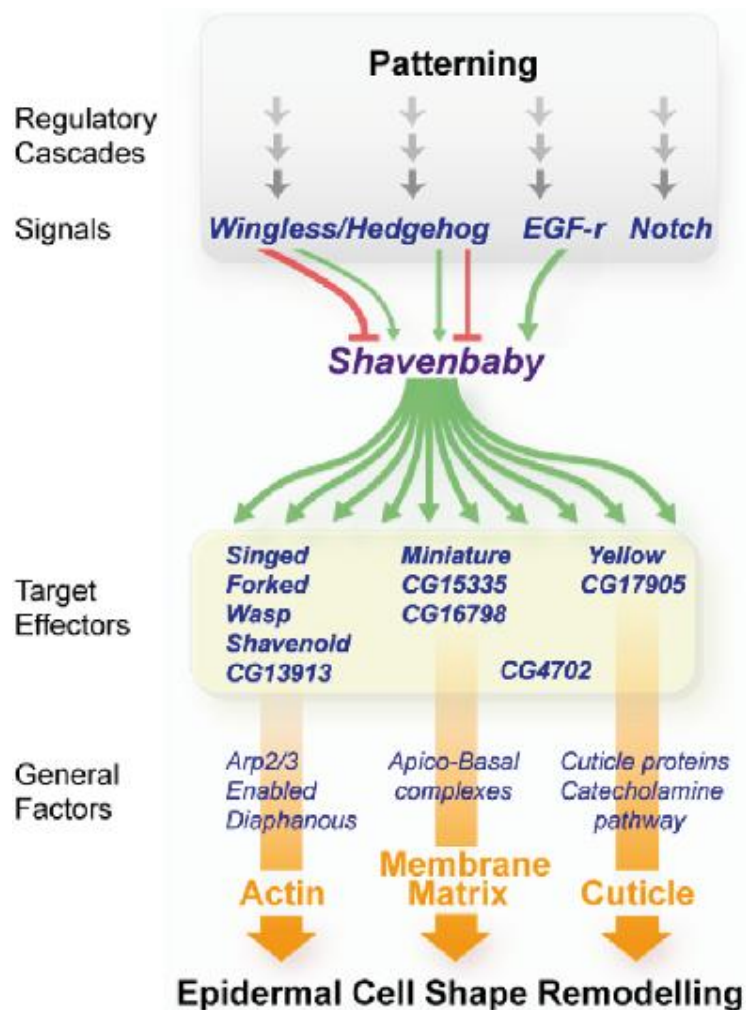


Figure 16 : Svb est le facteur de transcription central qui régule l'expression des gènes effecteurs de la formation des trichomes :

Svb déclenche l'expression d'une batterie de gènes directement impliqués dans la formation des trichomes et agissant sur le remodelage du cytosquelette d'actine (*singed*, *forked*, *wasp*, *shavenoid*, ...), la synthèse d'une matrice extracellulaire spécialisée (*miniature*, ...), la production d'éléments de la cuticule et d'enzymes impliquées dans la pigmentation de cette cuticule (*yellow*, ...) ainsi que d'autres gènes dont la fonction reste à définir. (Daprès Chanut-Delalande et al., 2006)

5- La régulation temporelle de l'activité transcriptionnelle de Shavenbaby :

L'identification d'un autre gène, *polished-rice (pri)* ou *tarsal-less (tal)*, initialement découvert dans la segmentation de l'embryon de *tribolium castaneum*, a permis de revisiter la compréhension du mode de fonctionnement de *Svb* dans la formation des trichomes (Galindo et al., 2007; Kondo et al., 2007; Savard et al., 2006). *Pri* présente un patron d'expression très dynamique au cours de l'embryogenèse et est exprimé dans l'épiderme selon un profil segmenté recouvrant le domaine d'expression de *svb*. De plus, la déplétion du gène *pri* phénocopie la perte de fonction de *svb* et conduit à l'absence de denticules (Kondo et al., 2007). *Pri* fait partie d'une classe de gènes codant pour des ARN qui ont longtemps été considérés comme non codant (lncRNA, *long non coding RNA*) car possédant des cadres ouverts de lecture (ORF, *Open Reading Frame*) inférieurs à 100 acides aminés (Inagaki et al., 2005; Tupy et al., 2005). Cependant, des évidences récentes démontrent que chez la Drosophile et d'autres espèces, ces gènes contenant des smORFs (small ORF), codent effectivement des peptides possédant une fonction biologique (Albuquerque et al., 2015; Couso and Patraquim, 2017; Hashimoto et al., 2008; Kastenmayer, 2006; Zanet et al., 2016).

Pri est donc impliqué dans la morphogénèse épidermique et fait parti intégrante d'une nouvelle classe de gènes, les smORFs, qui constituent un réservoir de petites protéines jusque là insoupçonnées et potentiellement impliquées dans la régulation de processus biologiques divers.

a- Polished-rice enclenche la conversion de l'activité transcriptionnelle de Shavenbaby dépendante du protéasome :

Comme la perte de fonction de *svb* ou de *pri* entraîne un phénotype similaire dans l'épiderme embryonnaire, l'équipe, en collaboration avec le groupe de Yugi Kageyama, a voulu investir la possible relation entre ces deux gènes. La perte de fonction de *pri* n'affecte pas l'expression de *svb* et inversement, suggérant que *pri* et *svb* agissent parallèlement dans la formation des trichomes. Le gène *pri* produit un ARN qui possèdent 4 cadres ouverts de lecture actifs codant effectivement quatre peptides de 11 à 32 acides aminés fonctionnellement redondants (Kondo et al., 2007). Ces peptides induisent une élimination de la partie N-terminale de *Svb* qui contient l'exon 1s et une large partie du

domaine répresseur (Kondo et al., 2010). Cette modification post-traductionnelle conduit à la conversion de Svb, d'une forme longue répressive, en une forme courte activatrice transcriptionnelle. A partir d'un criblé cellulaire RNAi réalisé sur le génome entier, Jennifer Zanet et Emilie Benrabah ont mis en évidence le mécanisme moléculaire à la base de la conversion de Svb impliquant le protéasome (Zanet et al., 2015). En effet, les peptides Pri se lient à Ubr3, une E3 ubiquitine ligase, pour lui permettre de s'associer à Svb via trois lysines conservées et situées dans l'exon 1s. La reconnaissance de Svb par Ubr3 permet son ubiquitination et son adressage au protéasome, qui assure la dégradation de la partie N-terminale de Svb contenant le domaine répresseur (Zanet et al., 2015). Cette dégradation est spécifique de la forme somatique Svb et le couple Pri/Ubr3 n'affecte pas OvoA et OvoB qui sont dépourvus d'exon 1s (Kondo et al., 2010). En conclusion, les peptides Pri induisent, en collaboration avec Ubr3 et le protéasome, la dégradation partielle de Svb et donc sa conversion d'une forme longue répresseur à une courte activateur de la transcription (Figure 17).

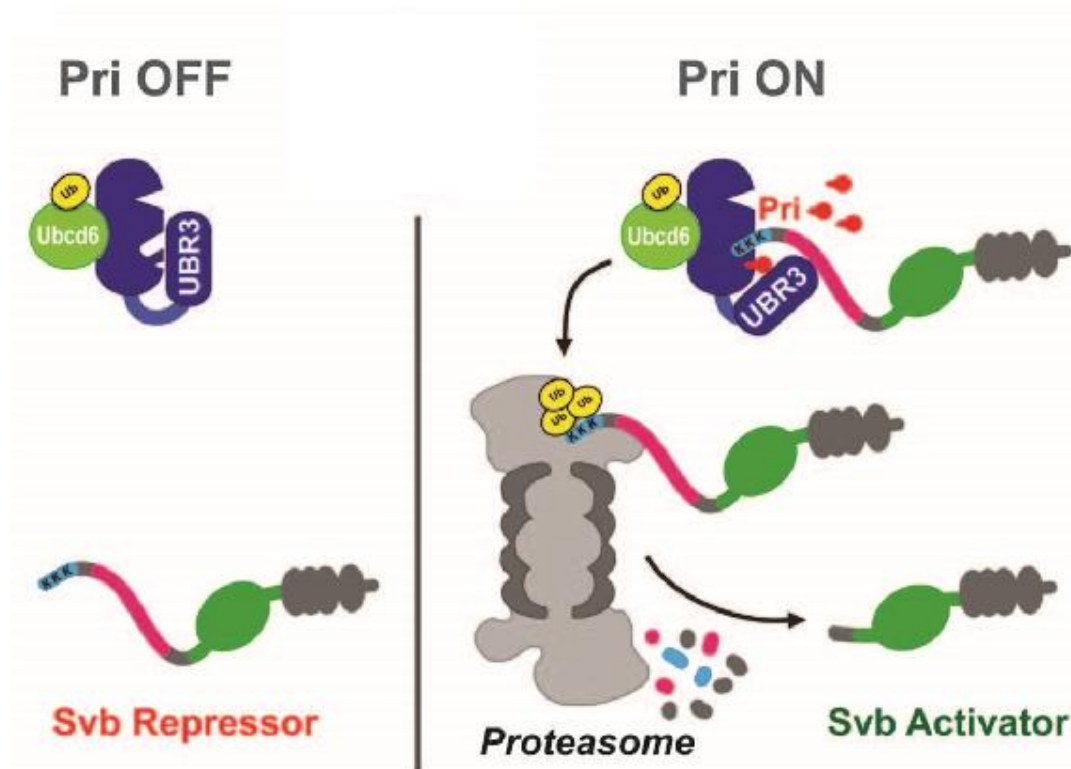


Figure 17 : Les peptides Pri déclenchent la conversion transcriptionnelle de Svb dépendante de Ubr3/protéasome :

En absence d'expression de *pri*, Svb est présent sous forme d'un long répresseur transcriptionnel. Suite à la production et à la fixation des peptides Pri sur Ubr3 cette dernière subit un changement conformationnel lui permettant d'interagir avec Svb via sa partie N-terminale. Ubr3 recrute la E2 ligase Ubc66 qui ubiquitine Svb assurant ainsi son adressage au protéasome où sa partie N-terminale est dégradée. Svb est ensuite relargué et agit en activateur transcriptionnel pour enclencher l'expression de ses gènes cibles effecteurs de la formation des trichomes. (Zanet et al., 2015)

b- L'hormone stéroïdienne ecdysone contrôle via les peptides Polished-rice la temporalité de la différenciation épidermique :

Cette étude approfondie du mécanisme d'activation de Svb met en lumière un processus complexe et on peut se demander l'intérêt d'une activation en plusieurs étapes. L'étude de la régulation de l'expression du gène *pri* a apporté une explication, en ajoutant la notion de temporalité dans le système.

Il est connu que le développement des organismes nécessite une coordination spatiale et temporelle de la formation des organes. Tandis que les processus de différenciation des tissus sont relativement bien connus au niveau spatial, la temporalité de la mise en place des tissus est mal comprise. Chez les insectes, l'hormone stéroïdienne ecdysone contrôle

les grandes transitions développementales, à savoir les mues et la métamorphose (Yamanaka et al., 2013a) (Figure 18A).

La production de l'ecdysone est régulée par plusieurs facteurs internes et externes comme la croissance des tissus (Colombani et al., 2005; Delanoue et al., 2010), la nutrition (Andersen et al., 2013) et la lumière (Yamanaka et al., 2013b). L'ecdysone est produite chez la larve dans la glande prothoracique à partir de cholestérol provenant de la nourriture assimilé par l'animal, et subit une cascade de modification post-traductionnelles par des enzymes codées par les gènes « *halloween* » (Niwa and Niwa, 2014). Le nom de ces gènes provient du phénotype des embryons mutants pour ces enzymes qui arborent des défauts de maturation de la cuticule rendant la cuticule difficilement distinguable en microscopie à contraste de phase. Une fois l'ecdysone synthétisée, elle est sécrétée dans l'hémolymphe et transformée localement en 20-hydroxy-ecdysone (20E), la forme active de l'ecdysone. L'hormone active 20E se fixe ensuite à son récepteur hétérodimérique EcR/Usp (ecdysone Receptor et Ultraspiracle) pour activer l'expression de ces gènes cibles, *EcR* et *usp* codant pour des facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires (Hill et al., 2013). Les cellules activées par l'ecdysone vont alors exprimer une cascade de récepteurs nucléaires pour induire la différenciation des tissus. Leur expression est finement régulée selon une temporalité stéréotypée puisque certaines de ses cibles constituent des gènes de réponse précoce à l'ecdysone tandis que d'autres sont des gènes de réponse plus tardive (Fahrbach et al., 2012). Tandis que ces gènes sont clairement définis comme des gènes de réponse à l'ecdysone, leur fonction précise dans la différenciation des tissus est moins bien comprise.

Au cours de mon Master 2 Recherche, j'ai participé à démontrer que le gène *pri* est directement activé par l'ecdysone via le récepteur nucléaire EcR dans l'épiderme embryonnaire pour la formation des trichomes (Chanut-Delalande et al., 2014). En effet, j'ai pu observer que la perte de fonction de la plupart des gènes cibles connus de EcR (*Blimp1*, *Hr46*, *E75*, *ImpE1*, *ftz-f1*) ne provoquent pas de défauts de formation des trichomes. Par contre, la mutation de *spook*, gène « *halloween* » responsable de la biosynthèse de l'ecdysone, provoque une absence d'expression de *pri* et des gènes cibles de *Svb* sans affecter l'expression de *svb*. L'équipe, à l'aide de données de ChiP-seq pour EcR et de séquences rapportrices couvrant les régions 5' et 3' du gène *pri*, a pu identifier l'*enhancer priG* en 5' qui récapitule l'expression de *pri* et présente une forte fixation de EcR (Chanut-Delalande et al., 2014). Azza Dib pendant sa thèse au laboratoire a pu

démontrer la présence de deux sites consensus de fixation de EcR au sein de *priG* qui sont nécessaires à son activité.

Pour conclure, l'ecdysone assure un contrôle systémique sur la formation des denticules en définissant temporellement, via l'activation de l'expression de *pri*, la mise en route du programme génétique gouverné par *Svb* et permettant la formation des trichomes (Figure 18B).

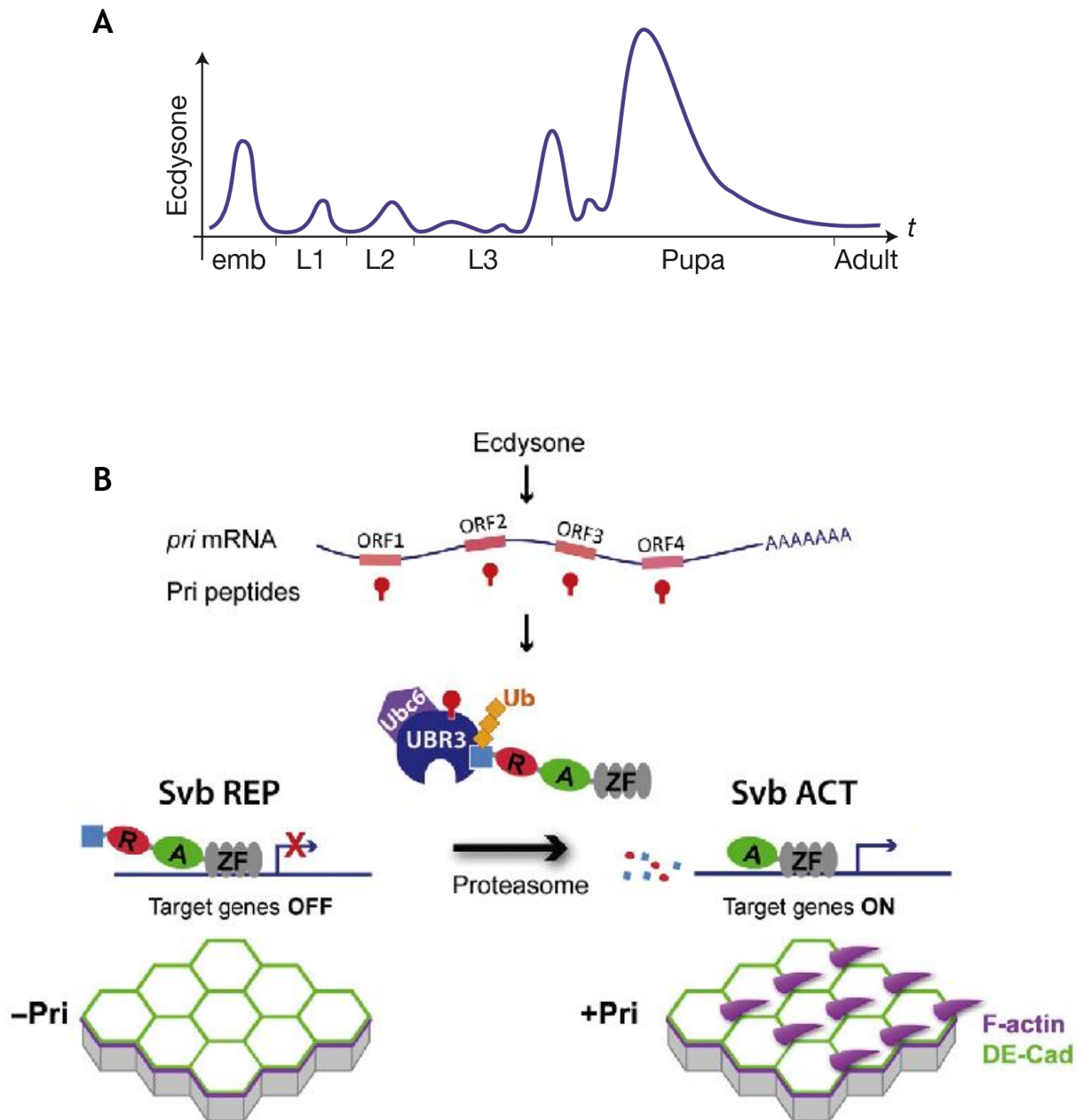


Figure 18 : L'hormone steroïdienne ecdysone régule la temporalité de la formation des trichomes via l'activation de l'expression du gène *polished-rice* :

(A) L'ecdysone contrôle la temporalité de chaque transition développementale par des pics d'augmentation de sa concentration qui précèdent l'éclosion de chaque stades larvaires et l'initiation de la métamorphose.

(B) L'ecdysone via son récepteur EcR régule l'expression du gène *polished-rice* (*pri*). La signalisation ecdysone enclenche la production des peptides Pri qui permettent la conversion de Svb dépendante de *ubr3*/protéasome. Svb, transcrit sous forme d'un long répresseur (SvbREP), est converti en activateur transcriptionnel (SvbACT) pour initier le programme génétique de formation des trichomes en activant l'expression de ses gènes cibles. (Zanet et al., 2016)

Résultats

I- Résumé de la publication

La mise en place et la croissance coordonnée des organes d'un animal requiert un contrôle temporel et spatial précis des programmes génétiques développementaux. Si les facteurs impliqués dans l'organisation spatiale des tissus sont bien connus, le contrôle du « timing » de ces processus reste très mal compris. Chez la *Drosophile*, la temporalité des mues successives de la larve ainsi que de l'initiation de la métamorphose est défini par des pics séquentiels de production d'une hormone stéroïdienne, l'ecdysone. Ici nous montrons que l'ecdysone enclenche le programme génétique gouverné par *Shavenbaby* (*Svb*), facteur de transcription impliqué dans la différenciation terminale des cellules épidermique. L'expression de *svb* détermine le registre spatial du patron de formation d'extension apicales, les trichomes. Initialement présent sous forme de répresseur, *Svb* subit suite à l'action du gène *polished-rice* (*pri*) une maturation post-traductionnelle, dépendant du protéasome, permettant sa conversion en activateur transcriptionnel. L'action du gène *pri* permet à *Svb* d'activer l'expression de ses gènes cibles effecteurs de la formation des trichomes. A travers l'identification d'une nouvelle enzyme de biosynthèse de l'ecdysone, *GstE14*, nous démontrons ici que l'expression de *pri* est contrôlée par l'ecdysone via son récepteur, *ecdysone Receptor* (*EcR*). De plus, la manipulation de l'expression de *pri* est suffisante pour stopper ou activer précocement le programme génétique gouverné par *Svb*.

J'ai eu l'opportunité de participer à ce projet au cours de mon Master 2. Dans un premier temps, j'ai pu démontrer que les embryons mutants pour des gènes de réponse « canoniques » de la voie de signalisation ecdysone (*E75*, *blimp1*, *ImpE1*, *ftz-f1*, *Hr46*) ne présentent aucun défaut de formation des trichomes. Ensuite, j'ai observé que la mutation du gène *spook*, codant une enzyme de biosynthèse de l'ecdysone, entraîne chez l'embryon une perte d'expression de *pri* ainsi que du gène cible de *Svb*, *dusky-like* (*dyl*), sans affecter l'expression de *svb*.

Pour conclure, ces travaux démontrent que l'ecdysone contrôle temporellement, via la régulation de l'expression de *pri*, l'initiation du programme génétique de formation des trichomes gouverné par *Svb*.

II- Manuscrit

Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development

Hélène Chanut-Delalande^{1,2,8}, Yoshiko Hashimoto^{3,8}, Anne Pelissier-Monier^{1,2}, Rebecca Spokony⁴, Azza Dib^{1,2}, Takefumi Kondo^{3,9}, Jérôme Bohère^{1,2}, Kaori Niimi⁵, Yvan Latapie^{1,2,10}, Sachi Inagaki⁵, Laurence Dubois^{1,2}, Philippe Valenti^{1,2}, Cédric Polesello^{1,2}, Satoru Kobayashi³, Bernard Moussian⁶, Kevin P. White⁴, Serge Plaza^{1,2}, Yuji Kageyama^{5,7,11} and François Payre^{1,2,11}

Animal development fundamentally relies on the precise control, in space and time, of genome expression. Whereas we have a wealth of information about spatial patterning, the mechanisms underlying temporal control remain poorly understood. Here we show that Pri peptides, encoded by small open reading frames, are direct mediators of the steroid hormone ecdysone for the timing of developmental programs in *Drosophila*. We identify a previously uncharacterized enzyme of ecdysone biosynthesis, *GstE14*, and find that ecdysone triggers *pri* expression to define the onset of epidermal trichome development, through post-translational control of the Shavenbaby transcription factor. We show that manipulating *pri* expression is sufficient to either put on hold or induce premature differentiation of trichomes. Furthermore, we find that ecdysone-dependent regulation of *pri* is not restricted to epidermis and occurs over various tissues and times. Together, these findings provide a molecular framework to explain how systemic hormonal control coordinates specific programs of differentiation with developmental timing.

Recent studies have established that eukaryotic genomes express a wide variety of long non-coding RNAs (reviewed in refs 1,2). Small open reading frames (smORFs) are still pervasive among long non-coding RNAs, and a growing body of evidence^{3,4} indicates that at least some of them are actually translated into peptides^{5–7}. However, the function and mechanistic roles of smORF-encoded peptides are largely unknown.

The *polished rice* (*pri*, also known as *mlpt* or *tal*) RNA encodes four smORF peptides (11–32 amino acids) that regulate various developmental steps across insect species^{8–11}. In *Drosophila* embryos, the absence of *pri* results in severe epidermal defects^{9,11}, preventing the formation of actin-rich cell protrusions, called trichomes¹². Previous work has shown that trichome patterning relies on a transcription factor, Shavenbaby (Svb, also known as Ovo), that specifies which subset of epidermal cells form trichomes^{13–17}. Svb directly activates the expression of cell effectors including actin regulators^{18,19}, cuticle components^{18–20} and zona pellucida extracellular proteins^{19,21}, collectively responsible for trichome formation. We previously found that Pri peptides are required for the post-translational maturation

of Svb, switching its activity from a repressor to an activator of transcription²². The developmental function of this sophisticated mechanism remained poorly understood.

Here, we report that *pri* defines when the Svb-driven trichome program is executed, at distinct developmental points, in response to ecdysone signalling. From a genetic screening, we isolated a previously uncharacterized gene, *Glutathione S transferase E14* (*GstE14*), indispensable for trichome formation. We find that *GstE14* is required for ecdysone biosynthesis from dietary cholesterol, and show that ecdysone controls the transcription of *pri*, across different tissues and developmental times. The ecdysone steroid hormone has classically been shown to provide a systemic control on developmental timing^{23,24}. Recent work further demonstrated that its production integrates various inputs from the internal and external milieu, including tissue growth²⁵, body size²⁶, nutritional uptake²⁷ and light²⁸. The ecdysone–Pri–Svb circuit thus represents a molecular elucidation of how a global signal implements local differentiation programs, at defined points, to synchronize development with the environment.

¹Centre de Biologie du Développement, Université de Toulouse, UPS, 31062 Toulouse cedex 9, France. ²CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, Toulouse, 31062 cedex 9, France. ³Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National institutes of Natural Sciences Okazaki, Aichi 444-8787, Japan. ⁴Institute for Genomics and Systems Biology and Department of Human Genetics, University of Chicago, Illinois 60637, USA. ⁵Research Center for Environmental Genomics, Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University, Kobe 657-850, Japan. ⁶Animal Genetics, Interfaculty Institute for Cell Biology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany. ⁷Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, Kobe 657-850, Japan. ⁸These authors contributed equally to this work. ⁹Present address: RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan. ¹⁰The authors would like to dedicate this article to the memory of Y. Latapie (1980–2014), whose life was taken by an avalanche in the Pyrenees.

¹¹Correspondence should be addressed to Y.K. or F.P. (e-mail: kageyama@ruby.kobe-u.ac.jp or francois.payre@univ-tlse3.fr)

Received 7 April 2014; accepted 15 September 2014; published online 26 October 2014; DOI: 10.1038/ncb3052

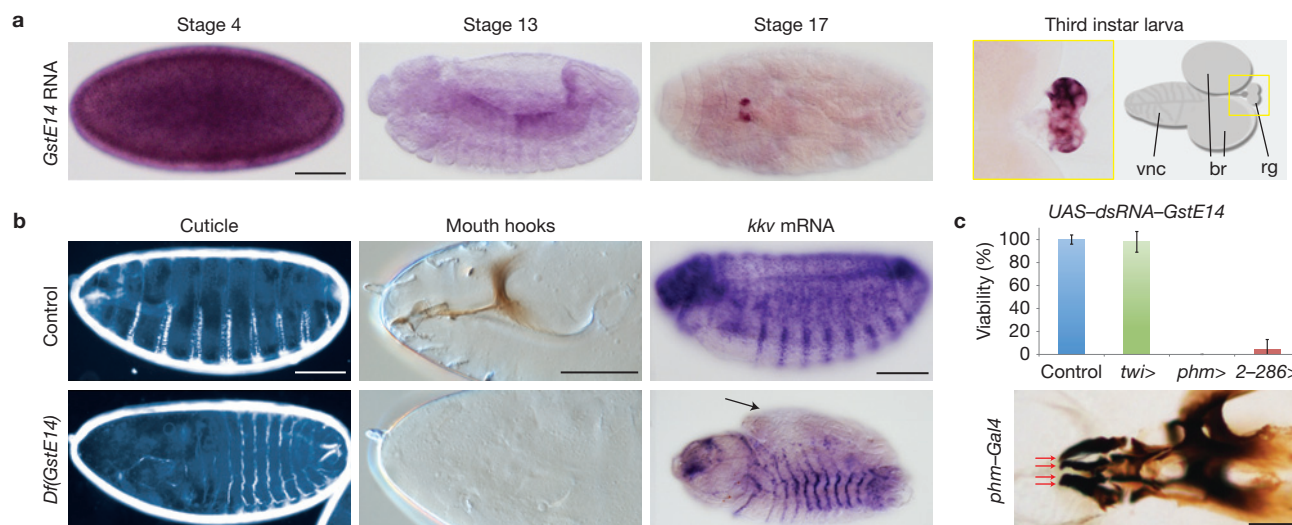


Figure 1 *GstE14* encodes a component of the ecdysone pathway. (a) *In situ* hybridization to *GstE14* mRNA shows ubiquitous expression in early cellularized embryos (st-4). Following weak signal throughout mid-embryogenesis (st-13), *GstE14* is specifically expressed in the ring gland at later stages (st-17). Dissected third instar larval brain shows *GstE14* expression in the ring gland, as previously noticed for other genes involved in ecdysone synthesis. vnc, ventral nerve chord; br, brain; rg, ring gland. Scale bar, 100 μ m. (b) *GstE14* mutant embryos show strongly affected embryonic development, with severe defects collectively reminiscent of the phenotype of Halloween mutants^{33,34,37,40,41}. These defects include poorly differentiated cuticle (left panels), defective head involution and mouth hooks (middle), and the abnormal expression pattern of *kkv* (right) encoding chitin synthase, a main player of cuticle formation. *GstE14* mutants also often show defects in dorsal closure (arrow). Scale bars, 100 μ m. (c) *GstE14* function in the larval ring gland is required for developmental transitions and adult viability. When compared with control (*phm* > *GFP*, green

fluorescent protein gene), silencing *GstE14* in the ring gland (*phm* > *UAS-dsRNA-GstE14*; *UAS*, upstream activating sequence) leads to developmental arrest at larval stages, with animals ultimately dying before pupation. *phm* > *GstE14* larvae are often blocked at the L2-L3 transition, showing characteristic double mouth hooks (four hooks instead of two, red arrows). Scale bar, 10 μ m. A similar, slightly weaker, phenotype is observed with the *2-286-Gal4* line also driving expression in the ring gland. In contrast, *GstE14* knockdown in mesodermal derivatives (*twi-Gal4*) does not affect embryonic and post-embryonic development. The graph plots percentage of viability in each condition, using two different RNA interference lines (*v101884* and *v40316*), with mean values representing three experiments. Error bars are s.d. The total numbers of counted individuals are the following: *phm-Gal4* > *UAS-GFP*, *n* > 1,000; *twi-Gal4* > *UAS-dsRNA-GstE14*, *n* > 1,000; *phm-Gal4* > *UAS-dsRNA-GstE14*, *n* = 624; *2-286-Gal4* > *UAS-dsRNA-GstE14*, *n* = 154 (see Supplementary Table 2 for further details).

RESULTS

GstE14 functions for ecdysone biosynthesis

To identify further regulators of epidermal differentiation, we conducted a genetic screen by systematically assaying a set of small deletions, each removing a molecularly defined genomic region and collectively representative of the whole second chromosome (approximately 30% of the genome; Supplementary Table 1). The Dusky-like (Dyl) Zona Pellucida protein provided a suitable readout, as it localizes in growing trichomes and is required for their formation²¹. Our screening identified a gene, *GstE14*, as an important player in trichome formation because its absence leads to a complete lack of Dyl staining (Supplementary Fig. 1). *GstE14* encodes an epsilon class glutathione *S*-transferase (Supplementary Fig. 2), an insect-specific enzyme that has not been studied yet in any species^{29,30}. We thus sought to analyse the developmental function of *GstE14* in more detail.

Unexpectedly, *GstE14* is not expressed in epidermal cells. Instead, *GstE14* messenger RNA accumulates in the ring gland from mid-embryogenesis, where it persists throughout larval stages (Fig. 1). The ring gland is an endocrine organ that produces ecdysone, the main steroid hormone in insects²⁴. Ecdysone is synthesized from cholesterol, through a series of enzymes including *Nvd* (refs 31,32), *Spo* (ref. 33), *Spok* (ref. 33), *Sro* (ref. 34), *Phm* (ref. 35), *Dib* (ref. 36) and *Sad* (ref. 37) (Fig. 2), all specifically expressed in the ring gland^{24,38}.

Inactivation of any of these genes leads to a characteristic phenotype, called Halloween because of poorly differentiated cuticle^{33,34,37,39-41}, as also manifest in embryos lacking *GstE14* (Figs 1b and 2a). These results therefore suggested that *GstE14* is involved in ecdysone synthesis, which we further investigated.

A main role for ecdysone is the timing of post-embryonic development, triggering larval moults and the larval-pupal transition²⁴. To investigate whether *GstE14* contributes to ecdysone function, we knocked down *GstE14* specifically in the ring gland (Supplementary Table 2). Reduced levels of *GstE14* lead to arrested development at larval stages (Fig. 1c). We observed larvae arrested at the transition from the second to the third instar (Fig. 1c), a phenotype characteristic of defective ecdysone signalling⁴². Finally, we found that treatment with ecdysone suppresses the embryonic lethality of *GstE14* mutants (Supplementary Fig. 3), therefore demonstrating that *GstE14* is required for ecdysone production.

Ecdysone triggers the differentiation of embryonic epidermal cells

Having established the role of *GstE14* in ecdysone synthesis, we next examined how compromised ecdysone production can explain the observed epidermal defects.

We found that the lack of *GstE14* prevents the expression of ecdysone-responsive genes in embryonic epidermal cells

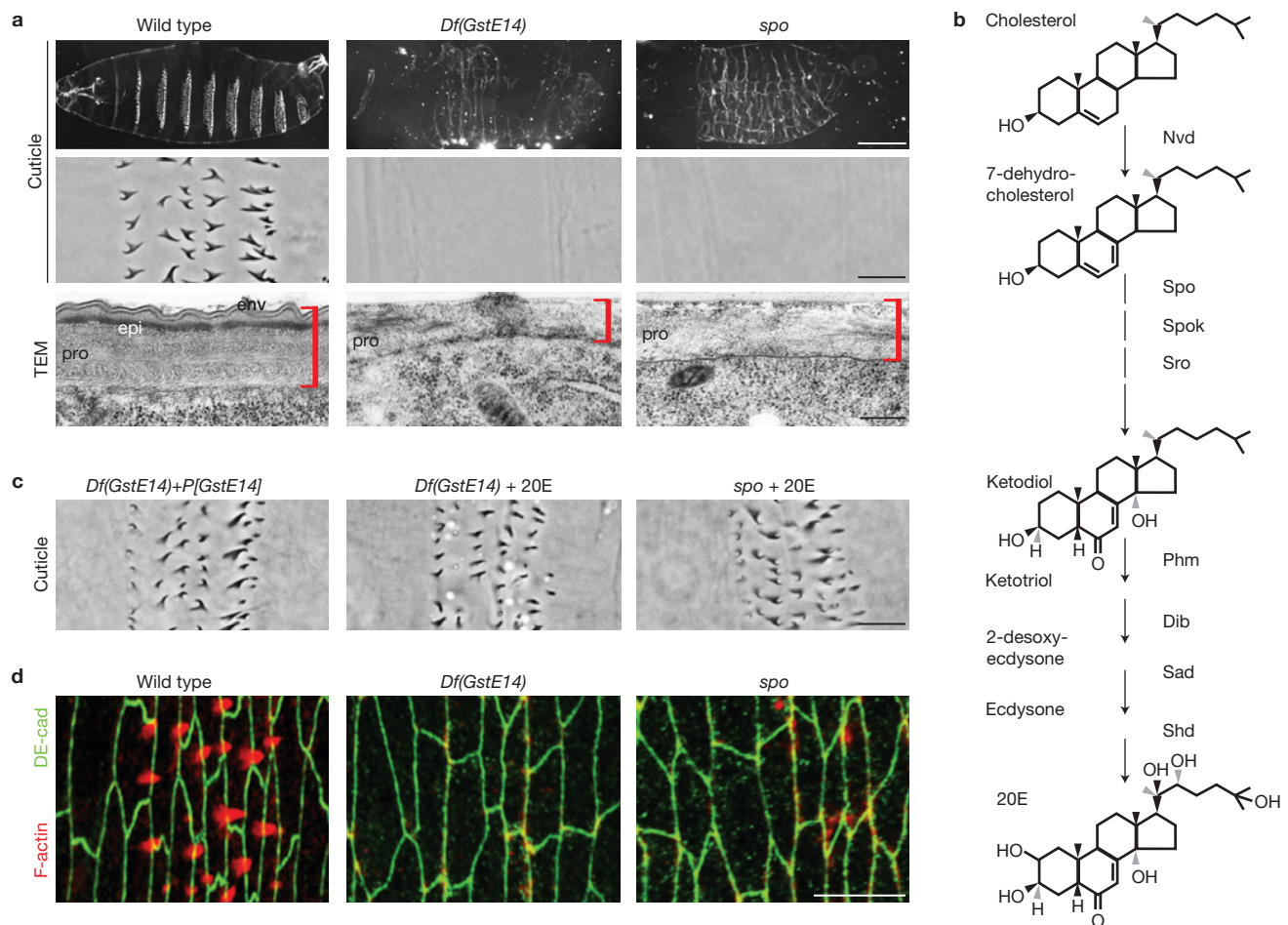


Figure 2 The ecdysone pathway controls epidermal differentiation. **(a)** Cuticle preparations of wild-type, *Df(2R)BSC272* (hereafter abbreviated *Df(GstE14)*) and *spook* (ref. 1) (*spo*) mutant embryos. The phenotype observed for *Df(GstE14)* is similar to that of *spo* mutants, as further supported by transmission electron microscopy (TEM), which shows strong defects in the epicuticle (epi) and envelope (env) layers, in both mutant backgrounds (scale bar, 500 nm). *Df(GstE14)* and *spo* mutant embryos also show a reduced and disorganized procuticle (pro), when compared with wild type. Red brackets highlight the whole cuticle compartment. Pictures show ventral views of larvae and ventral close-ups of A4 segments; scale bars are 100 μ m

and 10 μ m, respectively. **(b)** Scheme of ecdysone biosynthesis, showing intermediate products and known enzymes required for this pathway (adapted from ref. 34). **(c)** As observed following the introduction of the *P[GstE14]* rescuing construct in *Df(GstE14)* embryos, the lack of trichomes seen in *Df(GstE14)* and *spo* mutant embryos is compensated by incubation in 20E. Scale bar, 10 μ m. **(d)** Confocal microscopy images of the apical surface of trichome cells in stage-15 embryos. F-actin (red) bundles that support growing trichomes are absent from *Df(GstE14)* and *spo* mutant embryos; DE-cadherin (DE-cad) staining of cell junctions is in green. The scale bar represents 15 μ m.

(Supplementary Fig. 4). In addition, the inactivation of *GstE14* or known ecdysone synthesizing enzymes^{33,34,43}, for example *Spook* (*Spo*; Fig. 2b), leads to strong defects in epidermal differentiation, including the lack of trichomes (Fig. 2a). We next assayed whether incubating embryos with 20-hydroxyecdysone (20E), the active form of the hormone, could rescue these defects. 20E addition was sufficient to restore trichomes in embryos mutant for *GstE14* or *spo* (Fig. 2c). A similar rescue was observed (Supplementary Fig. 3) on incubation with ecdysone (for *GstE14* and *spo*) or with cholesterol (only for *GstE14*), showing that *GstE14* acts in the very first steps of ecdysone synthesis.

Although cuticle defects have been previously noticed for *Halloween* mutants^{31,33–37,39,41,43}, the precise role of ecdysone in epidermal differentiation remains unelucidated. For example, the lack of trichomes could be an indirect consequence of poorly differentiated cuticle⁴⁴ or defects in epithelial organization⁴⁵. To

discriminate between these possibilities, we examined the actin cytoskeleton and cell junctions in stage-15 embryos, that is before full cuticle deposition (Fig. 2d). Wild-type epidermis shows a regular alternation of large smooth cells, and rows of elongated cells forming actin protrusions that prefigure trichomes⁴⁵. Whereas epidermal cells showed unaffected junctions, the most striking defect observed in *GstE14* or *spo* mutant embryos was the lack of actin protrusions; instead, aberrant actin filaments co-localized with DE-cadherin in both mutants (Fig. 2d).

Hence, these data demonstrate that ecdysone is required for actin reorganization in embryonic epidermal cells, that is for the early steps of trichome cell remodelling.

Ecdysone regulates *pri* expression and thereby *Svb* maturation

Trichome development is governed by the *Svb* transcription factor, which defines the spatial pattern of trichomes^{13,14,16,17,46}.

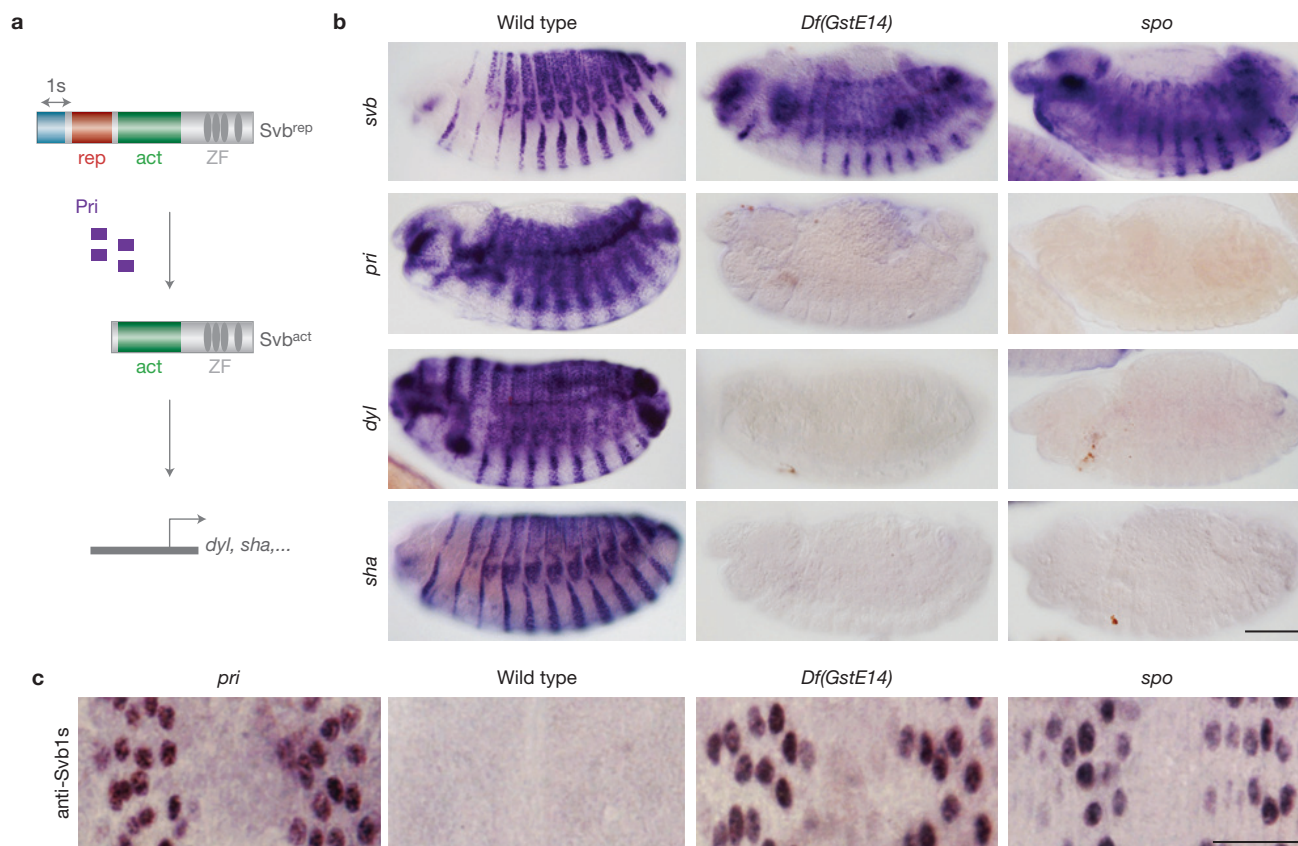


Figure 3 The ecdysone hormone is required for *pri* expression and Svb maturation in trichome cells. (a) *pri* encodes four small peptides that trigger a proteolytic maturation of the Svb transcription factor, switching its activity from a repressor to an activator. Activated Svb, in turn, triggers the expression of direct effectors of trichome formation, including *dyl* and *shavenoid* (*sha*). The red and green boxes schematize the repressor and activator protein regions, respectively. (b) Whole mount

in situ hybridization of *svb*, *pri*, *dyl* and *sha* mRNA in wild-type, *Df(GstE14)* and *spo* embryos (scale bar, 100 μ m). (c) Consistent with the decrease in *pri* mRNA levels that is observed in *Df(GstE14)* or *spo* mutant embryos, ecdysone is required for the proper maturation of Svb, as demonstrated by staining with anti-Svb1s, an antibody that specifically recognizes the long repressor form of Svb (a). Scale bar, 15 μ m.

Svb needs to be activated by a proteolytic release of its amino-terminal region, triggered by Pri peptides²². Once matured, Svb activates the transcription of various cell effectors^{18–20}, including *dyl* and *shavenoid* (*sha*) (Fig. 3a). To define at which step(s) the ecdysone pathway was required, we evaluated the consequences of the lack of 20E on the different players of trichome formation.

In situ hybridization revealed a striking reduction in *dyl* mRNA levels, in both *spo* and *GstE14* mutant embryos (Fig. 3b), consistent with the absence of protein staining (Supplementary Fig. 1). Furthermore, the absence of 20E also resulted in the downregulation of other Svb targets. For example, whereas *sha* mRNA is normally high in trichome cells, it is strongly reduced in *GstE14* or *spo* mutants (Fig. 3b). This general failure in the expression of Svb target genes was suggestive of impaired *svb* function. Significant amounts of *svb* mRNA, however, were detected in mutant embryos (Fig. 3b). In contrast, we found a strong decrease in *pri* mRNA levels in *GstE14* embryos, as well as in *spo* and *phantom* (*phm*) mutants (Fig. 3b and Supplementary Fig. 4a). These results show that ecdysone controls the expression of *pri*, suggesting that the lack of trichomes observed in the absence of 20E results from impaired activation of

the Svb protein, which relies on *pri* activity²². Indeed, whereas Svb is fully matured in stage-15 wild-type embryos, the repressor form of Svb persists and prevents target gene expression in *pri* mutants²². Similarly, the repressor form of Svb accumulates in *GstE14* and *spo* mutants (Fig. 3c), confirming a lack of *pri* function in the absence of 20E.

Taken together, these results indicate that ecdysone is a requisite for *pri* expression in the embryonic epidermis and, thereby, for trichome formation.

Pri expression in the epidermis is sufficient to overcome ecdysone depletion

Ecdysone regulates gene expression following binding to, and activation of, the nuclear ecdysone receptor^{47–49} (EcR). The maternal contribution, however, hampers analysis of EcR zygotic function during embryogenesis⁴³, and the requirement of EcR for oogenesis prevents generation of embryos lacking EcR activity⁵⁰. Because of these genetic limitations, we undertook a combination of assays to investigate the role of EcR for *pri* expression.

We found that EcRDN, an ecdysone-blind EcR variant that acts as a constitutive repressor⁵¹, was sufficient to repress *pri* expression

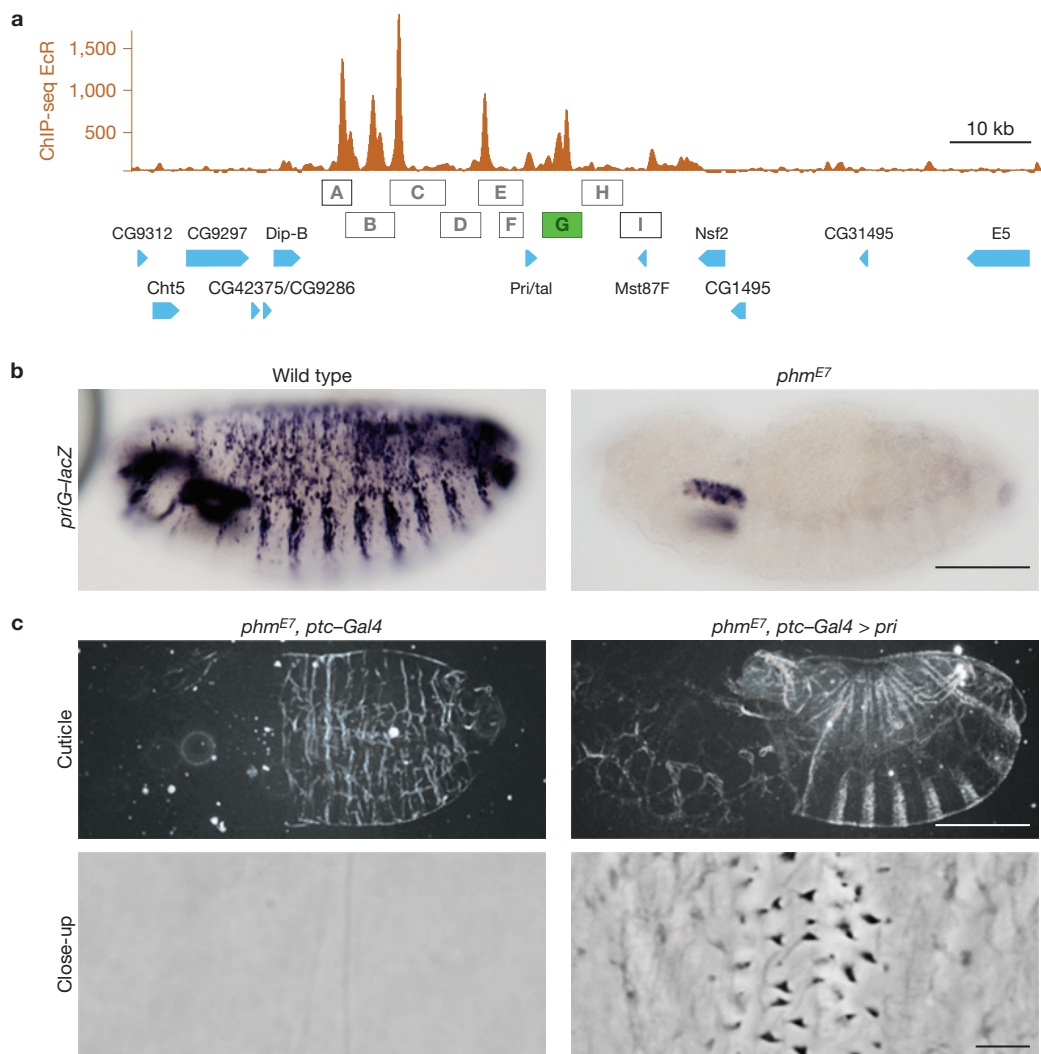


Figure 4 The ecdysone pathway drives epidermal remodelling through the regulation of *pri* transcription. **(a)** Representation of the *pri* genomic region, showing the intensity of ChIP-seq signal (arbitrary units, brown) for sequences bound by EcR. Providing internal control for specificity, EcR binding is restricted to regions flanking the *pri* transcriptional unit, when compared with neighbouring sequences. Similar EcR binding profiles are also seen for known direct targets of EcR, such as Hr46 and Blimp-1 (Supplementary Fig. 6a). Genes are drawn with blue arrows and boxes schematize genomic regions carried by transgenic *lacZ* reporter constructs. **(b)** The *pri-G-lacZ* construct

(green box in **a**) drives strong expression in the embryonic epidermis. Epidermal expression of *pri-G* is abolished in the absence of ecdysone, as observed in *phm^{E7}* mutant embryos. **(c)** Cuticle preparations showing the *phm* phenotype, characterized by a poorly differentiated cuticle and the absence of trichomes. Restoring *pri* expression in the epidermis, by means of *ptc-Gal4 > UAS-pri*, is sufficient for a significant rescue of trichome formation in the absence of ecdysone. Upper panels show lateral views of whole larvae and lower panels show ventral views of A4 segments. Scale bars are 100 μ m, except for cuticle close-ups, where it represents 15 μ m.

(Supplementary Fig. 5a). EcRDN provoked strong defects when expressed in the epidermis, including a thin cuticle and lack of trichomes. Similar defects were observed on expression of an enzyme that inactivates ecdysteroids⁵², indicating that both the hormone and its receptor are required in epidermal cells for trichome formation (Supplementary Fig. 5).

We then used genome-wide chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) to identify the set of EcR binding sites. We observed strong ChIP peaks at the *pri* locus, showing that EcR binds *in vivo* to presumptive *pri* cis-regulatory sequences (Fig. 4a). ChIP peaks were also detected in known direct targets of EcR, but not in later ecdysone-responsive genes that are not directly regulated by EcR (Supplementary Fig. 6a).

To assess the transcriptional properties of *pri* genomic regions, we generated a systematic series of β -galactosidase (*lacZ*) reporters, including all EcR-binding regions (Fig. 4a). This analysis identified an enhancer, *pri-G*, driving a strong expression that mimics the endogenous *pri* pattern in the embryonic epidermis (Fig. 4b). Further evidence supported that *pri* is under direct control of ecdysone signalling. First, *pri-G* contains *in vivo* binding sites for EcR (Fig. 4a). Second, the activity of *pri-G* requires ecdysone, as its expression was abolished in *phm* mutants (Fig. 4b). Finally, ecdysone is also required for *pri* expression in cultured cells, probably in an EcR-dependent manner, as we deduced from recent genome-wide data⁵³.

Collectively, these data suggested that, on 20E binding, EcR directly activates *pri* transcription, thereby inducing Svb maturation

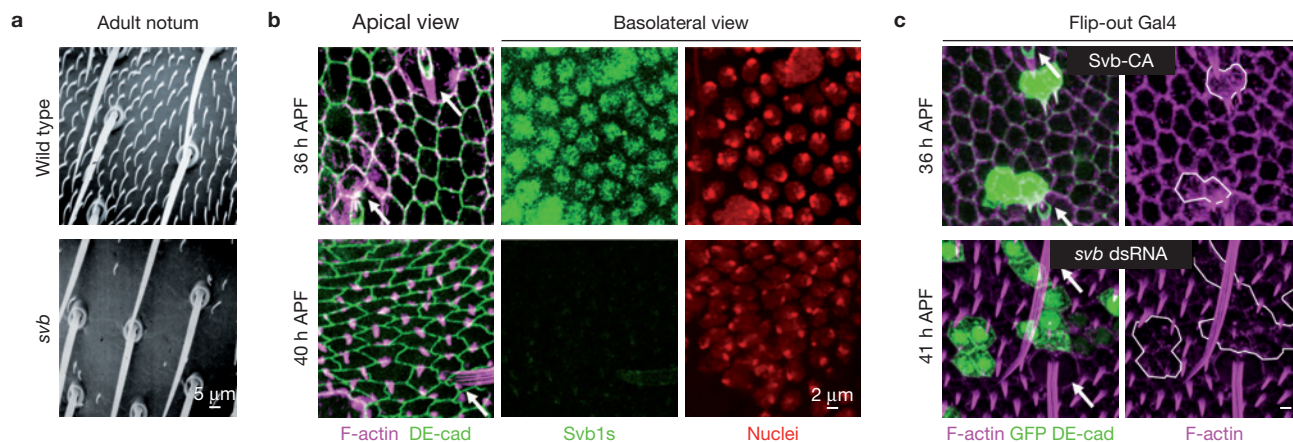


Figure 5 *Svb* specifies the differentiation of trichomes in the pupal notum. (a) Scanning electron micrographs of adult notum in wild type (top) and *svb* mutant (bottom). (b) Confocal microscopy pictures of presumptive adult epidermal cells at different times of differentiation APF. Left panels show apical views of pupal cells stained for F-actin (magenta) and DE-cadherin (green). Whereas at 36 h APF (top) microfilaments are mainly associated with cell junctions, growing trichomes are easily visible from 40 h APF, when F-actin bundles accumulate at the posterior vertex of each cell. In the meantime, basolateral optical sections show accumulation of the *Svb* repressor form, revealed by anti-*Svb1s* staining (green), in epidermal cell nuclei (red) at 36 h APF. Trichome formation coincides with the timing of

Svb maturation at 40 h APF (disappearance of anti-*Svb1s* signal). Sensory bristles are marked with white arrows. (c) Mosaic clones of cells labelled by GFP (green cytoplasm) co-stained for DE-cadherin (green cell contours) and F-actin (magenta). Upper panels show cell clones expressing *Svb-CA* at 36 h APF. In lower panels, clones of GFP-positive cells at 41 h APF express a dsRNA inactivating *Svb* function and thereby preventing trichome formation. White outlines in F-actin panels indicate the locations of manipulated cells. All pictures are shown with the anterior at the top, using the same magnification for each immunostaining panel. A typical experiment contains from five to ten notum samples. Each experiment has been reproduced at least three times.

in epidermal cells. This model predicts that restoring *pri* expression should compensate for impaired ecdysone signalling, a hypothesis we tested experimentally. Indeed, the re-expression of *pri* in *phm* mutant embryos was sufficient to restore cuticle differentiation and, notably, to rescue trichome formation (Fig. 4c).

These data thus establish that a main role of ecdysone signalling, in epidermal cells, is mediated by the control of *pri* expression.

Pri times the expression of trichome effectors

Given the key role of ecdysone in developmental timing²⁴, we next tested whether *Pri* peptides provide temporal control of the trichome program.

Whereas *Svb* starts accumulating as the long-form repressor in presumptive trichome cells at stage 11/12, the epidermal expression of *pri* is turned on later (stage 13/14), coinciding with *Svb* maturation and abutting the onset of effector expression (Supplementary Fig. 7). The dynamics of *pri* expression is thus consistent with a response to 20E (refs 49,54), as also supported by comparison with 20E-responsive genes (Supplementary Fig. 6b,c). If *pri* acted as a timing mediator, the trichome program should be paused without this signal, a prediction congruent with all alterations of the trichome gene network observed in the absence of *pri* (Fig. 3). Reciprocally, one would expect that the premature expression of *pri* should trigger a faster onset of the trichome program. To test this prediction, we forced early *pri* expression in dorsal cells and found that it is sufficient to induce premature expression of trichome effectors. This was probably due to precocious activation of *Svb*, as we observed similar results with a constitutively active form of *Svb* (*Svb-CA*) that behaves as a *pri*-independent activator (Supplementary Fig. 7).

Hence these results support a model whereby *pri* mediates 20E-dependent temporal control of trichome effector expression.

Pri is a temporal regulator of epidermal morphogenesis

To further test the notion that *pri* mediates the temporal control of epidermis development, we assayed its role in a later wave of epidermal differentiation that occurs for adult tissues. *Svb* is required for adult trichomes (Fig. 5a), and the inactivation of *Svb* embryonic targets also causes adult trichome defects (Supplementary Fig. 8). Focusing on the dorsal thorax (notum), we thus explored the timing of adult epidermal cell remodelling, which takes longer than embryogenesis and thus enables more detailed analyses of temporal hierarchies.

Whereas the differentiation of sensory organs is already seen at 30 h after puparium formation (APF), epidermal cells keep a smooth apical surface, with F-actin at cell junctions, as illustrated at 36 h APF (Fig. 5b). Trichome differentiation begins at 38–39 h APF, and actin-rich extensions are easily visible at 40 h APF (Fig. 5b). Interestingly, the formation of trichomes accurately coincides with the timing of *Svb* maturation. The uncleaved *Svb* repressor accumulated from early pupation to 36 h APF. The repressor form of *Svb* was no longer detected once cells developed apical extensions (Fig. 5b), whereas *svb* activity was cell-autonomously required for their formation (Fig. 5c).

These results argue that the trichome program is paused in notum cells until 38–39 h APF, through the repressor form of *Svb*. Hence, the expression of *pri* might provide a timing cue to turn on the trichome program in notum cells. We tested this hypothesis in a series of experiments. First, *in situ* hybridization revealed a strong but transient expression of *pri* throughout the notum at 40 h APF, whereas it was not detected at 36 h APF and was no longer seen at 44 h APF (Fig. 6a). It is worth noting that this time window matches the strongest peak of ecdysone throughout the life cycle^{23,55}. Second, young notum cells are competent for differentiating, as *Svb-CA* enabled the premature

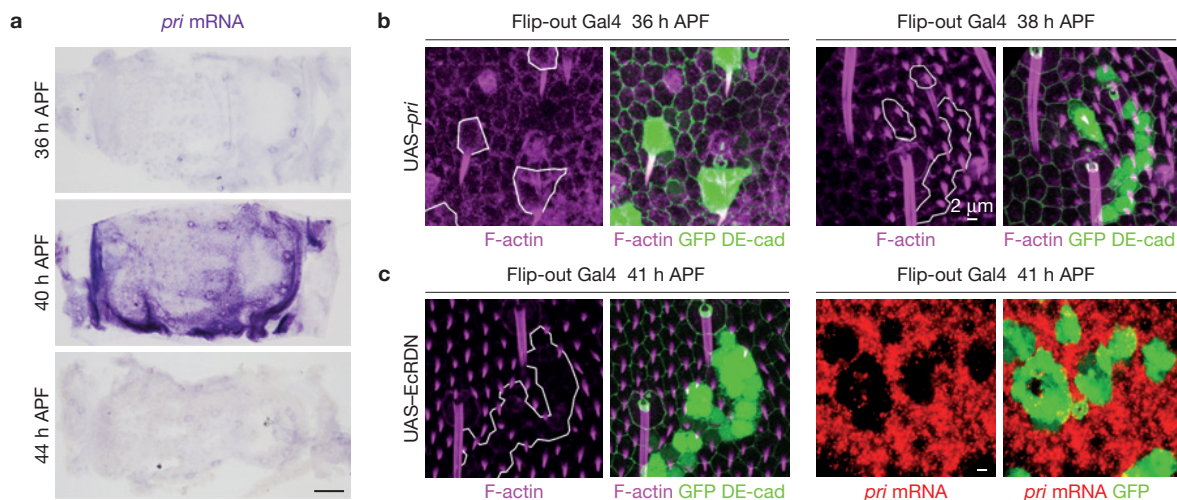


Figure 6 Pri mediates ecdysone-dependent temporal control of epidermal trichome differentiation. (a) *In situ* hybridization of whole notum dissected from wild-type pupae at different developmental times APF for *pri* mRNA (purple). Pri is transiently expressed in epidermal cells, in a time window that matches the timing of Svb maturation. Anterior is to the left; scale bar, 100 μm. (b) Premature expression of *pri* is sufficient to trigger the formation of ectopic trichomes in differentiating epidermal cells. Mosaic clones (*flpGal4* > *UAS-pri*) are visualized by cytoplasmic GFP (green), F-actin is in magenta and the cell contour is outlined by DE-cadherin (green). Left images show

individual cell clones and right panels larger clones. (c) Mosaic clones of cells expressing EcRDN are unable to produce trichomes (left panels; F-actin is in magenta; GFP and DE-cadherin are in green). As revealed by fluorescent *in situ* hybridization, this results from the inhibition of *pri* mRNA expression in GFP-positive cells that express EcRDN (green, in right panels). All pictures in **b,c** panels are oriented with the anterior at the top, using the same magnification. White outlines highlight the location of clones in F-actin panels. All experiments have been reproduced at least three times, with five to ten dissected samples of the same genotype per experiment.

formation of trichomes at 36 h APF (Fig. 5c). Third, we found that precocious expression of *pri* can force premature execution of the trichome program (Fig. 6b). Indeed, single cells that artificially express *pri* produce long precocious trichomes. In larger clones, *pri* also induces premature trichomes in neighbouring cells (Fig. 6b), a non-cell-autonomous effect consistent with previous observations^{9,11}. Therefore, manipulating *pri* expression is sufficient to trigger untimely trichome differentiation.

Next, we tested whether the timing of *pri* expression in the notum depends on ecdysone signalling. We found that expressing EcRDN in notum cells prevents trichome formation (Fig. 6c). As observed in embryos, this is likely to be due to the inhibition of *pri* expression, because we observed a strong decrease in *pri* levels in EcRDN cells when compared with their wild-type neighbours (Fig. 6c).

We therefore conclude that Pri peptides act to provide, at successive steps of development, tight temporal regulation to the transcriptional program of trichomes.

Ecdysone-dependent control of *pri* expression at developmental transitions

An important question was to determine whether or not this regulatory mechanism is generalizable to other *pri*-dependent processes, that is whether Pri peptides play a broader role in ecdysone control of developmental timing. To address this question, we focused on the transition that occurs between larval stages and pupation, the paradigm of ecdysone action in insects²⁴.

We observed marked temporal changes in whole-body levels of *pri* mRNA, which matched well with ecdysone dynamics (Fig. 7a,b). There is a sharp pulse of *pri* at 2–4 h APF, that is following a major ecdysone peak, and then a second wave of expression at 10–12 h

(Fig. 7a,b). Periodic pulses of *pri* expression were also manifest within individual tissues, for example in the leg imaginal disc, where *pri* regulates morphogenesis of adult tarsal segments^{9,10}. Following a weak pattern at mid-third-instar, *pri* expression shuts down in late larval leg discs. The expression of *pri* then bursts across a broader region of the disc at pupariation, and fades again at later stages (Fig. 7c). As in the epidermis, we found that *pri* expression is regulated by ecdysone in the leg primordium. *In vitro* incubation of larval discs with 20E further showed that ecdysone is sufficient to induce *pri* expression (Fig. 7c). Finally, the expression of EcRDN in post-embryonic tissues blocks metamorphosis⁵¹, and the co-expression of *pri* in these conditions is sufficient to rescue pupal lethality (Fig. 7d and Supplementary Table 4).

Taken together, these data show that the expression and function of *pri*, across embryonic and postembryonic development, rely on its temporally specific direct regulation by ecdysone.

CONCLUSIONS

Periodic pulses of steroid hormones orchestrate the timing of organism-wide developmental transitions^{23,24}, as is well illustrated by moulting cycles in invertebrates. The main steroid hormone in insects, ecdysone (20E), is synthesized from cholesterol through the action of seven P450 enzymes^{33–37,41} and a Rieske protein³¹. This work identifies an unexpected extra enzyme, GstE14, which similarly to other members of the pathway is specifically expressed in the ring gland. GstE14 might participate in either early stages of 20E synthesis³⁴ or cholesterol homeostasis^{56,57}. Indeed, silencing GstE14 alters cholesterol levels (Supplementary Fig. 3), and a mutant (*noppera-bo*) that inactivates GstE14 shows defects in cholesterol transport and metabolism⁵⁸. Importantly, the absence of GstE14 can be compensated

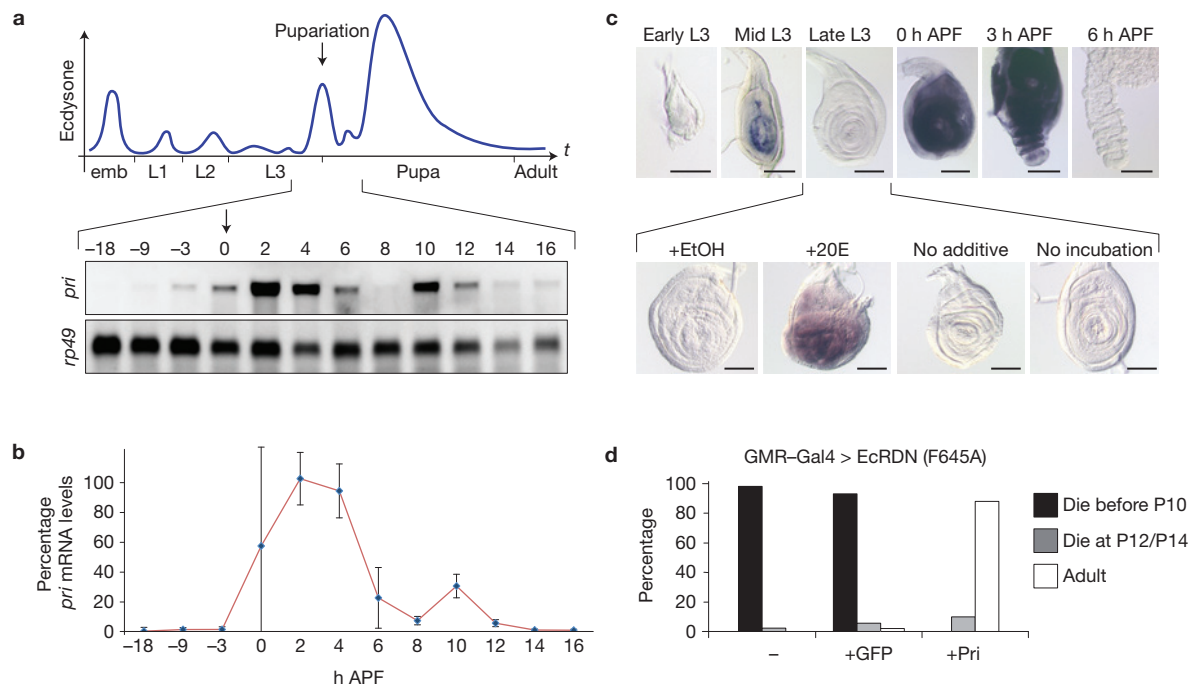


Figure 7 Ecdysone controls *pri* expression at the larval-pupal developmental transition. **(a)** Northern blot analysis of *pri* mRNA during prepupal stages in wild-type animals. A strong induction of *pri* expression is detected between 2 and 4 h APF, then a weaker peak appears at 10–12 h APF. *rp49*, encoding the ribosomal protein L32, is shown as a control. **(b)** Estimated relative levels of *pri* mRNA, as measured from three independent northern blot replicates. Error bars are s.d. **(c)** *In situ* hybridization shows dynamics of *pri* expression in leg discs at the onset of metamorphosis (upper panels). Lower panels show *in situ* hybridization of *pri* mRNA in late-third-instar larvae treated with 20E dissolved in ethanol. Discs with or without *in vitro* culture, or treated by ethanol only (EtOH), were used as controls. Scale bar, 100 μ m. **(d)** *pri* counteracts the lethality induced by EcRDN expression

during metamorphosis. UAS-EcRDN (a construct expressing EcR-B2 isoform with the F645A point mutation⁵¹) was driven in photoreceptor cells by glass multimer reporter (GMR)-Gal4, alone or in combination with UAS-GFP, for control, and in combination with UAS-Pri. Whereas EcRDN causes developmental arrest at prepupal-pupal transition, before stage 10 (P10), or later (stage P12–P14), the simultaneous expression of *pri* restores a large proportion of flies that reach adulthood. The total number of counted individuals are the following: *GMR-Gal4*, 3,035; *GMR-Gal4 > UAS-GFP*, 1,743; *GMR-Gal4 > UAS-pri*, 5,013. Similar results were obtained with each of two other EcR isoforms (EcR-A and EcR-B1) and dominant negative mutations (F645A and W650A). See Supplementary Table 4 for further information and data.

by feeding animals a high-cholesterol diet (Supplementary Fig. 3 and Table 2), showing the importance of the external milieu for the temporal regulation of development. Although decisive progress has been made on how ecdysone synchronizes whole-body development with varying environmental conditions^{24,27}, little is known about the mechanisms implementing this systemic control within developmental programs.

Our results unravel a scheme of interlocking molecular events explaining how ecdysone instructs the timing of trichome development, from reception of the hormone down to the terminal effectors of differentiation (Fig. 8). In response to ecdysone pulses, the EcR receptor directly activates the transcription of *pri*, providing a key temporal control on epidermis differentiation. Before the ecdysone signal, the whole transcriptional program that specifies trichome spatial patterning has been progressively assembled by hard-wired genetic interactions^{13,45}, but it is kept on hold through expression of the Svb repressor. Pri peptides thus time the conversion of Svb from a repressor to an activator²², which, in turn, triggers the onset of trichome effector expression¹⁸. The same mechanisms are used during embryogenesis and metamorphosis, showing how Pri peptides mediate temporal cues for the execution of a transcriptional program, at successive steps of development.

Interestingly, we find that *pri* can act at a distance, across several cells in the notum. It has been proposed that, probably owing to their tiny size (<1.3 kDa), Pri peptides can pass from one cell to another, to explain how clones of *pri* mutant cells are rescued by wild-type neighbours^{9,11}. Reciprocally, Pri peptides expressed at high levels within manipulated cells might pass into neighbouring cells, for example through gap junctions or cytoplasmic bridges^{59,60}. Although elucidating the underlying mechanism(s) will require further work, Pri diffusion could contribute to a robust temporal output, ensuring the synchronous differentiation of adjacent cells.

Beyond epidermal development, *pri* plays important roles in other tissues^{9–11,61,62}, for example for the formation of adult appendages^{8–10,61}. Our data show that *pri* expression in the leg primordium is also regulated in a timely manner by ecdysone signalling. On the organismic scale, there is a wide upregulation of *pri* levels at the larval-pupal transition, further extending the spectrum of *pri* in mediating response to ecdysone.

We propose that a major function of Pri peptides is to synchronize different genetic programs with the ecdysone-mediated systemic control of developmental timing. These data open new ways to explore the full range of developmental functions of Pri peptides,

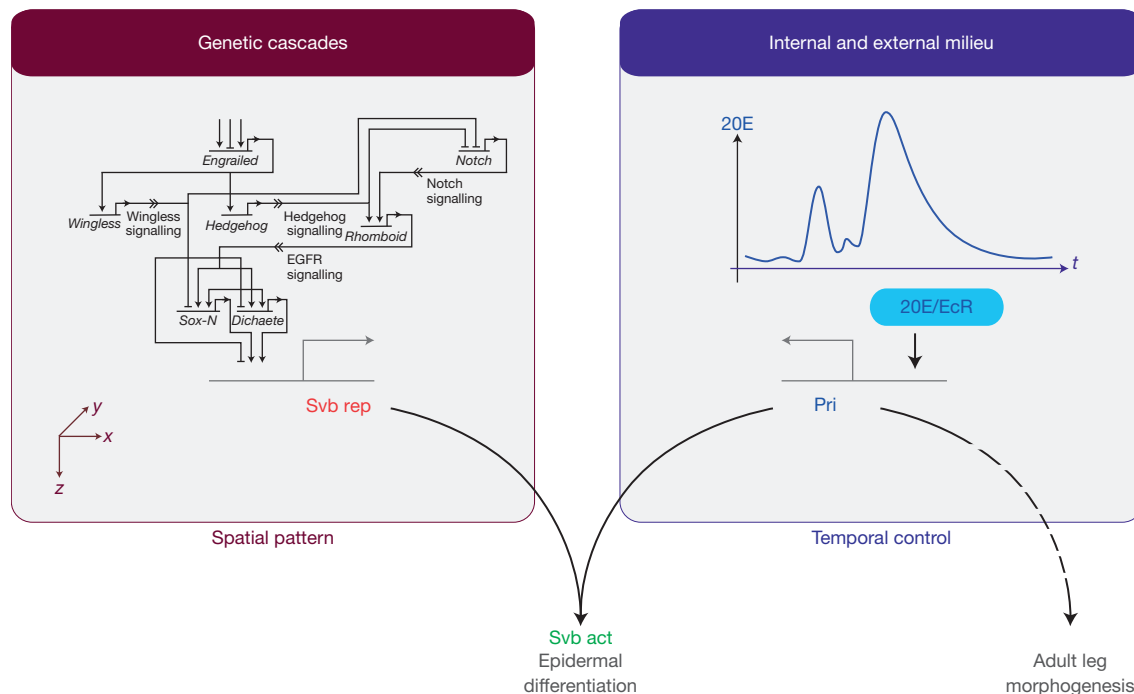


Figure 8 Role of *pri* in mediating the action of ecdysone for the temporal control of morphogenesis. *Svb* cis-regulatory regions integrate outputs from upstream transcriptional and cell signalling cascades to determine the subset of epidermal cells that have the potential to differentiate trichomes. The whole program of trichome formation is still paused by the accumulation of the *Svb* large-sized repressor. In response to both internal (whole-body development, tissue growth) and external inputs (nutrients, light), pulses in ecdysone levels promote EcR-dependent activation of *pri* expression. *Pri* peptides then induce the maturation of *Svb*, leading in turn to the direct transcriptional activation of *Svb* effectors and, thereby, to the morphological

differentiation of epidermal trichome cells. *Pri* thus constitutes a key mediator of ecdysone action for the temporal control of epidermal differentiation. In response to ecdysone, the expression of *pri* also pulses across extra tissues, at successive times throughout the larval–pupal transition. Temporal dynamics of *pri* mRNA includes a 20E-dependent strong burst within the adult leg primordium, where *pri* controls morphogenesis of tarsal segments. *Pri* peptides therefore provide a molecular framework to explain how systemic hormonal signalling implements the temporal execution of different hard-wired genetic programs, throughout embryonic and post-embryonic development.

as well as the mechanisms regulating the temporal control of development. □

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Note: Supplementary Information is available in the online version of the paper

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to FlyBase and the Bloomington, Vienna and Kyoto stock centres, as well as R. Niwa, M. Kamimura and J. Colombani for providing flies, and H. Bellen for bacterial artificial chromosome constructs. We thank B. Ronsin (Toulouse RIO Imaging) for help with microscopy and O. Bohner for technical assistance. We also thank A. Khila, A. Vincent, P. Leopold and E. France for critical reading of the manuscript, and are indebted to R. Niwa for sharing unpublished results. This work was supported by ANR (smORFpeptides and Chrononet), Association pour la Recherche sur le Cancer (12011669), Azm & Saade Association, JST PRESTO program, MEXT KAKENHI (21115007) and Fondation RITC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.K. and F.P. conceived and directed the project. Y.H. initiated the project and H.C.-D. carried out most experiments presented here. A.D., J.B., K.N., S.I., L.D., P.V. and C.P. conducted experiments and gave further helpful insights. H.C.-D., Y.H., A.P.-M., T.K., Y.L., R.S., B.M., S.K., K.P.W., S.P., Y.K. and F.P. designed the experiments, analysed data and contributed to data interpretation. H.C.-D., Y.H., Y.K. and F.P. prepared the figures and wrote the manuscript. All authors helped write and revise the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at www.nature.com/doi/10.1038/ncb3052

Reprints and permissions information is available online at www.nature.com/reprints

- Pauli, A., Rinn, J. L. & Schier, A. F. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 136–149 (2011).
- Uliitsky, I. & Bartel, D. P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* **154**, 26–46 (2013).
- Aspden, J. L. *et al.* Extensive translation of small ORFs revealed by Poly-Ribo-Seq. *eLife* e03528 (2014).
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
- Hanada, K. *et al.* Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 2395–2400 (2013).
- Magny, E. G. *et al.* Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. *Science* **341**, 1116–1120 (2013).
- Slavoff, S. A. *et al.* Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 59–64 (2013).
- Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M. & Tautz, D. A segmentation gene in *tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell* **126**, 559–569 (2006).
- Galindo, M. I., Pueyo, J. I., Fouix, S., Bishop, S. A. & Couso, J. P. Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol.* **5**, e106 (2007).
- Pueyo, J. I. & Couso, J. P. The 11-amino acid long Tarsal-less peptides trigger a cell signal in *Drosophila* leg development. *Dev. Biol.* **324**, 192–201 (2008).
- Kondo, T. *et al.* Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat. Cell Biol.* **9**, 660–665 (2007).
- Chanut-Delalande, H., Ferrer, P., Payre, F. & Plaza, S. Effectors of tridimensional cell morphogenesis and their evolution. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 341–349 (2012).

13. Payre, F., Vincent, A. & Carreno, S. ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* **400**, 271–275 (1999).
14. Sucena, E., Delon, I., Jones, I., Payre, F. & Stern, D. L. Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies multiple cases of morphological parallelism. *Nature* **424**, 935–938 (2003).
15. Delon, I. & Payre, F. Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby. *Trends Genet.* **20**, 305–313 (2004).
16. McGregor, A. P. *et al.* Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene. *Nature* **448**, 587–590 (2007).
17. Frankel, N. *et al.* Morphological evolution caused by many subtle-effect substitutions in regulatory DNA. *Nature* **474**, 598–603 (2011).
18. Menoret, D. *et al.* Genome-wide analyses of Shavenbaby target genes reveals distinct features of enhancer organization. *Gen. Biol.* **14**, R86 (2013).
19. Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F. & Plaza, S. Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. *PLoS Biol.* **4**, e290 (2006).
20. Andrew, D. J. & Baker, B. S. Expression of the Drosophila secreted cuticle protein 73 (dsc73) requires Shavenbaby. *Dev. Dyn.* **237**, 1198–1206 (2008).
21. Fernandes, I. *et al.* Zona pellucida domain proteins remodel the apical compartment for localized cell shape changes. *Dev. Cell* **18**, 64–76 (2010).
22. Kondo, T. *et al.* Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila embryogenesis. *Science* **329**, 336–339 (2010).
23. Thummel, C. S. Molecular mechanisms of developmental timing in C. elegans and Drosophila. *Dev. Cell* **1**, 453–465 (2001).
24. Yamanaka, N., Rewitz, K. F. & O'Connor, M. B. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from Drosophila research. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 497–516 (2013).
25. Delanoue, R., Slaidina, M. & Leopold, P. The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in Drosophila fat cells. *Dev. Cell* **18**, 1012–1021 (2010).
26. Colombani, J. *et al.* Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in Drosophila. *Science* **310**, 667–670 (2005).
27. Andersen, D. S., Colombani, J. & Leopold, P. Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends Cell Biol.* **23**, 336–344 (2013).
28. Yamanaka, N. *et al.* Neuroendocrine control of Drosophila larval light preference. *Science* **341**, 1113–1116 (2013).
29. Saisawang, C., Wongsantichon, J. & Ketterman, A. J. A preliminary characterization of the cytosolic glutathione transferase proteome from Drosophila melanogaster. *Biochem. J.* **442**, 181–190 (2012).
30. Board, P. G. & Menon, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3267–3288 (2013).
31. Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H. & Niwa, R. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* **133**, 2565–2574 (2006).
32. Yoshiyama-Yanagawa, T. *et al.* The conserved Rieske oxygenase DAF-36/ Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 25756–25762 (2011).
33. Ono, H. *et al.* Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.* **298**, 555–570 (2006).
34. Niwa, R. *et al.* Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the 'Black Box' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development* **137**, 1991–1999 (2010).
35. Warren, J. T. *et al.* Phantom encodes the 25-hydroxylase of Drosophila melanogaster and Bombyx mori: A P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 991–1010 (2004).
36. Chavez, V. M. *et al.* The Drosophila disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* **127**, 4115–4126 (2000).
37. Petryk, A. *et al.* Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 13773–13778 (2003).
38. Huang, X., Warren, J. T. & Gilbert, L. I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J. Genet. Genomics* **35**, 1–10 (2008).
39. Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E. & Kluding, H. Mutations affecting the pattern of larval cuticle in Drosophila melanogaster. I. zygotic loci on the second chromosome. *Roux Arch. Dev. Biol.* **193**, 267–282 (1984).
40. Rewitz, K. F., O'Connor, M. B. & Gilbert, L. I. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 741–753 (2007).
41. Warren, J. T. *et al.* Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11043–11048 (2002).
42. Talamillo, A. *et al.* Scavenger receptors mediate the role of SUMO and Ftz-f1 in Drosophila steroidogenesis. *PLoS Genet.* **9**, e1003473 (2013).
43. Chavoshi, T. H., Moussian, B. & Uv, A. Tissue-autonomous EcR functions are required for concurrent organ morphogenesis in the Drosophila embryo. *Mech. Dev.* **127**, 308–319 (2010).
44. Moussian, B. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 363–375 (2010).
45. Payre, F. Genetic control of epidermis differentiation in Drosophila. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 207–215 (2004).
46. Frankel, N. *et al.* Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* **466**, 490–493 (2010).
47. Koelle, M. R. *et al.* The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59–77 (1991).
48. Yao, T. P. *et al.* Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**, 476–479 (1993).
49. Ruaud, A. F., Lam, G. & Thummel, C. S. The Drosophila nuclear receptors DHR3 and β FTZ-F1 control overlapping developmental responses in late embryos. *Development* **137**, 123–131 (2010).
50. Carney, G. E. & Bender, M. The Drosophila ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* **154**, 1203–1211 (2000).
51. Cherbas, L., Hu, X., Zhimulev, I., Belyaeva, E. & Cherbas, P. EcR isoforms in Drosophila: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue. *Development* **130**, 271–284 (2003).
52. Kamimura, M. *et al.* Fungal ecdysteroid-22-oxidase, a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. *J. Biol. Chem.* **287**, 16488–16498 (2012).
53. Shlyueva, D. *et al.* Hormone-responsive enhancer-activity maps reveal predictive motifs, indirect repression, and targeting of closed chromatin. *Mol. Cell* **54**, 180–192 (2014).
54. Kozlova, T. & Thummel, C. S. Essential roles for ecdysone signaling during Drosophila mid-embryonic development. *Science* **301**, 1911–1914 (2003).
55. Riddiford, L. M. in *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. Martinez-Arias, M. B.a.A.) 899–939 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993).
56. Fluegel, M. L., Parker, T. J. & Pallanck, L. J. Mutations of a Drosophila NPC1 gene confer sterol and ecdysone metabolic defects. *Genetics* **172**, 185–196 (2006).
57. Horner, M. A. *et al.* The Drosophila DHR96 nuclear receptor binds cholesterol and regulates cholesterol homeostasis. *Genes Dev.* **23**, 2711–2716 (2009).
58. Enya, S. *et al.* A Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in Drosophila. *Sci. Rep.* **4**, 6586 (2014).
59. Poodry, C. A. & Schneiderman, H. A. The ultrastructure of the developing leg of Drosophila melanogaster. *Roux Arch. Dev. Biol.* **166**, 1–44 (1970).
60. McLean, P. F. & Cooley, L. Protein equilibration through somatic ring canals in Drosophila. *Science* **340**, 1445–1447 (2013).
61. Pueyo, J. I. & Couso, J. P. Tarsal-less peptides control Notch signalling through the Shavenbaby transcription factor. *Dev. Biol.* **355**, 183–193 (2011).
62. Pi, H. *et al.* Identification of 11-amino acid peptides that disrupt Notch-mediated processes in Drosophila. *J. Biomed. Sci.* **18**, 42 (2011).

METHODS

Fly stocks and clonal analysis. Deficiency lines (Supplementary Table 1) were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Extra strains were *spo11/TM3,Dfd-YFP*, *phm[E7]/FM7a,Dfd-YFP* (YFP, yellow fluorescent protein), *UAS-EcRDN (EcR-A-F645A; EcR-A-W650A; EcR-B1-F645A; EcR-B1-W650A; EcR-B2-F645A; EcR-B2-W650A)* (ref. 51), *UAS-E22oxidase* (ref. 52), *Ptc-Gal4*, *pnr-Gal4*, *e22C-gal4*, *GMR-Gal4*, *UAS-svbCA* (ref. 63), *UAS-pri* (ref. 11) and *UAS-dsRNA-svb*, *UAS-dsRNA-GstE14 (v40316 and v101884*, Vienna Drosophila RNAi Center, <http://stockcenter.vdrc.at/>). To knock down *GstE14* in specific tissues, *UAS-dsRNA-GstE14* lines were crossed with *phm-Gal4*, *2-286-Gal4*, *P0206-Gal4* or *twi-Gal4* drivers. To ensure development in controlled conditions of larval density, 30 eggs were placed into food tubes, with yeast paste supplemented or not with 100 µg ml⁻¹ of cholesterol. For mosaic clones of Gal4-expressing cells in the thorax, *hs-flp; actin γ + γ $Gal4$; UAS-GFP* flies were crossed with *UAS* lines and larvae heat shocked for 30 min at 37 °C, 8 h before puparium formation.

Screening procedure. Deficiency lines from the Bloomington Drosophila Stock Center were balanced over a *CyO-wg-LacZ* chromosome to genotype embryos. Eggs were collected overnight at 25 °C. To facilitate screening, embryos from 24 strains were treated simultaneously using the Fly Condo device (Flystuff). Embryos were dechorionated by bleach treatment, fixed in heptane saturated in formaldehyde for 40 min and subsequently devitellinized with heptane/methanol. Embryos were kept in methanol before immunostaining. Anti-Dyl immunostaining was processed in parallel for 22 samples at once, using a homemade device and standard procedures. Revelation was carried out with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma), supplemented with nickel.

DNA constructs. The rescue construct for *GstE14* was obtained by PCR amplification of a 4.6-kilobase (kb) genomic DNA fragment, subsequently cloned into the pAttB transformation vector. LacZ reporter constructs were produced by cloning 5–6 kb DNA fragments of the *pri* genomic region into the pAttB-LacZ (ref. 18) reporter vector. All constructs were verified by sequencing. Transgenic lines, including bacterial artificial chromosome constructs (from P[acman] Resources, <http://www.pacmanfly.org/>), were generated using the PhiC31 system and inserted at the 86F position (BestGene). Further details are provided in Supplementary Table 3.

ChIP-seq experiments. EcR ChIP-seq data were generated by the modENCODE consortium and were extracted from the modMine pipeline (<http://intermine.modencode.org>). Although embryonic samples (7–10 h) gave low signal-to-noise ratio, we observed strong peaks for samples collected at pupal stages (5 h APF), well known for high ecdysone titres. Similar patterns of EcR binding were retrieved at later stages (33 h APF). The data have been submitted to the Gene Expression Omnibus. The accession number for combined ChIP-seq is GSM628268, and the input data are available at the accession numbers GSM628269 and GSM628270.

Embryo, larval and pupal staining. Homozygous embryos were identified by the lack of balancer chromosome (marked with GFP/YFP or LacZ). Sibling controls and mutant embryos were in all cases processed in the same batch; a typical collection includes more than 300 embryos in total. The staging of mutant embryos, subjected to *in situ* hybridization or immunohistochemistry, was determined according to the age of 2 h embryo collections. Staining was carried out as previously described²¹ using anti-Dyl (1:400), anti-Svb1s (1:3,000), anti-DE-cadherin (DCAD2, 1:100 from DSHB), AlexaFluor-488 or 555 secondary antibodies (1:1,000, Molecular Probes), biotinylated goat anti-rabbit (1:1,000, Vector Laboratories) and TRITC-phalloidin (Sigma). For anti-DE-cadherin staining, embryos were fixed for 5 min in 37% formaldehyde and devitellinized by hand. Digoxigenin (DIG)-labelled RNA antisense probes were synthesized *in vitro* from complementary DNA clones and processed for *in situ* hybridization as described¹⁹.

Staging of larvae was carried out as previously described⁶⁴. 20–30 adult flies were placed on *Drosophila* medium containing 0.05% bromophenol blue, and well-developed third instar larvae from their progeny were staged according to gut colour. White prepupae were collected and kept in humid vials until further processing for *in situ* hybridization or northern blot. Pupal thoraces were dissected in PBS-Tween 0.1%, fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde and processed for immunostaining or *in situ* hybridization⁶⁵. Each mosaic animal showed clones of mutant cells surrounded by wild-type neighbouring cells, providing excellent internal controls. A typical experiment contains five to ten dissected samples, of proper stage and genotype. Data have been collected in at least three independent experiments. Samples were imaged with a Nikon 90i fluorescent microscope or a Zeiss 710 confocal microscope.

Ecdysone and cholesterol treatment on embryos and cuticle preparation. Embryos collected from deficiency lines or individual mutants, placed over *CyO-Wg-LacZ* or *TM3-Dfd-LacZ* balancers, were processed for 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside staining for genotyping and cuticles were prepared in Hoyer's-lactic acid (1:1). For steroid rescuing assays, mutant chromosomes were balanced over *CyO-Dfd-YFP* or *TM3-Dfd-YFP*. Embryos were dechorionated and permeabilized with heptane for 5 min, then incubated with 25 mg ml⁻¹ of 20E, ecdysone or cholesterol (Sigma) diluted in Schneider's medium (Sigma) for 1 h, under mild agitation. Following incubation, embryos were covered with Voltalef oil and placed in a moisture chamber at 25 °C for further development. Mutant larvae were selected under a stereomicroscope equipped for epifluorescence and processed for cuticle preparation. Each rescue experiment has been carried out, independently, at least three times.

In vitro culture of leg imaginal discs and ecdysone treatment. Wandering mid-third-instar larvae were dissected in Schneider's medium and staged by salivary gland morphology as previously described⁶⁶. Dissected staged larvae without guts and ring glands were incubated at 22 °C for 17 h with rotation (198 r.p.m.), in 200 µl of Schneider's medium supplemented with 5 µM 20E (Sigma) dissolved in ethanol, or the corresponding amount of ethanol as a control. After incubation, samples were washed with Schneider's medium once and with PBS three times, fixed in 4% paraformaldehyde and subjected to *in situ* hybridization as described above.

Northern blot analysis. Whole-body RNA was isolated from staged animals using RNeasy (Qiagen) or Isogen (Nippon Gene). RNA was separated by formaldehyde-agarose gel electrophoresis and then transferred to a nylon membrane (Roche). Hybridization and wash procedures were carried out according to the DIG Application Manual (Roche). DIG-labelled *pri* probes¹¹ were reacted with an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) and visualized with chemiluminescence using CSPD (Tropix) or CPD-Star (Roche), and LAS-1000 or LAS 4000mini (GE Healthcare). For quantification, northern blots of three independent collections (five animals were of each staged sample) were quantified with LAS 4000mini and normalized by the co-electrophoresed internal control (5 pg of dsDNA plasmid including the *pri* probe region). Expression levels are represented as percentages of the maximum intensity, with mean values and standard deviations being plotted in the graph.

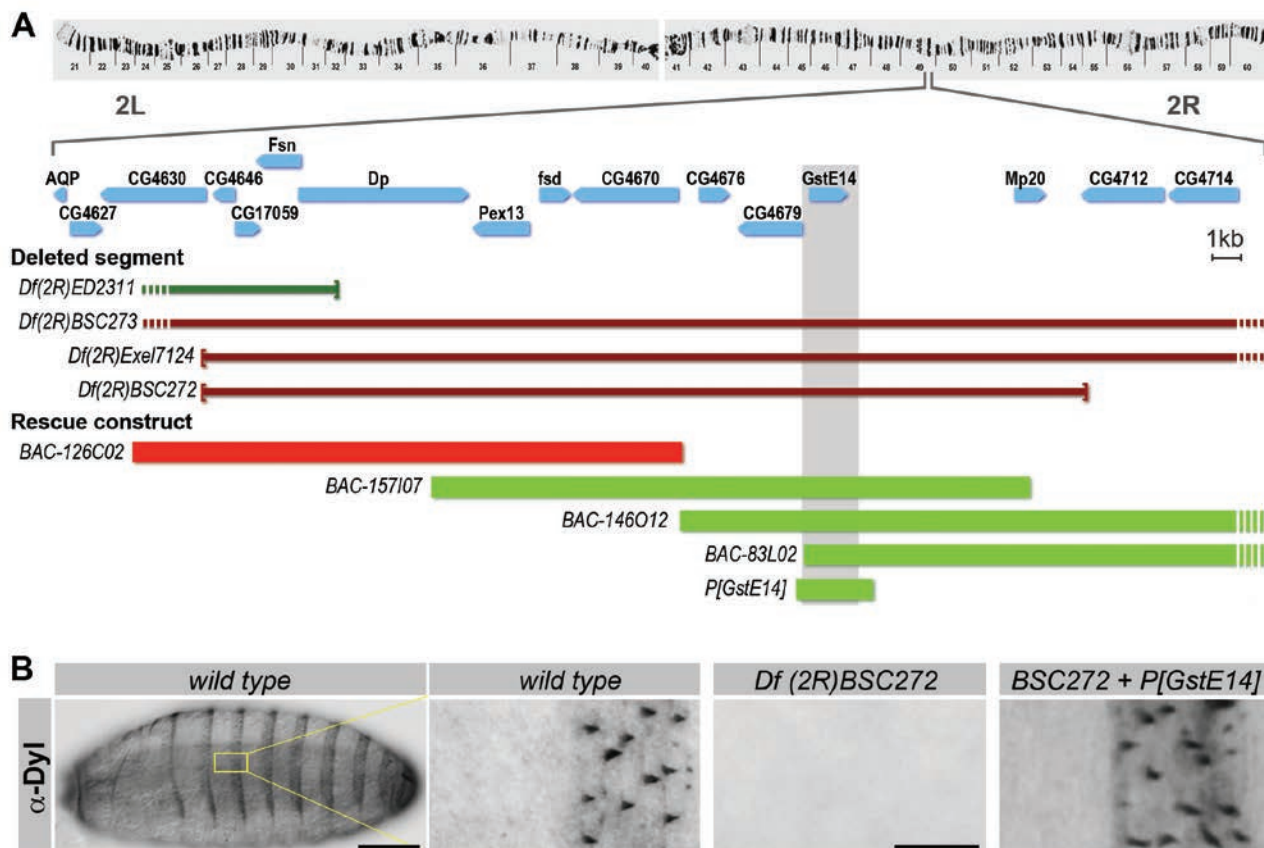
Transmission electron microscopy. Embryos were cryo-immobilized in a high-pressure freezer (Bal-Tec HPM 010, Balzers). Samples were transferred to 2% osmium tetroxide, 0.5% uranyl acetate and 0.5% glutaraldehyde in anhydrous acetone at -90 °C for 32 h at -60 °C and 4 h at -40 °C. After washing with acetone, samples were transferred into an acetone-EPON mixture at -30 °C (1:1 for 4 h, 1:2 for 12 h), warmed up to room temperature, infiltrated with EPON (three changes within 30 h) and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections (70 nm) were stained with 2% uranyl acetate in 70% methanol for 10 min, and in 0.4% lead citrate in 0.1 N NaOH for 2 min, and viewed in a Philips CM10 electron microscope at 60 kV.

Sterol quantification in embryos and larvae. Total cholesterol levels were determined using the Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen), as previously described^{36,57}. For each assay, we collected 100 embryos, either of wild-type or *Dfd(GstE14)* mutant genotype, the latter being selected by the lack of GFP-marked balancer. After washing, embryos were homogenized in 150 mM NaCl, 50 mM Tris at pH = 7.5, 2 mM EGTA, adjusted to a concentration of 100 mg ml⁻¹, and the homogenate was clarified by centrifugation at 2,700g for 5 min. Supernatant aliquots were used to assay sterol content according to the kit instructions and measured using a spectral fluorometer (Victor 3; Perkin Elmer), including a gradual series of cholesterol samples as internal standard. The same protocol was used for wild-type and *phm > UAS-dsRNA-GstE14* larvae, in this case with extracts prepared from 30 individuals aged for 4 days after egg laying. For each sample, sterol levels were expressed as percentages of matched wild-type levels. Experiments were repeated at least three times. Statistical analyses used nonparametric Mann-Whitney tests (two tailed).

Cholesterol diet assay. Parental rescue experiments were carried out using *Dfd(GstE14)/CyO-Dfd-YFP* adult flies fed for two days in tubes containing normal medium supplemented with 200 ng ml⁻¹ of cholesterol, as described³⁶. Then, fed flies were placed on agar plates to collect eggs. Homozygous individuals, selected from the absence of YFP, were transferred to culture tubes for the rest of development. *Dfd(GstE14)/CyO-Dfd-YFP* flies fed without cholesterol and *Spo/TM6b-Dfd-GFP* fed on high cholesterol were used as controls. The larval stages raised by rescued

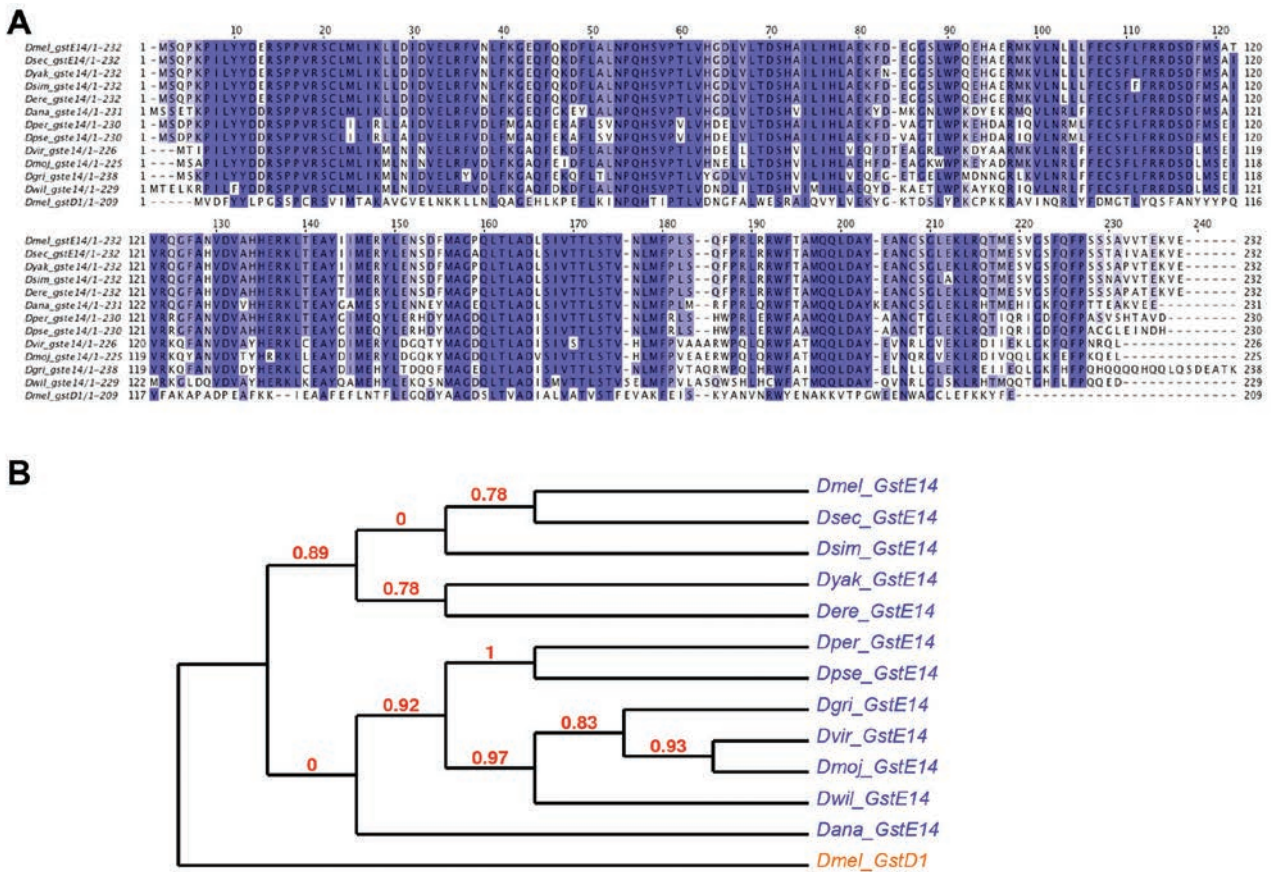
animals were determined according to the morphology of their mouth hooks. Experiments were repeated at least three times, and all data are reported as the mean with standard deviation. Statistical analyses used nonparametric Mann–Whitney tests (two tailed).

63. Delon, I., Chanut-Delalande, H. & Payre, F. The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **120**, 747–758 (2003).
64. Andres, A. J. & Thummel, C. S. Methods for quantitative analysis of transcription in larvae and prepupae. *Methods Cell Biol.* **44**, 565–573 (1994).
65. Founounou, N., Loyer, N. & Le Borgne, R. Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Dev. Cell* **24**, 242–255 (2013).
66. Dunne, J. C., Kondylis, V. & Rabouille, C. Ecdysone triggers the expression of Golgi genes in *Drosophila* imaginal discs via broad-complex. *Dev. Biol.* **245**, 172–186 (2002).



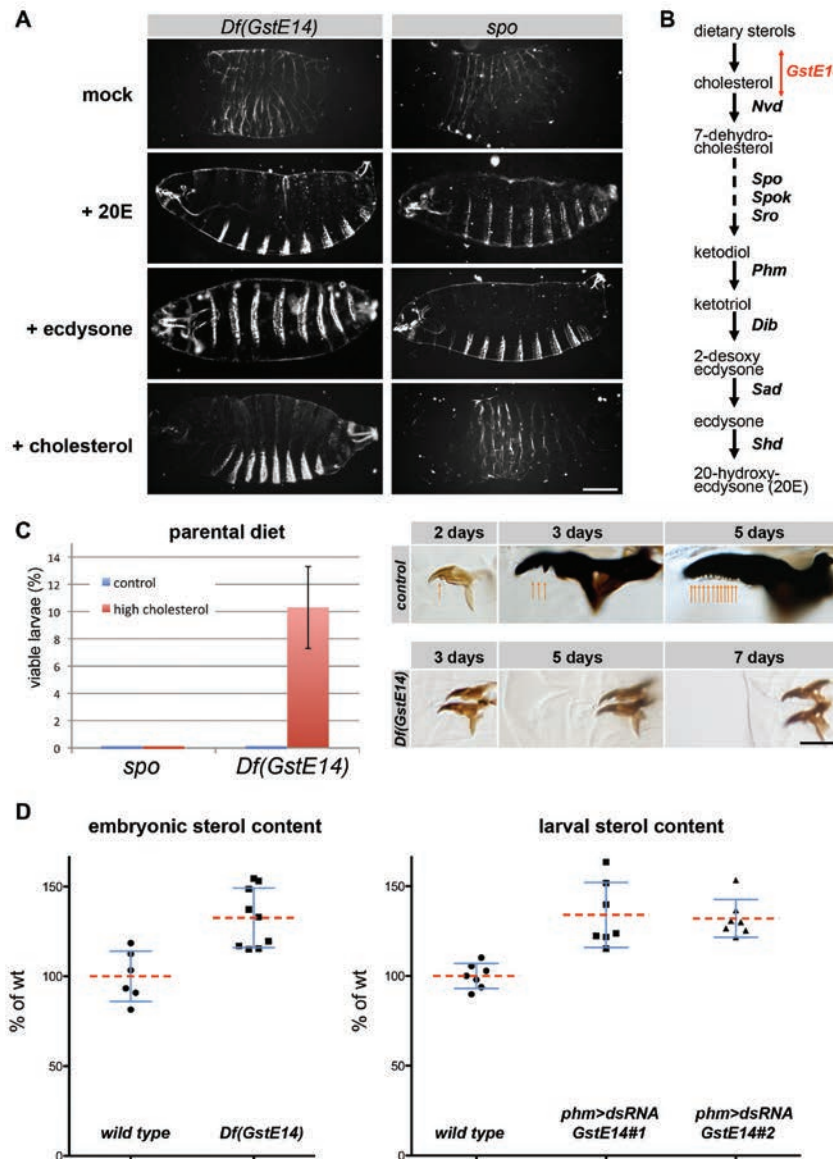
Supplementary Figure 1 *GstE14* is required for Dusky-like expression in trichome cells. **A**. Schematic representation of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*, focusing on the cytogenetic position 49F10-F13 and associated genes (blue arrows). From all lines we tested in this screen (see Supplementary Table 1), we observed a complete absence of Dyl staining only in the two overlapping deletions *Df(2R)BSC273* and *Df(2R)Exel7124* (dark red). A neighbouring deletion with unaffected Dyl expression (*Df(2R)ED2311*) is in dark green. A secondary screening with a smaller deficiency, *Df(2R)BSC272*, restricted the genetic interval to 9 genes. To identify the responsible gene(s), we generated a series of transgenic lines carrying BAC genomic constructs (see Supplementary Table 3) and assayed their rescuing

activity when reintroduced in the *Df(2R)BSC272* background. While *BAC-126C02* (red box) did not restore Dyl staining, *BAC-157I07*, *-146O12* and *-83L02* (light green boxes) fully rescued Dyl expression in *Df(2R)BSC272* embryos. Since the three latter regions share a single gene, *GstE14*, we generated a construct narrowed down to a 4.6kb DNA fragment encompassing only this locus (*P[GstE14]*). **B**. As observed for rescuing BACs, *P[GstE14]* was sufficient to fully rescue Dyl expression within trichomes, as seen in stage-15 embryos (ventral views). Of note, *P[GstE14]* also suppressed the embryonic lethality observed for homozygous *Df(2R)BSC272* mutants. Rescuing assays have been performed in at least three independent experiments. Scale bars are 100 μ m (whole embryo) and 20 μ m for closeup pictures.



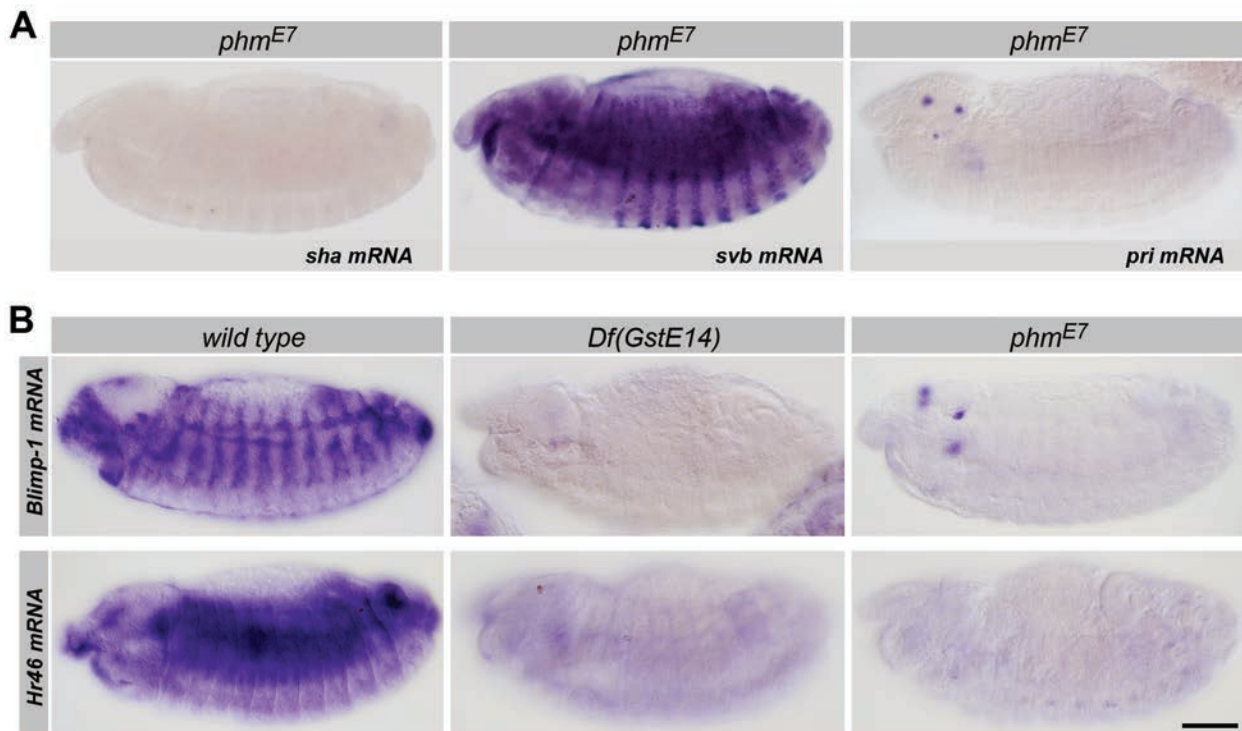
Supplementary Figure 2 *GstE14* encodes an insect-specific *Glutathione S transferase*. **A.** Alignment of GstE14 protein sequences across *Drosophila* species. *Dmel*, *Drosophila melanogaster*; *Dsec*, *Drosophila sechellia*; *Dyak*, *Drosophila yakuba*; *Dsim*, *Drosophila simulans*; *Dere*, *Drosophila erecta*; *Dana*, *Drosophila ananassae*; *Dper*, *Drosophila persimilis*; *Dpse*, *Drosophila pseudoobscura*; *Dvir*, *Drosophila virilis*; *Dmoj*, *Drosophila mojavensis*; *Dgri*, *Drosophila grimshawi*; *Dwil*, *Drosophila willistoni*. **B.** Cladogram

showing the distribution of *GstE14* sequences within *Drosophila* species. The *GstD1* protein from *Drosophila melanogaster* was introduced as outgroup. Protein sequences were extracted from flybase (<http://flybase.org>), multiple alignment, curation, phylogenetic tree reconstruction and rendering were processed using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>), and MUSCLE, Gblocks, PhyML, TreeDyn packages available at <http://www.phylogeny.fr>.



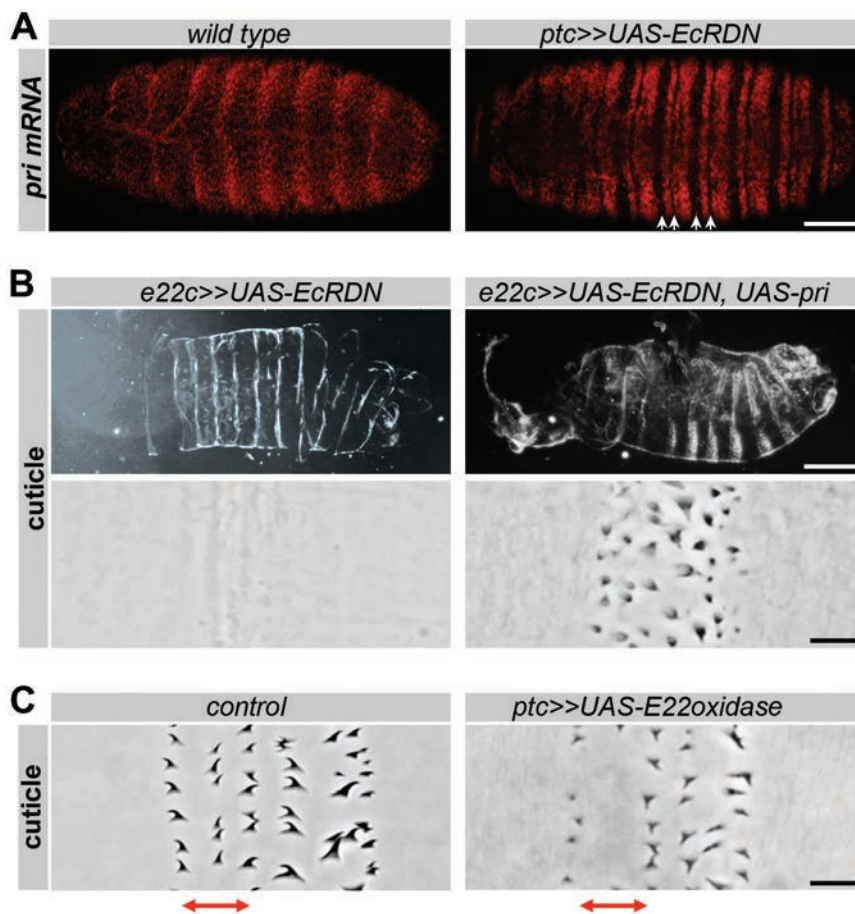
Supplementary Figure 3 *GstE14* functions in cholesterol metabolism. **A**. Cuticle preparation of *Df(GstE14)* and *spo* mutant embryos incubated in Schneider's medium supplemented with either 20E, ecdysone or cholesterol during mid-embryogenesis. Incubation with Schneider's medium alone (mock) was used as control. All three compounds significantly suppressed embryonic lethality, as well as rescued epidermal differentiation, *i.e.* cuticle differentiation and trichome formation, for *Df(GstE14)* mutants. In contrast, *spo* mutants were rescued by the exogenous addition only of 20E and ecdysone, but not by cholesterol, consistently with the documented requirement of *spo* activity for the transformation of 7-dehydro-cholesterol to ketodiol³³. Scale bar is 100 μ m. **B**. Schematic representation of the biosynthetic pathway leading to ecdysone production from dietary sterols. As deduced from rescuing experiments, *GstE14* activity is required for the very early stages of the pathway, since its lack can be rescued by cholesterol. **C**. High cholesterol diet of parental flies suppresses the embryonic lethality of *GstE14* mutants, allowing a dramatic increase in life span. *Df(GstE14)/CyoDfdYFP* and *spo/TM3DfdYFP* heterozygous flies were fed for two days with high cholesterol diet, or regular food medium for control, and transferred to egg collection devices. Parental high-cholesterol diet led to the survival of approx 10% of *Df(GstE14)* mutants, which hatched into viable L1 larvae. The experiments have been made four times independently. The total number of mutant embryos analyzed is 422

individuals for *GstE14* and >1000 for *spo*. Rescued larvae displayed no obvious morphological defects when compared to wild type larvae. Although these animals remained alive for several days (up to 7 days), they failed to proceed for pupariation, or even larval stage transitions, and instead remained long-lived L1 larvae as deduced from the examination of mouth hooks, a phenotypical marker of larval stages. Arrows highlight the number of mouth hook teeth in wild type, which displays a characteristic increase across larval stages. The chart plot means values, for three independent experiments. Errors bars are s.d., scale bar is 25 μ m. **D**. Inactivation of *GstE14* impinges on whole body cholesterol levels, both in embryos and in larvae. The sterol content of *Df(GstE14)* mutant embryos, and larvae driving *UAS-dsRNA-GstE14* (line #1: HMJ21555; line #2 v1018884) in the ring gland (*phm-Gal4*) was assessed using a commercial assay. When compared to wild type controls, *GstE14* embryos display higher levels of sterol (P value= 0.0028). The same was true for *phm>dsRNA-GstE14* larvae (P value = 0.0006), showing that *GstE14* activity in the ring gland is required for maintaining proper cholesterol levels. Extracts were made from hand-counted embryos or larvae, with 1 to 5 independent samples of the same genotype *per* experiment. All experiments have been repeated independently three times. The graph shows all data points. Statistical tests used two-tailed Mann Whitney tests, error bars are s.d. (blue), means are indicated by a red dotted line.



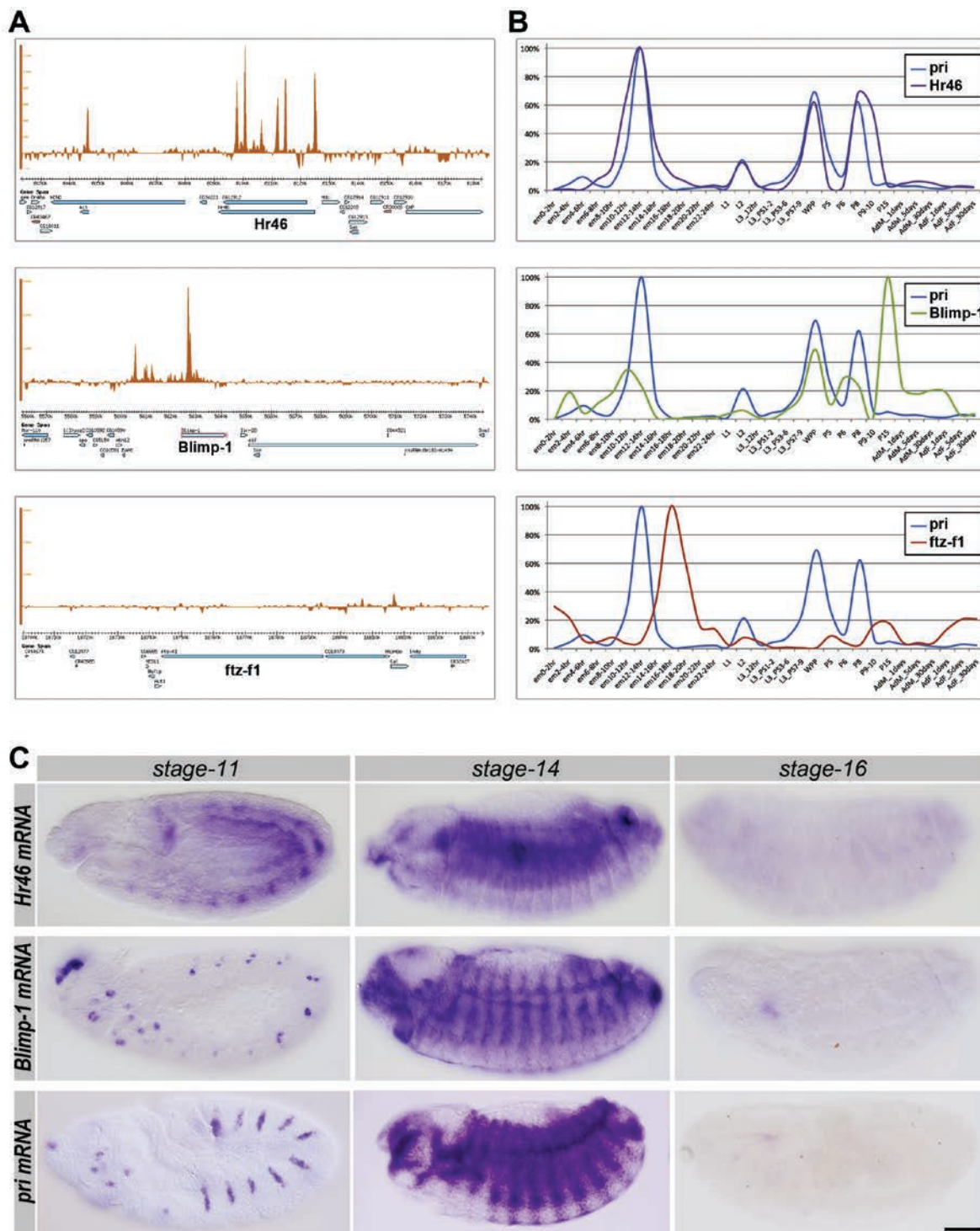
Supplementary Figure 4 Regulatory interactions within the ecdysone signalling pathway. **A.** *phm^{E7}* mutant embryos that are defective in 20E production (see Fig. 2B) show a strong down-regulation in the epidermal expression of *sha* and *pri* mRNAs. In contrast, *svb* mRNA remains expressed at normal-looking

levels in *phm^{E7}* mutants. **B.** *In situ* hybridization showing that *GstE14* activity is required for the embryonic expression of early ecdysone-responsive genes, such as *Blimp-1* and *Hr46*. These defects mimic the reduction of *Blimp-1* and *Hr46* expression observed in *phm^{E7}* mutant embryos. Scale bars are 100 μ m.



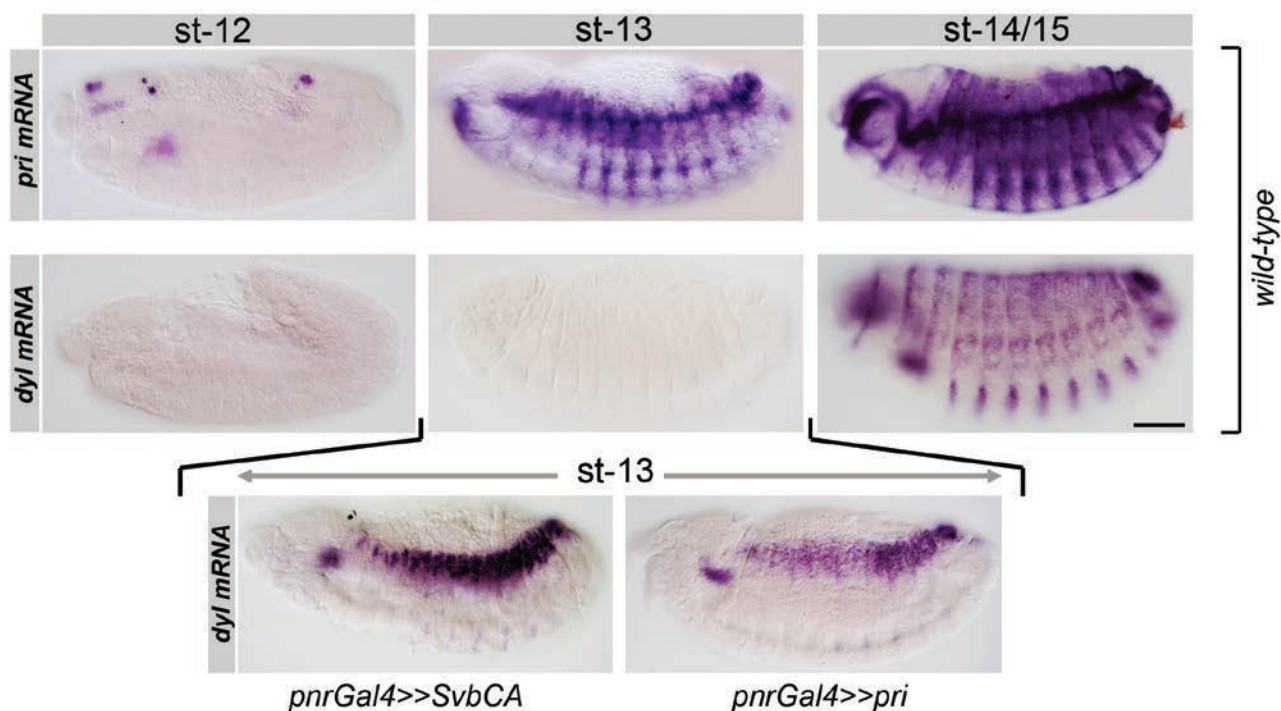
Supplementary Figure 5 Ecdysone signalling is required for trichome formation. **A.** Expression of EcRDN driven by *ptc-Gal4* in epidermal cells represses *pri* expression (right panel) compared to wild type embryos (left panel). White arrows highlight the reduction of *pri* expression in *ptc* cells. **B.** Cuticle of first instar larvae expressing EcRDN alone (left), or in combination with *pri* (right), throughout embryonic epidermal cells (using the *e22cGal4* driver). *Pri* over-expression allows a significant suppression

of EcRDN-induced epidermal defects, including the rescue of misshapen trichomes. Upper panels are lateral view of whole larvae, lower panels ventral views of A3-A4 segments. **C.** The enzymatic inactivation of ecdysone in epidermal cells, using *UAS-E22oxidase* driven by *ptc-Gal4*, prevents trichome formation in corresponding cells (red arrows). Scale bars are 100 μ m for pictures of whole embryos (A) and cuticles (B), and 10 μ m for higher magnification (B and C).



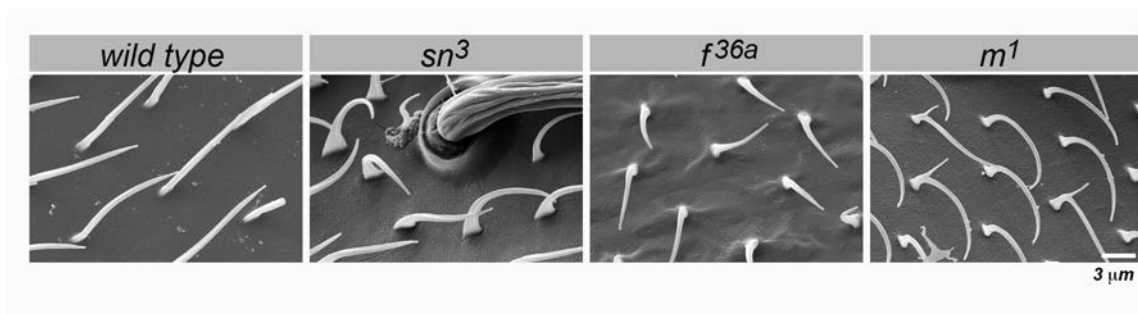
Supplementary Figure 6 *pri* is an early ecdysone-responsive gene. **A.** Snapshots of genomic regions encompassing the ecdysone-responsive genes *Hr46*, *Blimp-1* and *ftz-f1*, showing *in vivo* EcR binding events (4h APF) visualized by the intensity of ChIP-seq signal (brown). Genomic coordinates and gene position are indicated within an approx 150kb window. **B.** Dynamics of relative mRNA levels, extracted from modENCODE Temporal expression Data (mRNA-Seq). Throughout the *Drosophila* life cycle, *pri* displays temporal variations that strikingly parallels the ecdysone-responsive *Hr46* gene, and

correlates to a lesser extent to *Blimp-1*. In contrast, the temporal dynamics of *ftz-f1* mRNA levels appears clearly delayed, when compared to *pri* expression. **C.** *In situ* hybridization to *Hr46*, *Blimp-1* and *pri* mRNAs in wild type embryos, from stage-11 to stage-16. While their expression is restricted to a limited number of cell patches in early stages (stage-11), the three genes display a concomitant onset of their expression in embryonic epidermal cells at stage-14. Later on, the expression fades and only residual signal is detected at stage-16. All embryos are shown at the same magnification. Scale bar is 100 μ m.



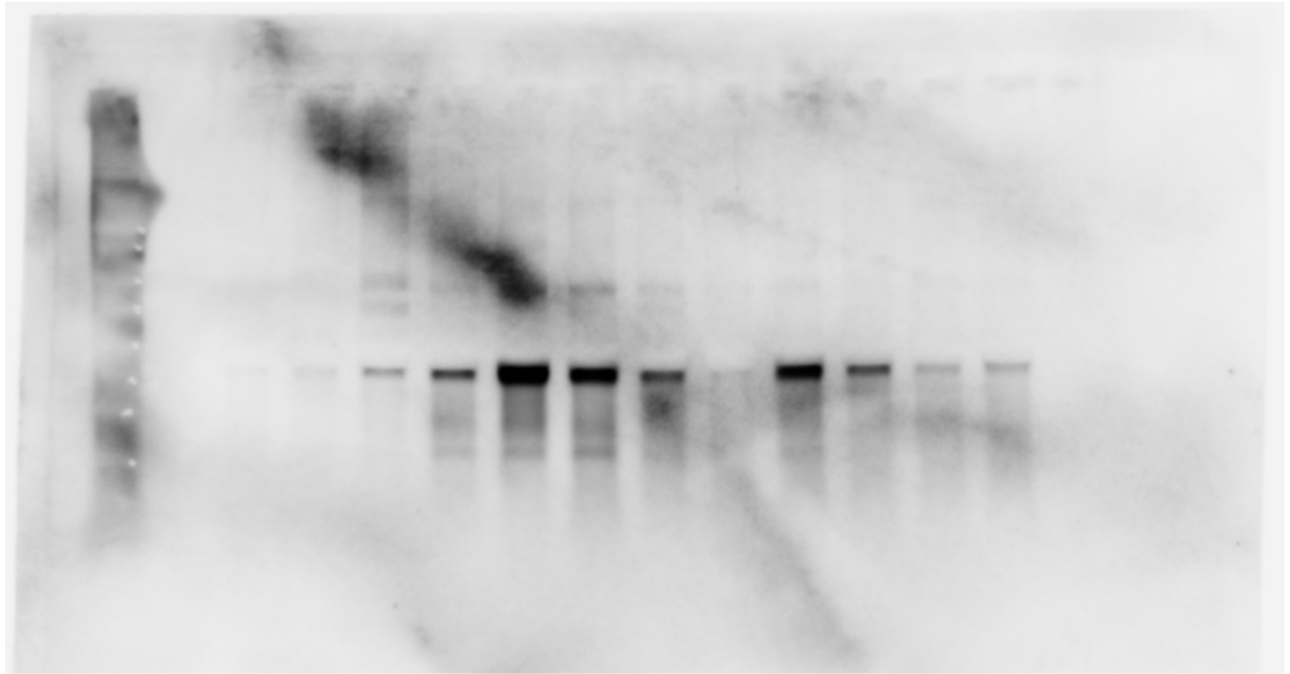
Supplementary Figure 7 Premature expression of trichome effectors during embryogenesis. *In situ* hybridization to *pri* and *dyl* mRNA show dynamics of their epidermal expression in wild type embryos, with an onset at stage-13 and stage-14/15, respectively. The precocious expression of *pri*, triggered by the early *pnr-Gal4* driver, induces premature *dyl* expression in *pnr* dorsal cells, showing that *pri* controls the temporal onset of trichome effectors in epidermal cells. Similar results were observed when driving a constitutively activated form of Svb (SvbCA), further demonstrating that *pri* expression normally times the onset of Svb activation, and thereby, the whole program of trichome formation. Of note, this artificial advance in the onset of trichome effector expression was nevertheless not sufficient

to induce premature trichomes, indicating that embryonic epidermal cells at stage-13 are yet not competent to engage morphological differentiation. Therefore, while Svb defines the spatial pattern and *pri* the temporal onset of epidermal trichomes, their formation can occur only once epidermal cells have reached a competent stage, likely relying on independent factors involved in the general differentiation of the embryonic epidermis. Such general factors known for their role in epidermal differentiation can include transcription factors (*e.g.*, Grh, Vri, Ribbon, Ttk, and/or Gata factors)⁴⁴, as well as regulators of apico-basal polarity, cell junctions, vesicle trafficking or secretion (reviewed in^{44,45}). All pictures are at the same magnification. Scale bar is 100 μ m.

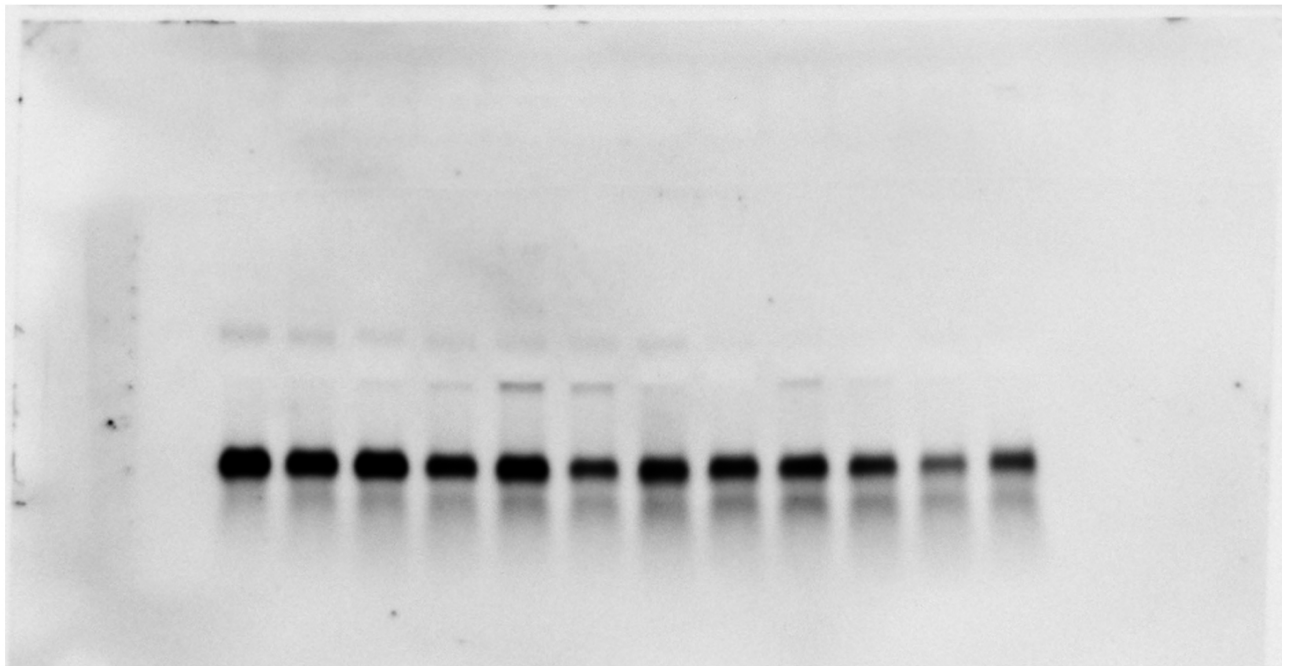


Supplementary Figure 8 Effectors of embryonic trichome formation are required for the differentiation of adult trichomes in the notum. Scanning Electron Micrographs of trichomes in the adult notum, showing consequences of the inactivation of three genes: *singed* (*sn*), *forked* (*f*) and

miniature (*m*), which are direct targets of the Svb transcription factor during embryonic epidermal differentiation^{19, 21}. When compared to wild type, the notum trichomes of *sn³*, *f^{36A}* and *m¹* mutants display characteristic alterations of their shape and improper organization. Scale bars are 3 μm.



pri mRNA



rp49 mRNA -18h -9h -3h 0 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h

Supplementary Figure 9 Full scans.

Supplementary Table Legends

Supplementary Table 1 List of tested deficiencies. For each line carrying a small deletion on chromosome II, the table indicates the stock ID number at the Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University (<http://flystocks.bio.indiana.edu>), as well as detailed genotype, cytolocation and molecular breakpoints when available. Additional information for each line is available at Flybase (<http://flybase.org>).

Supplementary Table 2 *GstE14* is required in the ring gland for survival and developmental transitions. Gal4 drivers were used to target expression of *UAS-dsRNA-GstE14* to specific tissues/cells. Tissue specificity is indicated for each driver line. The ring gland endocrine centre is functionally subdivided into the Corpus Cardiacum, Corpus Allatum, and Prothoracic Gland, the latter being responsible for ecdysone secretion. *UAS-dsRNA* lines used in these experiments are indicated. The percentage of animals arrested at pupal stages, or eclosing in adults is calculated by dividing the number of rescued animals with the number of sibling animals that do not express RNAi. Each experiment has been independently repeated at least three times. All data has been pooled for each genotype, and values are expressed as percentage of the expected population (total number). N.D., not determined.

Supplementary Table 3 Transgenic and Bac constructs. Location of the genomic regions carried by transgenic reporters and BAC constructs, according to the fly genome (release FB2014_01, January 17th, 2014).

Supplementary Table 4 *pri* expression counteracts the lethality induced by EcR-DN expression during metamorphosis. GMR-Gal4 driven expression of each of the EcR isoform (EcB-A, EcR-B1 and EcR-B2), carrying one or the other Dominant Negative point mutation (F645A or W650A), induces lethality during pupariation and prevents the emergence of adults. The simultaneous expression of wild-type *pri* mRNA (*pri*), or of an artificial construct that expresses only the small-ORF1 of *pri* (ORF1) strongly suppresses pupal lethality. In contrast, a construct encoding *pri* mRNA with four point mutations frameshifting each of the four *pri* small ORF (1-4FS) is devoid of rescuing activity, as also observed when driving GFP (GFP) as a negative control. Raw data, percentage and a summary graph are presented in the table, including the data presented in Figure 7D. The table also contains data source for *pri* mRNA levels shown in Figure 7B.

III- Résumé de la publication

Le renouvellement des tissus endommagés par les agressions du milieu extérieur est primordial pour soutenir les fonctions vitales des organes. Chez l'adulte, le maintien de l'homéostasie est assuré par les cellules souches somatiques qui ont la capacité de se diviser et de se différencier pour remplacer les cellules endommagées, éliminées par apoptose. C'est le cas des tubules de Malpighi (TM) qui assurent chez la *Drosophila* les fonctions rénales. En effet, des observations récentes ont pu établir la présence de cellules souches rénales (CSR) dans la partie inférieure des TM capables de se diviser et de renouveler les cellules différenciées.

Mon projet de thèse est directement issu d'observations initialement réalisées par Dani Osman (travaillant alors dans le laboratoire de Bruno Lemaitre). Dani, lors de ses études sur l'intestin, a noté que plusieurs gènes cibles du facteur de transcription Shavenbaby (Svb), dont *miniature*, sont fortement exprimés dans le jabot. L'analyse de diverses lignées rapportrices fournies par notre laboratoire lui a permis de mettre en évidence que *svb* lui-même est accumulé dans plusieurs types cellulaires de l'intestin dont les cellules souches intestinales. Lors d'une visite à Toulouse, Dani et François ont observé que *svb* est aussi exprimé dans les CSR. Une collaboration a alors été entreprise, Dani et sa future étudiante de thèse Sandy Al Hayek (cotutelle franco-libanaise, François Payre-Dani Osman) analyserait la fonction de *svb* dans l'intestin tandis que le groupe de François Payre se consacrerait au système rénal. Je me suis donc intéressé à la caractérisation de la fonction *svb* au sein des CSR. Svb a initialement été impliqué dans la formation d'extensions apicales, « trichomes », dans les cellules épidermiques embryonnaires. L'étude des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans ce processus a permis de révéler que l'activité transcriptionnelle de Svb est modifiée par la présence de petits peptides smORF, appelés Pri et codés par le gène *polished-rice* dont l'expression est régulée par l'ecdysone, une hormone stéroïdienne. En se fixant sur la E3 ubiquitine ligase Ubr3, les peptides Pri induisent la dégradation partielle de Svb de manière dépendante à Ubr3/protéasome, et sa conversion d'une forme de long répresseur à un court activateur transcriptionnel. Si l'expression de *svb* définit le registre spatial d'implantation des trichomes, les peptides Pri définissent la temporalité du processus en contrôlant la maturation de Svb.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que *svb* est spécifiquement exprimé dans les CSR et est nécessaire à leur maintien. Dans ces cellules, comme dans l'épiderme, la modification post-traductionnelle de Svb dépendante de Pri/Ubr3 est primordiale pour sa fonction. De façon inattendue, au regard de la fonction de Svb dans la morphogenèse épidermique, la fonction majeure de Svb dans les CSR est de les protéger de la mort cellulaire programmée. Svb semble être capable de contrôler directement la transcription du gène *DIAP1* codant pour une protéine anti-apoptotique. Pour ce faire, Svb doit interagir physiquement avec Yorkie (Yki), facteur nucléaire de la voie de signalisation Hippo bien connu pour contrôler la balance prolifération/apoptose. Mon travail a donc permis de révéler une nouvelle fonction du gène *svb* pour lutter contre l'apoptose, l'implication de *svb* dans la voie de signalisation Hippo ainsi qu'un mode de protection des cellules souches somatiques pour lutter contre l'apoptose.

IV- Manuscrit

1 Shavenbaby and Yorkie mediate Hippo signaling
2 to protect adult stem cells from apoptosis

3 Jérôme Bohère¹, Alexandra Mancheno-Ferris¹, Kohsuke Akino², Yuya Yamabe²,
4 Sachi Inagaki³, Hélène Chanut-Delalande¹, Serge Plaza⁴, Yuji Kageyama^{2,3}, Dani
5 Osman⁵, Cédric Polesello^{1*} & François Payre^{1*}

6 ¹ Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse,
7 CNRS, Bat 4R3, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

8 ² Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe 657-8501, Japan

9 ³ Biosignal Research Center, Kobe University, 1-1 Rokko-dai, Nada, Kobe 657-8501, Japan

10 ⁴ Present Address: Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LSRV), CNRS, UPS, 24 chemin de Borde
11 Rouge, Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France

12 ⁵ Faculty of Sciences III and Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, LBA3B, EDST,
13 Lebanese University, 1300, Tripoli, Lebanon

14 * Correspondence and requests for materials should be addressed to C.P. or F.P.

15 (email: cedric.polesello@univ-tlse3.fr, francois.payre@univ-tlse3.fr)

16

17 **Abstract**

18 To compensate for accumulating damages and cell death, adult homeostasis (e.g.,
19 body fluids and secretion) requires organ regeneration, operated by long-lived stem
20 cells. How stem cells can survive throughout the animal life yet remains poorly
21 understood. Here we show that the transcription factor Shavenbaby (Svb, OvoL in
22 vertebrates) is expressed in renal/nephric stem cells (RNSCs) of *Drosophila* and
23 required for their maintenance during adulthood. As recently shown in embryos, Svb
24 function in adult RNSCs further needs a post-translational processing mediated by
25 Polished rice (Pri) smORF peptides and impairing Svb function leads to RNSC
26 apoptosis. We show that Svb interacts both genetically and physically with Yorkie
27 (YAP/TAZ in vertebrates), a nuclear effector of the Hippo pathway, to activate the
28 expression of the inhibitor of apoptosis *DIAP1*. These data therefore identify Svb as a
29 novel nuclear effector in the Hippo pathway, critical for the survival of adult somatic
30 stem cells.

31 **Keywords**

32 Stem cells, OVOL/Shavenbaby, smORF peptides, Hippo pathway, apoptosis, Renal
33 system, Malpighian tubules, *Drosophila*.

34 The family of OvoL/Ovo/Shavenbaby (Svb) transcription factors has been strongly conserved
35 across evolution¹ and is characteristic of animal species. Initially discovered in flies for a dual
36 function in the development of epidermal derivatives (Svb) and of the germline (Ovo)^{2, 3},
37 mammalian orthologs (OvoL1-3) have soon been identified⁴⁻⁶. *OvoL/svb* genes produce
38 several protein isoforms and the existence of three partially redundant paralogs in mammals
39 complicates their genetic analysis. There is a single gene in *Drosophila*, which expresses
40 germline- (*ovo*) and somatic-specific (*svb*) transcripts from different promoters. Previous
41 work has well-established the role of Svb in the development of embryonic epidermal
42 tissues³, where it triggers a tridimensional cell shape remodeling for the formation of actin-
43 rich apical extensions, called trichomes. *Svb* expression is driven by a large array of *cis*-
44 regulatory regions, which have become a fruitful paradigm for elucidating the function^{7, 8} and
45 evolution⁹⁻¹¹ of developmental enhancers. Svb enhancers directly integrate multiple inputs
46 form upstream regulatory pathways⁷ and often drive similar patterns, all together conferring
47 robustness to epidermal development in the face of varying environmental conditions and/or
48 genetic backgrounds^{7, 8}. During embryogenesis, the Svb transcription factor directly activates
49 a battery of >150 target genes¹²⁻¹⁴ collectively responsible for actin and extra-cellular-matrix
50 reorganization that underlie trichome formation¹⁵. Recent studies have unraveled a tight
51 control of Svb transcriptional properties, in response to Polished rice (Pri, also known as
52 Tarsal-less) peptides, which belongs to a novel family of peptides encoded from small open
53 reading frames (smORF) hidden within apparently long noncoding RNAs¹⁶. Svb is first
54 translated as a long-sized protein that acts as a repressor (Svb^{REP})¹⁷. Pri smORF peptides then
55 induce a proteolytic processing of Svb^{REP} leading to the degradation of its N-terminal region
56 and releasing a shorter activator form, Svb^{ACT}¹⁷. Further work has demonstrated that *pri*
57 expression is directly regulated by periodic pulses of steroid hormones¹⁸, allowing a
58 functional connection between hard-wired genetic regulatory networks (*svb* expression) and

59 systemic hormonal control (mediated by *pri*) for a proper spatio-temporal control of
60 epidermal cell morphogenesis¹⁶.

61 Recent studies suggest that OvoL/Svb factors display broader functions throughout
62 epithelial tissues in both normal and various pathological situations. Molecular profiling of
63 human tumors has revealed that OvoL deregulation is a feature of many carcinomas, directly
64 linked to the metastatic potential of morbid cancers¹⁹⁻²³, including kidney²⁴. OvoL factors
65 have been proposed^{25, 26} to counteract a conserved core of regulators composed of Snail/Slug
66 and Zeb1-2 transcription factors, as well as the micro RNA *mir200*, well known to promote
67 epithelial-mesenchymal transition (EMT)²⁷. The activity of OvoL might help stabilizing a
68 hybrid E/M phenotype^{21, 25}, providing many advantages for both tumors and normal stem
69 cells²⁸. Indeed, recent data show that, like adult somatic stem cells, the most aggressive
70 tumors often display a hybrid phenotype between mesenchymal and epithelial states²⁷, and the
71 expression of specific OvoL isoforms can annihilate the metastatic potential of mammary
72 tumors^{29, 19}. In addition, OvoL/Svb factors have been linked to the control of various
73 progenitors/stem cells, from basal invertebrates³⁰ to mammals³¹⁻³³. Therefore, whereas a large
74 body of evidence supports a key role for OvoL/Svb in the behavior of somatic stem cells, a
75 functional investigation of their mode of action *in vivo* remains to be undertaken.

76 Here we built on the knowledge and tools accumulated for the study of Svb function in flies
77 to investigate its putative contribution to the behavior of somatic stem cells in the adult. We
78 show that in the Malpighian tubules, which ensure essential renal functions in insects^{34, 35}, *svb*
79 is specifically expressed in the adult renal and nephric stem cells (RNSCs, see Fig. 1a). We
80 further find that a main function of Svb in the kidney is to protect RNSCs from apoptosis by
81 controlling the expression of the inhibitor of apoptosis, *DIAP1*, in interaction with Yorkie, a
82 nuclear effector of the Hippo pathway.

83 **Results and Discussion**

84 ***svb* is expressed in Renal Nephric Stem Cells and controls their maintenance**

85 To assay whether *svb* might be expressed in the adult, we tested large genomic reporter
86 constructs that cover each of the seven enhancers contributing to *svb* expression. We found
87 that one enhancer⁹, *svb*^{E10}, drove specific expression in tiny cells of the Malpighian tubules
88 (Supplementary Fig. 1a, b).

89 Adult Malpighian tubules are mainly composed of two types of differentiated cells³⁵
90 (Fig. 1a). The principal cells -characterized by the homeodomain Cut protein- express the
91 vacuolar-ATPase (V-ATPase) that establishes an H⁺ electrochemical potential promoting
92 *trans*-epithelial secretion of Na⁺ and K⁺³⁴. The second main population of Malpighian
93 tubules are termed stellate cells, featured by the expression of the Teashirt transcription
94 factor, and that regulate the transport of Cl⁻ and water³⁴. While both principal and stellate
95 cells display large-sized polyploid nuclei, a third population of tiny diploid cells³⁶ are located
96 in the lower tubules and correspond to RNSCs^{34, 35, 37} (Fig. 1a). RNSCs derive from a
97 subpopulation of intestinal stem cell precursors that colonize Malpighian tubules during post-
98 embryonic development^{37, 38}. RNSCs are characterized by the expression of Escargot, a
99 transcription factor of the Snail/SLUG family that is also expressed in intestinal stem cells
100 (ISCs³⁹) where it acts to prevent ISC differentiation^{40, 41}. Co-localization with an *esg*-LacZ
101 reporter confirmed that the *svb*^{E10} enhancer was active in RNSCs (Fig. 1b and Supplementary
102 Fig. 1b). To define the minimal region of *svb* responsible for the expression in RNSCs, we
103 assayed a collection of overlapping constructs⁷. This identified two independent elements, the
104 *svb*^{E3N} and *svb*^{E6} enhancers^{7, 9}, which despite having distinct activities during embryogenesis⁹,
105 ⁴² drove similar expression in adult RNSCs (Supplementary Fig. 1c).

106 Having established that two enhancers drive specific expression of *svb* in the adult
107 stem cells of the renal system, we next assayed consequences of depleting *svb* function in
108 RNSCs. We used a well-controlled genetic system, hereafter referred to as *esg^{ts}*, ensuring
109 RNAi-mediated gene depletion, specifically in the stem cells and only at the adult stage⁴³. We
110 also developed an image analysis pipeline, allowing automated quantification of the whole
111 population of RNSCs (see methods). In control conditions, the number of *esg*-positive RNSCs
112 remains stable after adult hatching, with approx. 350 cells *per* tubules (Fig. 1c,d). We only
113 noticed a weak reduction of RNSCs (300 cells) after one month. In contrast, *esg^{ts}*-driven
114 RNAi depletion of *svb* led to a dramatic loss of RNSCs, which were completely absent after
115 32 days of treatment (Fig. 1c,d). The effects of *svb* depletion were already strong following 8
116 days of treatment, with a two-fold reduction in the number of RNSCs. Similar results were
117 observed when using an independent driver of RNSCs (*Dome-meso-gal4*) to direct RNAi-
118 mediated knockdown of *svb* (Supplementary Fig. 1d,e). The loss of RNSCs upon *svb*
119 depletion was also confirmed by staining against Hindsight, another transcription factor
120 specific of RNSCs within Malpighian tubules (Supplementary Fig. 1d,e). Finally, the key role
121 of *svb* in the maintenance of adult RNSCs was further demonstrated by results from genetic
122 mosaics, showing that *svb*-null mutant cells⁴⁴ were unable to maintain RNSCs (Fig. 1e).

123 Taken together, these data thus reveal that *svb* is specifically expressed in RNSCs and
124 critically required for the maintenance of the adult stem cell compartment.

125

126 **Svb processing is essential for its activity in Renal Nephric Stem Cells**

127 In the epidermis, Svb activity relies on a proteolytic processing that causes a switch from a
128 repressor to an activator form. This processing is gated by Pri regulatory peptides, which bind
129 to and activate the Ubr3 ubiquitin E3-ligase that, in turn, triggers a limited degradation

130 operated by the proteasome⁴⁵ (Fig. 2a). Thereby, *pri* mediates a systemic control of Svb
131 maturation since the expression of *pri* is directly regulated by the ecdysone receptor (EcR)¹⁸.
132 To assess whether the function of Svb in Malpighian tubules also required its proteolytic
133 maturation, we investigated a putative function of *pri* and *ubr3* in RNSCs. We screened a
134 collection of *pri* reporter lines^{18,46} and identified two *cis*-regulatory regions driving
135 expression in RNSCs (Fig. 2b and Supplementary Fig. 2a,b). Consistently with the expression
136 of *pri* in RNSCs, *pri* depletion almost fully eliminated RNSCs upon 8 days of RNAi
137 treatment (Fig. 2d and Supplementary Fig. 2c). In addition, a dominant negative form of the
138 Ecdysone Receptor (EcRDN) that abolishes *pri* expression during both embryonic and post-
139 embryonic development¹⁸ was sufficient to reduce the number of stem cells when specifically
140 expressed in adult RNSCs (Fig. 2d). Furthermore, we found that *ubr3* was also required for
141 RNSC maintenance, as deduced from results of RNAi-mediated depletion and genetic
142 nullification⁴⁵ of *ubr3* activity (Fig. 2c,d). Finally, the expression of OvoA that behaves as a
143 constitutive repressor isoform of Svb^{17,44,47} mimicked the effects observed in *svb* loss of
144 function conditions (Fig. 2d). Reciprocally, the expression of OvoB that acts as a constitutive
145 activator isoform of Svb^{17,44,47} was sufficient to rescue the lack of *ubr3* function (Fig. 2d and
146 Supplementary Fig. 2c), demonstrating that Svb function in RNSCs relies on its matured
147 transcription activator form.

148 These results provide compelling evidence that the whole regulatory machinery discovered
149 for its role in the development of epidermal cells^{17,18,45} is also at work in adult RNSCs. We
150 therefore concluded that the post-translational maturation of the Svb transcription factor is
151 essential for the maintenance of RNSCs.

152

153 **Svb protects Renal Nephric Stem Cells from apoptosis**

154 The loss of RNSCs observed following the lack of *svb* function or maturation could
155 theoretically result from at least three different causes: i) lack of proliferation, ii) precocious
156 differentiation, or iii) increased cell death. Consistent with the quiescent behavior of RNSCs,
157 we observed a very low frequency of RNSC mitosis in controls, as deduced from staining
158 with the mitotic marker Histone3-P (Supplementary Fig. 3a) and as previously noticed³⁷.
159 Therefore, even a complete block of stem cell division cannot account for the disappearance
160 of RNSCs observed in the absence of *svb*. Using the lineage-tracing system called ReDDM
161 that has been recently developed for intestinal stem cells⁴⁸, we next investigated a putative
162 influence of *svb* on RNSC differentiation. Based on differences in the stability of two
163 fluorescent proteins, ReDDM allows marking renal progenitors that express both mCD8::GFP
164 and H2B::RFP, while their progeny only maintain the very stable H2B::RFP⁴⁸. In control
165 conditions, we detected very rare H2B::RFP progeny (Fig. 3a) confirming low cell renewal in
166 Malpighian tubules³⁷. Recent work has shown that the expression of *mir-8* (the *Drosophila*
167 homolog of *mir-200* in vertebrates) downregulate the expression of EMT-inducing factors
168 Escargot and Zfh1 (the homolog of Zeb1), triggering a strong burst of stem cell differentiation
169 in the intestine⁴⁸. Similarly, we found that *mir-8* expression in RNSCs forced *esg*+ cells to
170 differentiate and only rare RNSCs persisted after 8 days of treatment (Fig. 3a). Upon *mir-8*
171 expression, the progeny (H2B::RFP-positive, GFP-negative cells) of RNSCs present in lower
172 tubules also expressed Alkaline Phosphatase 4, a marker of a subset of differentiated principal
173 cells⁴⁹ confirming that the depletion of RNSCs upon *mir-8* overexpression was caused by
174 their premature differentiation (Supplementary Fig. 3b). In contrast, no modification of the
175 progenitors/progeny ratio was observed in *svb*-RNAi conditions when compared to controls,
176 showing that *svb* depletion does not trigger RNSC differentiation (Fig. 3a). Finally, we tested
177 whether *svb*-depleted RNSCs were lost because they underwent apoptosis. Since apoptotic

178 figures are difficult to observe in the digestive track⁵⁰ including the Malpighian tubules, we
179 assayed consequences of blocking programmed cell death by expressing the viral caspase
180 inhibitor p35⁵¹. Although the expression of p35 had no detectable effect by itself on RNSCs,
181 it significantly rescued the number of RNSCs when *svb* was depleted (Fig. 3c and see below).
182 Taken together, these data show that the loss of RNSCs observed upon *svb* loss of function is
183 primarily due to stem cell death, indicating that a main role of Svb is to protect adult stem
184 cells from undergoing apoptosis.

185

186 **Svb acts downstream of Hippo**

187 During epidermal development, *svb* is expressed in post-mitotic cells where it acts as a
188 terminal differentiation factor that controls cell shape remodeling^{15, 52}. We noticed that
189 RNSCs lacking *svb* displayed a reduced size, as well as an altered morphology (Fig. 3b). One
190 could speculate that these defects in cell shape might stress RNSCs and thus induce apoptosis.
191 Indeed, the Hippo pathway^{53, 54} is a key sensor of mechanical stress renowned to induce
192 apoptosis following cytoskeleton modifications^{55, 56}. The core Hippo complex is composed of
193 two kinases, Hippo (Hpo) and Warts and two scaffolding proteins, Salvador and Mob As
194 Tumor Suppressor^{53, 54}. Activation of Hippo leads to the phosphorylation of the co-
195 transcription factor Yorkie (Yki) that results in Yki nuclear exclusion/degradation, preventing
196 its positive action on the transcription of target genes such as *DIAP1* and *bantam*^{53, 54}.
197 Previous work has shown that the Hippo pathway is a key regulator of the *Drosophila* gut
198 homeostasis, controlling survival and proliferation of stem cells for tissue regeneration^{57, 58}.
199 Consistently, we found that the activation of Hpo induced a strong reduction in the number of
200 RNSCs. However, co-expression of OvoB, the constitutive activator isoform of Svb, together
201 with Hpo was sufficient to rescue the loss of RNSCs (Fig. 4a). These results therefore

202 demonstrated that if Svb and Hpo interact for the homeostasis of RNSCs, the loss of RNSCs
203 observed upon *svb* knockdown is not due to the activation of the Hippo pathway, since Svb is
204 instead acting downstream Hpo. In contrast, overexpression of Yki (mimicking a loss of
205 Hippo signaling⁵⁹) induced a strong increase in *esg*⁺ renal cells, which displayed abnormal
206 tumor-like morphology when compared to wild-type RNSCs (Fig. 4a). Unexpectedly, this
207 increase in the number of renal stem cells was entirely suppressed upon *svb* depletion, or
208 expression of the constitutive repressor OvoA (Fig. 4a and Supplementary Fig. 3f).
209 Quantification indicated that *esg*⁺ cells overexpressing Yki were even more sensitive to *svb*
210 loss-of-function than otherwise normal RNSCs (Fig. 4a), a result well in line with the extra-
211 resistance of intestinal stem cells to apoptosis when compared to tumorous stem-like cells⁵⁰.
212 Hence, the function of Yki in RNSCs requires Svb, suggesting that Svb was acting either
213 downstream or in parallel with this nuclear effector of Hippo. Several lines of evidence ruled
214 out the former and validated the latter hypothesis. First, knocking down Yki also led to RNSC
215 loss (Supplementary Fig. 3c). Expression of the Svb constitutive activator (OvoB) was
216 nevertheless not able to rescue RNSC survival in the absence of Yki (as opposed to the over
217 expression of Hpo, Fig. 4a), showing that Svb requires Yki activity for RNSC maintenance
218 (Fig. 4a and Supplementary Fig. 3c). Second, although Yki is sufficient to induce *DIAP1*
219 expression⁶⁰ (and see below), Yki was not able to rescue the lack of Svb while DIAP1 alone
220 did (Fig. 4a). Indeed, we found that DIAP1 was sufficient to compensate for *svb*-depletion
221 (Fig. 4a and Supplementary Fig. 3f). In sum, while both Svb and Yki are required for RNSC
222 maintenance, re-expression of Yki is not sufficient to rescue the loss of *svb* function.
223 Reciprocally, Svb is not sufficient to rescue a proper RNSC compartment in the absence of
224 Yki, showing that Svb and Yki act in parallel for the survival of adult stem cells.
225 We thus concluded that Svb acts downstream of Hippo cytoplasmic core components and,
226 together with Yki, both nuclear factors are required to protect RNSCs from apoptosis.

227 **Svb as a novel nuclear effector of the Hippo pathway**

228 Having established that Svb and Yki genetically interact, we wondered whether the two
229 proteins might interact to control the expression of common target genes, *e.g.*, *DIAP1*. Yki is
230 unable to bind DNA by itself and need to associate to sequence-specific-transcription
231 factors⁵⁴. Interestingly, Yki contains two WW protein domains shown to mediate interaction
232 with partners bearing PPxY motifs (such as Wts⁶⁰, Wbp2⁶¹ and Mad⁵⁹), and we detected two
233 PPxY motifs within the Svb protein, at position 523 (PPFY) and 881 (PPSY). Co-
234 immunoprecipitation assays showed that Svb bound to the wild type form of Yki, while the
235 mutation of Yki WW motifs was sufficient to abrogate the interaction with Svb (Fig. 4c). A
236 second piece of evidence emerged from the comparison of chromatin immuno-precipitation
237 (ChIP-seq) datasets between Svb¹⁴ and Yki⁶². We found that Svb and Yki share 836 common
238 genomic binding sites (Supplementary Fig. 4a) and statistical tests established the
239 significance of this overlap (Supplementary Fig. 4b). Interestingly, co-binding of Yki was rare
240 for the direct target genes of Svb identified in the epidermis¹²⁻¹⁴, as illustrated by *shavenoid* or
241 *dusky-like* that both lack Yki binding (Supplementary Fig. 4d,d'). In contrast, Svb was often
242 bound to known Yki target genes, such as *bantam*, *fat*, *piwi* or *nanos*⁶³ (Supplementary Fig.
243 4c,c'). ChIP-seq also revealed that Svb and Yki bound to a same region of *DIAP1*, within an
244 enhancer driving specific expression in adult intestinal stem cells⁶⁴ (Fig. 4b). We therefore
245 tested if Svb might regulate *DIAP1* expression. Although very weak in control conditions,
246 expression of *DIAP1-LacZ* was strongly enhanced upon Yki overexpression. This induction
247 was completely antagonized by OvoA (Fig. 4d). Similar results were obtained with the
248 isolated *DIAP1* enhancer (*DIAP1-4.3-GFP*) containing the binding sites of Yki and Svb, the
249 expression of which was again enhanced by Yki overexpression and abrogated upon
250 counteracting Svb activity (Fig. 4e). These data thus strengthen the conclusion that Svb and

251 Yki functionally interact in RNSCs to prevent apoptosis, at least in part through promoting
252 *DIAP1* expression.

253 One important question was whether the interaction between Svb and the Hippo pathway also
254 took place in other tissues. The function of Hippo has been initially described in imaginal
255 discs, which give rise to most adult tissues⁶⁵ and Yki overexpression promotes cell
256 proliferation in both wing and eye discs⁶⁰. We tested Svb/Yki genetic interactions in the wing
257 using *collier-Gal4* that drives expression in the medial (L3-L4) intervein region. *Yki* over-
258 expression resulted in the expansion of this region due to tissue overgrowth (Supplementary
259 Fig. 3d). In contrast, *OvoA* leads to both a reduction of the L3-L4 region and the absence of
260 epidermal trichomes. As in RNSCs, *OvoA* was epistatic to Yki, since the wing region
261 expressing both *yki* and *ovoA* was smaller than in controls and lacked trichomes
262 (Supplementary Fig. 3d). In the eye, overexpression of Yki using the *GMR-Gal4* driver
263 promoted extra cell proliferation resulting in an increased eye size. Similar results were
264 obtained following *pri* overexpression, and co-expressing *pri* and *yki* resulted in a synergistic
265 eye growth (Supplementary Fig. 3e). Northern blotting of RNAs extracted from adult heads
266 revealed that *DIAP1* mRNA levels were increased following *pri* overexpression
267 (Supplementary Fig. 4e), while there was no effect on *yki* or *cycE* mRNA.

268 We interpret these results to imply that Svb functionally interacts with Yorkie, both in adult
269 stem cells and in developing tissues, to regulate a subset of transcriptional targets of the
270 Hippo pathway, including the activation of *DIAP1* expression.

271 **Conclusions**

272 Our results show that Shavenbaby is expressed and required for the maintenance of adult
273 renal stem cells (RNSCs) in flies, supporting the conclusion that the OvoL/Svb family of
274 transcription factors plays a key and evolutionarily-conserved role in the behavior of
275 progenitors-stem cells.

276 The role of Svb in adult stem cell maintenance in flies requires both a fine control of its
277 expression and of its transcriptional activity. Svb expression in RNSCs involves at least two
278 separable enhancers, driving similar expression patterns. Svb was one the first cases to reveal
279 the functional importance of apparently redundant (or shadow) enhancers in the phenotypic
280 robustness of developmental networks⁸. Our data suggest that a similar *cis*-regulatory
281 architecture is also underlying the control of adult stem cells.

282 RNSCs maintenance further requires a proper post-translational maturation of the Svb
283 protein, in the response to Pri smORF peptides. During both embryonic¹⁷ and post-embryonic
284 development^{18, 45}, the main role of Pri peptides is to provide a temporal control of Svb
285 activity, conveying systemic steroid signaling¹⁸. It is therefore possible that Pri smORF
286 peptides also connect genetic networks to hormonal control for the regulation of adult stem
287 cells. Recent work has shown that various smORF peptides contribute to the regulation of
288 developmental pathways, muscle formation and physiology, etc...^{16, 66, 67}, and our findings
289 extend their influence to the control of adult stem cells. It has been proposed that the
290 emerging field of smORF peptides may open novel therapeutic strategies, for example
291 peptidomimetic drugs, which might also be of interest for regenerative medicine.

292 Complementary data establish that a main function of Svb in adult stem cells is mediated by a
293 functional interplay with the Hippo pathway, well established for its roles in the control of
294 adult stem cells^{53, 57, 58, 68}. Our results indicate that Svb behaves as a novel nuclear effector of

295 Hippo, relying on a direct interaction with Yorkie in order to protect stem cells from
296 apoptosis, at least in part through the regulation of *DIAP1* expression. Analysis of genome-
297 wide binding events further suggests that the Svb/Yki interaction is involved in the control of
298 a broader set of Hippo-regulated genes, including during development. Since both Pri and
299 Ubr3 are also essential for the survival of adult stem cells, it is interesting to note that Ubr3
300 protects the DIAP1 protein from degradation⁶⁹, and direct binding of Ubr3 on the activated
301 form of DIAP1 is elicited in the presence of Pri peptides⁴⁵. Therefore, in addition to the
302 control of *DIAP1* expression (*via* Svb), Ubr3 and Pri could also stabilize the DIAP1 protein to
303 protect stem cells from apoptosis. Although initially restricted to TEAD transcription factors,
304 the number of Yorkie (YAP/TAZ) nuclear partner is rapidly growing⁵⁴. Recent work has
305 shown a direct interaction of YAP/TAZ with the Snail/Slug pro-EMT factors in the control of
306 stem cell renewal and differentiation⁷⁰. As previously reported for intestinal stem cells^{40, 41, 48},
307 pro-EMT regulators are also required for preventing premature differentiation of renal stem
308 cells. While pro-EMT and OvoL factors are often viewed as antagonistic factors^{19, 21, 25}, *in*
309 *vivo* studies in *Drosophila* stem cells show that they both contribute to their maintenance,
310 Svb/Yki preventing their apoptosis and EMT factors their differentiation. Many studies
311 having implicated the Hippo pathway, pro-EMT and OvoL/Svb factors in various tumors,
312 new insights into their functional interactions in adult stem cells may provide additional
313 knowledge directly relevant to understand their connections in human cancers.

314 **Methods**

315 **Fly stocks.** The following *Drosophila* stocks were used in this study: *tsh-LacZ* (BL#11370),
316 *esg-lacZ* (BL#10359), *esg-Gal4*, *UAS-GFP*; *tubulin-Gal80^{ts}/SM6-TM6B*⁴³ (B. Edgar), *yw*,
317 *hsFLP*, *tubulin-Gal80 FRT19A*; *UAS-mcd8::GFP/Cyo*; *tubulin-Gal4/TM6 Tb* (N. Tapon), *esg-*
318 *Gal4,UAS-mcd8::GFP/Cyo*; *UAS-H2B::RFP*, *tubulin-Gal80^{ts}/TM2*⁴⁸ (M. Dominguez), *col-*
319 *Gal4*, *UAS-mcd8::GFP/Cyo* and *domeMeso-Gal4* (M. Crozatier), *GMR-Gal4 /Cyo*
320 (BL#9146), *tal-Gal4/ TM3 Sb* (J.P. Couso), *svb^E-GFP*, *svb^{E10}-lacZ*, *svb^{E3N}-lacZ*, *svb^{E6}-lacZ*
321 (D. Stern), *svb^{E3N}-GFP* (this work), *svb^{R9}*, *FRT19A/ FMO*⁴⁴, *ubr3^B FRT19A/ FMO*⁴⁵ (H.
322 Bellen), *Diap1-lacZ* (BL#12093) , *UAS-svb RNAi* (VDRC #v40316), *UAS-ubr3 RNAi* (VRDC
323 #22901), *UAS-yki RNAi* (VDRC #KK104523), *UAS-pri RNAi* (J.P. Couso), *UAS-OvoA*⁴⁴,
324 *UAS-OvoB*⁴⁴, *UAS-EcRDN* (BL#9449), *UAS-mir8* (S.M. Cohen), *UAS-p35* (B. Monier),
325 *UAS-hpo/CyO* (N. Tapon), *UAS-yki/TM3 Sb* (D.J. Pan), *UAS-DIAP1* (N. Tapon), *UAS-*
326 *pri/CyO* (J.P. Couso).

327 Flies were cultured (unless otherwise noted) at 25°C, using standard cornmeal food (*per* liter:
328 17g inactivated yeast powder, 80g corn flour, 9g agar, 45g white sugar and 17ml of Moldex).
329 Similar results were also observed using a richer medium (same composition except 45g of
330 yeast powder). Female adult flies were used in all analyses throughout the study and placed
331 on fly food supplemented with fresh yeast, which was changed every two days. Conditional
332 expression in RNSCs was achieved by maintaining *tub-Gal80^{ts}* expressing flies at 18°C, until
333 adulthood. Eclosed females aged for 3- to 4-days were shifted to 29°C for induction of gene
334 expression and were kept at 29°C for the indicated period of time (in most cases 8 days).
335 Virgin females bearing *svb^{R9}*, *svb^{PL107}* or *ubr3^B* mutations^{44, 45} over FM0 balancers were mated
336 with males of the following genotype: *yw*, *hs-FLP*, *tub-Gal80*, *FRT19A*; *UAS::mcd8-GFP*;
337 *tub-Gal4/TM6,Tb*. Females of the correct phenotype (no *B* and no *Tb*) were heat shocked for
338 1h at 37°C. Flies were transferred on fresh food every two days and dissected at the indicated

339 time. Detailed information about the full genotype of each *Drosophila* stock is given in the
340 genotype section below.

341 **Histology.** Tissues were dissected in 1X PBS, fixed in 4% formaldehyde in PBS for 15 min
342 at room temperature, washed for 5 min in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBT) and fixed
343 again during 20 min. Following a 5 min wash (PBT 0.1), tissues were then blocked for 30
344 minutes in PBT containing 1% BSA. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C.
345 Anti-β-Galactosidase (Cappel) antibody was used at 1/1000, Cut (DSHB) and GFP antibodies
346 at 1/200, and phospho-HistoneH3 (Upstate) and Disc-large (DSHB) antibodies at 1/500.
347 AlexaFluor-488 or 555 secondary antibodies (Molecular Probes) were incubated for 2 hrs at
348 room temperature at 1/500. After washes, tissues were mounted in Vectashield (Vector). For
349 X-gal staining, adult tissues were dissected in 1X PBS, fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for
350 15 min at room temperature and washed in PBS. The staining solution was warmed up at
351 37°C for 10 min plus 10 other min after addition of 8% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-
352 D-Galactopyranoside). The X-Gal solution used to reveal the β-Galactosidase activity was:
353 10mM NaH₂PO₄.H₂O/ NA₂HPO₄.2H₂O (pH=7.2), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂.6H₂O,
354 3.1mM K₄ (FeII(CN)₆), 3.1mM K₃ (FeIII(CN)₆), 0.3 % Triton X-100. Bright-field pictures
355 were acquired using a Nikon eclipse 90i microscope.

356 **Microscopy, image and statistical analysis.** Images of whole Malpighian tubules were
357 acquired on a LSM710 confocal scanning microscope (X20 objective), using automated
358 multi-position scan. After stitching, tiled images of individual pairs of tubules were analyzed
359 with IMARIS 8.0 to quantify the number of GFP-positive cells. Data of at least three
360 independent experiments (approx. 20 tubules) were analyzed with GraphPad Prims 5, using
361 two-tailed Mann-Whitney tests. The statistical significance of differences observed between
362 compared genotypes was indicated as: *** (p<0.001), ns (p>0.05). Close-up pictures were

363 acquired using Leica SPE and Leica SP8 confocal laser scanning microscopes (X40 and X63
364 objectives). Laser intensity and background filtering was set according to the control samples
365 and remained the same for all subsequent samples. The intensity of most pictures has been
366 enhanced equally for all images within the same experiment using adjustments in Photoshop
367 CS5. All images were processed using Adobe Photoshop, Illustrator CS5 and Inkscape 0.91.

368 **Western blotting and immunoprecipitation.** *Drosophila* S2 cells were grown in
369 Schneider medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin
370 (Invitrogen) at 25°C. We used stable cell lines co-expressing the copper-inducible constructs
371 pMT-Svb::GFP and pMT-pri¹⁷. S2 cell lines were cultured in six-well plates (1.75x10⁶
372 cells/3ml) and transfected in 100 µl of Opti-MEM (Invitrogen) with 3 µl of FugeneHD
373 (Promega) and the indicated constructs. CuSO₄ (final concentration of 1mM) was used to
374 induce the expression of pMT plasmids. The following plasmids were used: pAc-Yki::HA
375 and its related mutated version pAc-Yki-WW::HA. Cells were lysed in 250 µl of ice-cold
376 lysis buffer (150 mM NaCl, 50mM Tris [pH 8], 0.5% NP40, 1mM EGTA, 0.5M NaF,
377 200mM vanadate, phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma) and protease inhibitors (Roche).
378 After clearing by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, immuno-precipitations were done
379 from transfected lysates in lysis buffer using anti-GFP antibody (GFP-trap, Chromotek).
380 Immuno-precipitated samples were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF
381 membranes, then blotted using anti-GFP (TP401, Acris Antibodies, 1:10000) and anti-HA
382 (Covance, 1:2.000) antibodies. Secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit IgG-HRP
383 conjugates (Jackson Laboratory, 1:10.000) were detected using ECL Clarity (Biorad).

384 **Northern blot analysis.** Using adult total RNAs as a starting material, DNA fragments
385 containing coding sequence of *yki*, *CycE* and *DIAP1* were reverse transcribed and PCR-
386 amplified with pairs of specific primers: CTGCC CAACT CCTTC TTCAC (forward) and

387 AACTG AATGG GGCTG ATGAC (reverse) for *yki*; GATGA CGTTG AGGAG GAGGA
388 (forward) and TGCGT CTTCT GCACC TTATG (reverse) for *CycE*; CCGAG GAACC
389 TGAAA CAGAA (forward) and GCACA ACTTT TCCTC GGGTA (reverse) for *DIAP1*. A
390 SP6 promoter sequence (CAAGC TATTT AGGTG ACACT ATAG) was attached to each
391 reverse primer for *in vitro* transcription. DIG-labelled probes were prepared with SP6 RNA
392 polymerase, according to the supplier's manual (Roche). Northern blot analysis was described
393 previously¹⁸. Briefly, 2 days-old adults were frozen with liquid nitrogen and heads were
394 sorted with sieves, followed by RNA purification with Isogen (Nippon Gene). 1 µg of RNA
395 *per* lane was separated by formaldehyde–agarose gel electrophoresis and then transferred to a
396 nylon membrane (Roche). Hybridization and wash procedures were carried out at 52°C and
397 65°C, respectively. The filters were reacted with an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG
398 antibody (Roche) and chemiluminescent reactions with CPD-Star (Roche) were detected by
399 LAS 4000mini (GE Healthcare).

400 Genotypes

401 **Figure 1A:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/ tsh-LacZ*

402 **Figure 1B:** *yw/w; esg-LacZ/+; svb^{E3N}-GFP/+*

403 **Figure 1C&D control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulinGal80^{ts}/+*

404 **Figure 1C&D svb-RNAi:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-RNAi*

405 **Figure 1E control:** *yw, hsFLP, tubulin-Gal80 FR19A; UAS-mCD8::*GFP*/+; tubulin-Gal4/
406 *ry⁵⁰⁶**

407 **Figure 1E svb^{R9}:** *yw, hsFLP, tubulin-Gal80 FR19A/ yw svb^{R9} FRT19A; UAS-mCD8::*GFP*/+;*
408 *tubulin-Gal4/+*

409 **Figure 2B:** *tal-Gal4/ UAS-HB2::*RFP**

410 **Figure 2C control:** *yw, hsFLP, tubulin-Gal80 FR19A; UAS-mCD8::*GFP*/+; tubulin-Gal4/
411 *ry⁵⁰⁶**

412 **Figure 2C ubr3^B:** *yw, hsFLP, tubulin-Gal80 FR19A/ yw ubr3^B FRT19A; UAS-mCD8::*GFP*/+;*
413 *tubulin-Gal4/+*

414 **Figure 2D control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/+*

415 **Figure 2D svb-RNAi:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-RNAi*

416 **Figure 2D ovoA:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-ovoA*

417 **Figure 2D ovoB:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-ovoB*

418 **Figure 2D pri-RNAi:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-pri-RNAi*

419 **Figure 2D EcRDN:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-EcRDN^{B2w650A}*

420 **Figure 2D ubr3-RNAi:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/ UAS-ubr3 RNAi; tubulin-Gal80^{ts}/+*

421 **Figure 2D ubr3-RNAi + ovoB:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/ ubr3 RNAi; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-
422 ovoB/+*

423 **Figure 3A control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-H2B::*RFP, tubulin-Gal80^{ts}/+**

424 **Figure 3A mir8:** *yw/w, UAS-mir8; esg-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-H2B::*RFP, tubulin-
425 Gal80^{ts}/+**

426 **Figure 3A svb-RNAi:** *yw/w ; esg-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-H2B::*RFP, tubulin-
427 Gal80^{ts}/ UAS-svb RNAi**

428 **Figure 3B control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/+*

429 **Figure 3B svb-RNAi:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-RNAi*

430 **Figure 3C control:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/+*

431 **Figure 3C p35:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ UAS-p35; tubulin-Gal80^{ts}/+*

432 **Figure 3C svb-RNAi:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-RNAi*

433 **Figure 3C p35+ svb-RNAi:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ UAS-p35; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-
434 RNAi*

435 **Figure 4A control:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/+*

436 **Figure 4A hpo:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ UAS-hpo; tubulin-Gal80^{ts}/+*

437 **Figure 4A yki:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-yki*

438 **Figure 4A DIAP1:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-DIAP1*

439 **Figure 4A svb-RNAi:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-svb-RNAi*

440 **Figure 4A hpo+ ovoBt:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ UAS-hpo; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-ovoB*

441 **Figure 4A yki+ svb-RNAi:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-ovoB, UAS-yki*

442 **Figure 4A DIAP1+ svb-RNAi:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-DIAP1,
443 UAS-svb-RNAi*

444 **Figure 4D control:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ DIAP1-LacZ/+*

445 **Figure 4D yki:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ DIAP1-LacZ/ UAS-yki*

446 **Figure 4D ovoA:** *yw/; esg-Gal4, UAS-GFP/ +; tubulin-Gal80^{ts}/ DIAP1-LacZ/ UAS-ovoA*

447 **Figure 4D *yki* + *ovoA*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/DIAP1-LacZ/ UAS-yki,*
448 *UAS-ovoA*

449 **Figure 4E control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/DIAP14.3-GFP/+*

450 **Figure 4E *yki*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/DIAP14.3-GFP/ UAS-yki*

451 **Figure 4E *ovoA*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/DIAP14.3-GFP/ UAS-ovoA*

452 **Figure 4E *yki* + *ovoA*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/DIAP14.3-GFP/ UAS-*
453 *yki, UAS-ovoA*

454 **Figure Sup1B:** *yw/w; esg-LacZ/*svb*^{E10}-GFP*

455 **Figure Sup1C:** *yw/w; esg-LacZ/+*

456 **Figure Sup1C:** *w; *svb*^{E3N}-LacZ/+*

457 **Figure Sup1C:** *w; *svb*^{E6}-LacZ/+*

458 **Figure Sup1D:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+*

459 **Figure Sup1E control:** *yw/w; dome-meso-Gal4, UAS-mCherry/+*

460 **Figure Sup1E *svb-RNAi*:** *yw/w; dome-meso-Gal4, UAS-mCherry/+; UAS-*svb-RNAi*/+*

461 **Figure Sup2B:** *yw/w; esg-LacZ/+*

462 **Figure Sup2B:** *w; *priA*-LacZ/+*

463 **Figure Sup2B:** *yw/+; *priJ*-LacZ/+*

464 **Figure Sup3A:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+*

465 **Figure Sup3B control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-*H2B*::*RFP*, *tubulin-*
466 *Gal80^{ts}/+**

467 **Figure Sup3B miR-8:** *yw/UAS-mir8; esg-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-*H2B*::*RFP*,
468 *tubulin-Gal80^{ts}/+**

469 **Figure Sup3C control:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/+*

470 **Figure Sup3C *ovoB*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/UAS-*ovoB**

471 **Figure Sup3C *yki-RNAi*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-*yki**

472 **Figure Sup3C *yki-RNAi* + *ovoB*:** *yw/w; esg-Gal4, UAS-GFP/+; tubulin-Gal80^{ts}/ UAS-*yki*, UAS-*
473 *ovoB*

474 **Figure Sup3D *ctrl*:** *yw/w; col-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+*

475 **Figure Sup3D *yki-RNAi*:** *yw/w; col-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-*yki*/+*

476 **Figure Sup3D *ovoA*:** *yw/w; col-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-*ovoA*/+*

477 **Figure Sup3D *yki-RNAi* + *ovoA*:** *yw/w; col-Gal4, UAS-mCD8::*GFP*/+; UAS-*yki*, UAS-*
478 *ovoA*/+

479 **Figure Sup3E *ctrl*:** *yw/w; GMR-Gal4/+*

480 **Figure Sup3E *pri*:** *yw/w; GMR-Gal4/UAS-*pri**

481 **Figure Sup3E *yki*:** *yw/w; GMR-Gal4/+; UAS-*yki**

482 **Figure Sup3E *pri*+ *yki*:** *yw/w; GMR-Gal4/UAS-*pri*; UAS-*yki*/+*

483 **References**

- 484 1. Kumar, A. *et al.* Molecular phylogeny of OVOL genes illustrates a conserved C2H2 zinc finger domain
485 coupled by hypervariable unstructured regions. *PLoS One* **7**, e39399 (2012).
- 486 2. Mevel-Ninio, M., Terracol, R., Salles, C., Vincent, A. & Payre, F. ovo, a Drosophila gene required for
487 ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with
488 shavenbaby, a gene involved in embryo patterning. *Mech Dev* **49**, 83-95 (1995).
- 489 3. Payre, F., Vincent, A. & Carreno, S. ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis
490 differentiation. *Nature* **400**, 271-275 (1999).
- 491 4. Dai, X. *et al.* The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation
492 and spermatogenesis in mice. *Genes Dev* **12**, 3452-3463 (1998).
- 493 5. Li, B. *et al.* Ovol1 regulates meiotic pachytene progression during spermatogenesis by repressing Id2
494 expression. *Development* **132**, 1463-1473 (2005).
- 495 6. Wells, J. *et al.* Ovol2 suppresses cell cycling and terminal differentiation of keratinocytes by directly
496 repressing c-Myc and Notch1. *J Biol Chem* **284**, 29125-29135 (2009).
- 497 7. Crocker, J. *et al.* Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell*
498 **160**, 191-203 (2015).
- 499 8. Frankel, N. *et al.* Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers.
500 *Nature* **466**, 490-493 (2010).
- 501 9. Frankel, N. *et al.* Morphological evolution caused by many subtle-effect substitutions in regulatory DNA.
502 *Nature* **474**, 598-603 (2011).
- 503 10. McGregor, A.P. *et al.* Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene.
504 *Nature* **448**, 587-590 (2007).
- 505 11. Sucena, E., Delon, I., Jones, I., Payre, F. & Stern, D.L. Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies
506 multiple cases of morphological parallelism. *Nature* **424**, 935-938 (2003).
- 507 12. Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F. & Plaza, S. Shavenbaby couples patterning to
508 epidermal cell shape control. *PLoS Biol* **4**, e290 (2006).
- 509 13. Fernandes, I. *et al.* Zona pellucida domain proteins remodel the apical compartment for localized cell shape
510 changes. *Dev Cell* **18**, 64-76 (2010).
- 511 14. Menoret, D. *et al.* Genome-wide analyses of Shavenbaby target genes reveals distinct features of enhancer
512 organization. *Genome Biol* **14**, R86 (2013).
- 513 15. Chanut-Delalande, H., Ferrer, P., Payre, F. & Plaza, S. Effectors of tridimensional cell morphogenesis and
514 their evolution. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 341-349 (2012).
- 515 16. Zanet, J., Chanut-Delalande, H., Plaza, S. & Payre, F. Small Peptides as Newcomers in the Control of
516 Drosophila Development. *Curr Top Dev Biol* **117**, 199-219 (2016).
- 517 17. Kondo, T. *et al.* Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila
518 embryogenesis. *Science* **329**, 336-339 (2010).
- 519 18. Chanut-Delalande, H. *et al.* Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development.
520 *Nat Cell Biol* **16**, 1035-1044 (2014).
- 521 19. Watanabe, K. *et al.* Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal
522 end buds by Ovol2 transcriptional repressor. *Dev Cell* **29**, 59-74 (2014).

- 523 20. Roca, H. *et al.* A bioinformatics approach reveals novel interactions of the OVOL transcription factors in the regulation of epithelial - mesenchymal cell reprogramming and cancer progression. *BMC Syst Biol* **8**, 29 (2014).
524
525
- 526 21. Hong, T. *et al.* An Ovol2-Zeb1 Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004569 (2015).
527
- 528 22. Roca, H. *et al.* Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. *PLoS One* **8**, e76773 (2013).
529
- 530 23. Wang, Z.H. *et al.* Ovol2 gene inhibits the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in lung adenocarcinoma by transcriptionally repressing Twist1. *Gene* **600**, 1-8 (2017).
531
- 532 24. Ricketts, C.J. *et al.* Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Epigenetics* **7**, 278-290 (2012).
533
- 534 25. Jia, D. *et al.* OVOL guides the epithelial-hybrid-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 15436-15448 (2015).
535
- 536 26. Li, S. & Yang, J. Ovol proteins: guardians against EMT during epithelial differentiation. *Dev Cell* **29**, 1-2 (2014).
537
- 538 27. Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A. & Thiery, J.P. Emt: 2016. *Cell* **166**, 21-45 (2016).
- 539 28. Jolly, M.K. *et al.* Coupling the modules of EMT and stemness: A tunable 'stemness window' model. *Oncotarget* **6**, 25161-25174 (2015).
540
- 541 29. Wu, R.S. *et al.* OVOL2 antagonizes TGF-beta signaling to regulate epithelial to mesenchymal transition during mammary tumor metastasis. *Oncotarget* **8**, 39401-39416 (2017).
542
- 543 30. Lapan, S.W. & Reddien, P.W. Transcriptome analysis of the planarian eye identifies ovo as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep* **2**, 294-307 (2012).
544
- 545 31. Lee, B. *et al.* Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev Cell* **29**, 47-58 (2014).
546
- 547 32. Kitazawa, K. *et al.* OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* **15**, 1359-1368 (2016).
548
- 549 33. Kim, J.Y. *et al.* OVOL2 is a critical regulator of ER71/ETV2 in generating FLK1+, hematopoietic, and endothelial cells from embryonic stem cells. *Blood* **124**, 2948-2952 (2014).
550
- 551 34. Beyenbach, K.W., Skaer, H. & Dow, J.A. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu Rev Entomol* **55**, 351-374 (2010).
552
- 553 35. Denholm, B. Shaping up for action: the path to physiological maturation in the renal tubules of Drosophila. *Organogenesis* **9**, 40-54 (2013).
554
- 555 36. Sözen, M.A., Armstrong, J.D., Yang, M., Kaiser, K. & Dow, J.A. Functional domains are specified to single-cell resolution in a Drosophila epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5207-5212 (1997).
556
- 557 37. Singh, S.R., Liu, W. & Hou, S.X. The adult Drosophila malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1**, 191-203 (2007).
558
- 559 38. Takashima, S., Paul, M., Aghajanian, P., Younossi-Hartenstein, A. & Hartenstein, V. Migration of Drosophila intestinal stem cells across organ boundaries. *Development* **140**, 1903-1911 (2013).
560
- 561 39. Micchelli, C.A. & Perrimon, N. Evidence that stem cells reside in the adult Drosophila midgut epithelium. *Nature* **439**, 475-479 (2006).
562

- 563 40. Loza-Coll, M.A., Southall, T.D., Sandall, S.L., Brand, A.H. & Jones, D.L. Regulation of *Drosophila*
564 intestinal stem cell maintenance and differentiation by the transcription factor Escargot. *EMBO J* **33**, 2983-
565 2996 (2014).
- 566 41. Korzelius, J. *et al.* Escargot maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem
567 cells. *EMBO J* **33**, 2967-2982 (2014).
- 568 42. Stern, D.L. & Frankel, N. The structure and evolution of cis-regulatory regions: the shavenbaby story.
569 *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **368**, 20130028 (2013).
- 570 43. Jiang, H. *et al.* Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila*
571 Midgut. *Cell* **137**, 1343-1355 (2009).
- 572 44. Delon, I., Chanut-Delalande, H. & Payre, F. The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin
573 remodelling during epidermal differentiation in *Drosophila*. *Mech Dev* **120**, 747-758 (2003).
- 574 45. Zanet, J. *et al.* Pri sORF peptides induce selective proteasome-mediated protein processing. *Science* **349**,
575 1356-1358 (2015).
- 576 46. Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A. & Couso, J.P. Peptides encoded by short ORFs control
577 development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol* **5**, e106 (2007).
- 578 47. Andrews, J. *et al.* OVO transcription factors function antagonistically in the *Drosophila* female germline.
579 *Development* **127**, 881-892 (2000).
- 580 48. Antonello, Z.A., Reiff, T., Esther, B.-I. & Dominguez, M. Robust intestinal homeostasis relies on cellular
581 plasticity in enteroblasts mediated by *miR-8-Escargot* switch. *EMBO J.* **34**, 2025-2041 (2015).
- 582 49. Yang, M.Y., Wang, Z., MacPherson, M., Dow, J.A. & Kaiser, K. A novel *Drosophila* alkaline phosphatase
583 specific to the ellipsoid body of the adult brain and the lower Malpighian (renal) tubule. *Genetics* **154**, 285-
584 297 (2000).
- 585 50. Ma, M. *et al.* Wildtype adult stem cells, unlike tumor cells, are resistant to cellular damages in *Drosophila*.
586 *Dev Biol* **411**, 207-216 (2016).
- 587 51. Hay, B.A., Wolff, T. & Rubin, G.M. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*.
588 *Development* **120**, 2121-2129 (1994).
- 589 52. Payre, F. Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **48**, 207-215 (2004).
- 590 53. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491-505 (2010).
- 591 54. Staley, B.K. & Irvine, K.D. Hippo signaling in *Drosophila*: recent advances and insights. *Dev. Dyn.* **241**,
592 3-15 (2012).
- 593 55. Sansores-Garcia, L. *et al.* Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo
594 pathway. *EMBO J* **30**, 2325-2335 (2011).
- 595 56. Gaspar, P., Holder, M.V., Aerne, B.L., Janody, F. & Tapon, N. Zyxin antagonizes the FERM protein
596 expanded to couple f-actin and yorkie-dependent organ growth. *Current Biology* **25**, 679-689 (2015).
- 597 57. Shaw, R.L. *et al.* The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult
598 midgut regeneration. *Development* **137**, 4147-4158 (2010).
- 599 58. Staley, B.K. & Irvine, K.D. Warts and yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell
600 proliferation. *Current Biology* **20**, 1580-1587 (2010).
- 601 59. Oh, H. & Irvine, K.D. Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev Cell* **20**,
602 109-122 (2011).

- 603 60. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. & Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates
604 cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP. *Cell* **122**, 421-434
605 (2005).
- 606 61. Zhang, X., Milton, C.C., Poon, C.L., Hong, W. & Harvey, K.F. Wbp2 cooperates with Yorkie to drive
607 tissue growth downstream of the *Salvador-Warts-Hippo* pathway. *Cell Death Differ.* **18**, 1346-1355 (2011).
- 608 62. Oh, H. *et al.* Genome-wide association of Yorkie with chromatin and chromatin-remodeling complexes.
609 *Cell Rep* **3**, 309-318 (2013).
- 610 63. Zhang, C. *et al.* The ecdysone receptor coactivator Taiman links Yorkie to transcriptional control of
611 germline stem cell factors in somatic tissue. *Dev Cell* **34**, 168-180 (2015).
- 612 64. Poernbacher, I., Baumgartner, R., Marada, S.K., Edwards, K. & Stocker, H. Drosophila Pez acts in Hippo
613 signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Curr Biol* **22**, 389-396 (2012).
- 614 65. Tapon, N. *et al.* salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human
615 cancer cell lines. *Cell* **110**, 467-478 (2002).
- 616 66. Payre, F. & Desplan, C. RNA. Small peptides control heart activity. *Science* **351**, 226-227 (2016).
- 617 67. Pueyo, J.I., Magny, E.G. & Couso, J.P. New Peptides Under the s(ORF)ace of the Genome. *Trends Biochem*
618 *Sci* **41**, 665-678 (2016).
- 619 68. Karpowicz, P., Perez, J. & Perrimon, N. The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell
620 regeneration. *Development* **137**, 4135-4145 (2010).
- 621 69. Huang, Q. *et al.* Ubr3 E3 ligase regulates apoptosis by controlling the activity of DIAP1 in Drosophila.
622 *Cell Death Differ* **21**, 1961-1970 (2014).
- 623 70. Tang, Y., Feinberg, T., Keller, E.T., Li, X.Y. & Weiss, S.J. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ
624 control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat Cell Biol* **18**, 917-929 (2016).
- 625

626 **Acknowledgments**

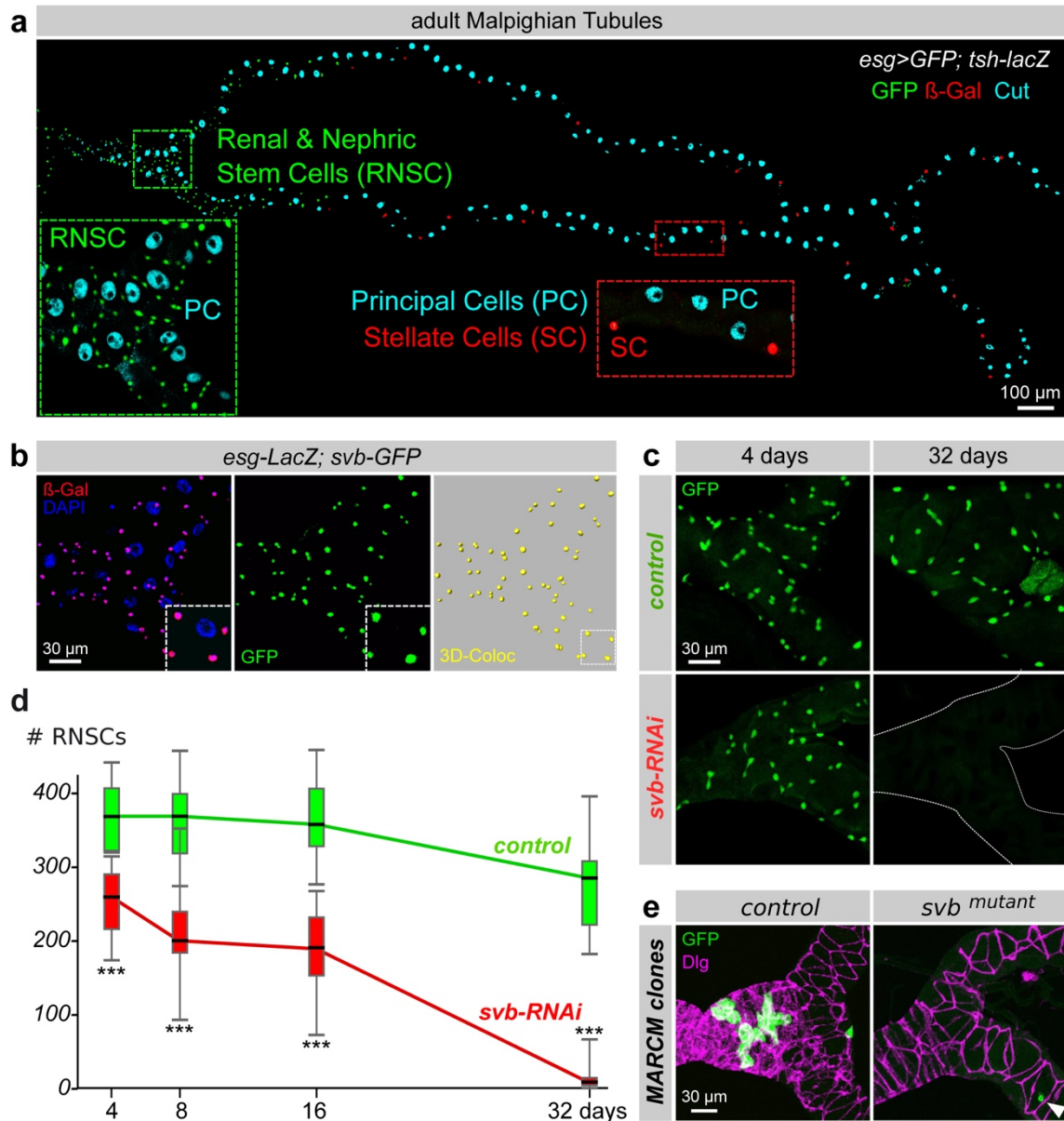
627 We are grateful to FlyBase, Bloomington and Vienna stock centers, Developmental Studies
628 Hybridoma Bank, as well as N. Tapon, J. Colombani, K.F. Harvey, D.J. Pan, J. Dow and H.
629 Skaer and M. Crozatier, for providing flies, antibodies and molecular reagents. We also thank
630 B. Ronsin (Toulouse RIO Imaging) for help with microscopy, A. Alsawadi, A. Dib, J. Zanet,
631 M. Soulard and P. Valenti for experimental support. We also thank all members of the Payre
632 lab for critical reading of the manuscript. This work was supported by ANR (Chrononet),
633 Fondation pour le Recherche Médicale (FRM), Programme Scientifique de Coopération
634 Internationale (PSCI) for D.O. and F.P., and by MEXT KAKENHI (JP26113006) for Y.K..
635 J.B. was supported by fellowships from “Ministère de l’Enseignement et de la Recherche”
636 and “La Ligue contre le Cancer.”

637 **Author Contributions**

638 C.P., S.P., Y.K., D.O. and F.P. conceived and directed the project, following initial
639 observations made by D.O.. J.B. carried out most of the experiments presented here, under the
640 supervision of C.P. and other experiments were conducted by C.P., K.A., Y.Y, S.I and D.O..
641 A.M.F analyzed NGS data. J.B., C.P., K.A., Y.Y., S.I., H.C.D., S.P., Y.K., D.O. and F.P.
642 analyzed data and contributed to their interpretation. J.B., C.P. and F.P. prepared the figures
643 and wrote the manuscript. All authors helped to write the paper.

644 **Competing financial interests.**

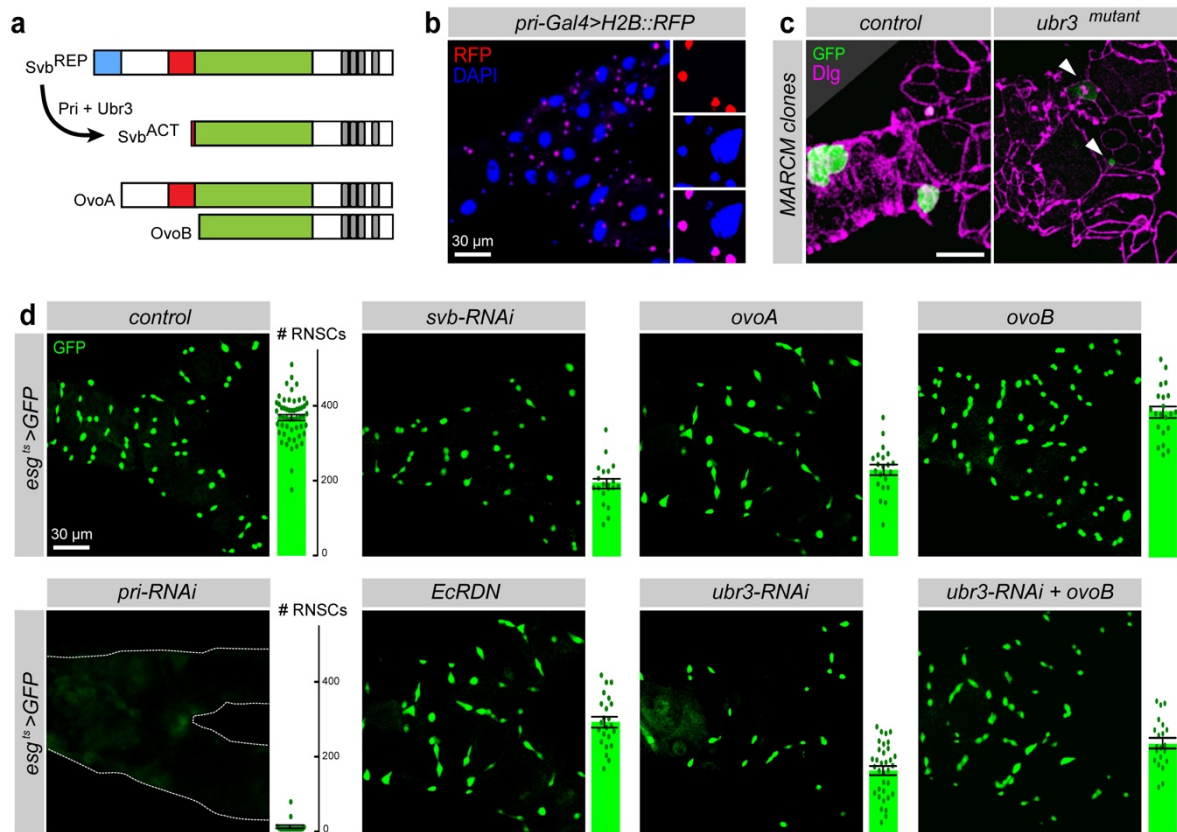
645 The authors declare having not competing financial interests.



646

Bohère *et al.*, Figure 1

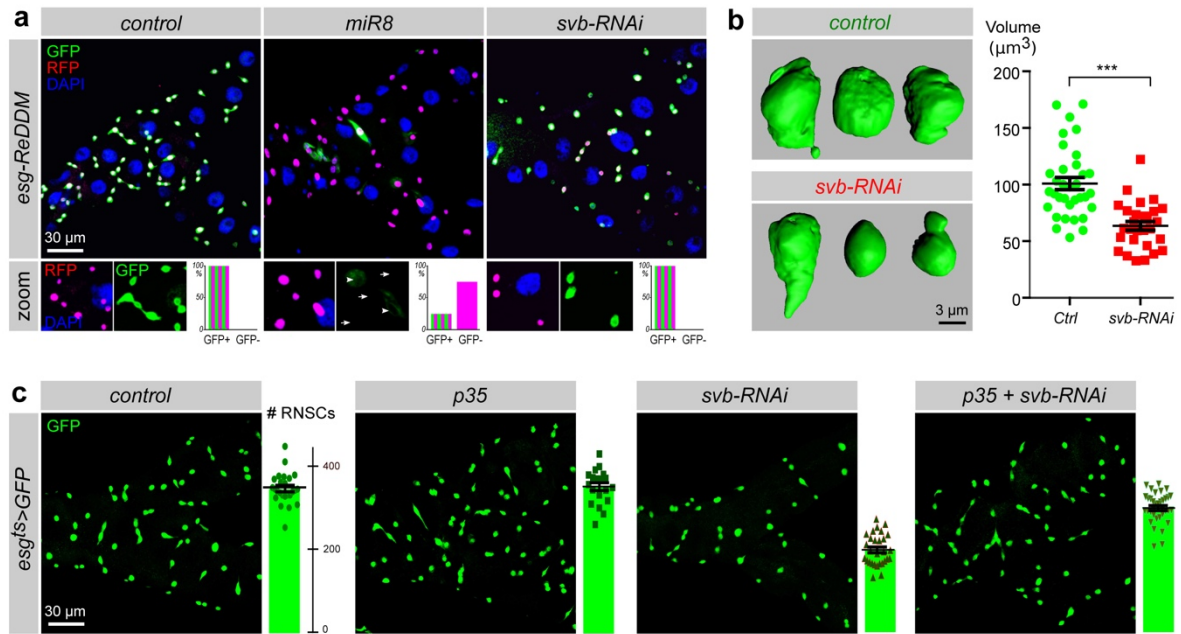
647 **Figure 1: *svb* is expressed in RNSCs and required for their maintenance.** (a) Adult Malpighian
 648 tubules are composed of three types of cells. Principal cells (PC) are identified by immunostaining
 649 against Cut (cyan) and stellate cells (SC) by *tsh-LacZ* (in red). RNSCs located in the lower tubules
 650 express *esg-Gal4*, *UAS-GFP* (green). (b) Fork region of the Malpighian tubules. The expression of *svb*
 651 and *esg* was monitored by the expression of *svb-E-GFP* (green) and *esg-LacZ* (red) enhancers,
 652 respectively. Nuclei were stained with DAPI (blue). (c) *esg^{ts}*-driven *svb-RNAi* leads to a progressive
 653 decrease in the number of RNSCs compared to control conditions (*esg^{ts}* driving only GFP). (d)
 654 Quantification of the number of RNSCs (*esg-GFP* positive) after 4, 8, 16 and 32 days of transgene induction
 655 in control (green) and *svb-RNAi* (red) conditions. (e) Genetic mosaics (MARCM) showing control and
 656 *svb^{R9}* clones, positively labelled with GFP (green) in the fork region of Malpighian tubules, 25 days after
 657 clone induction. The white arrowhead indicates the position of a *svb*-mutant cell.



658

Bohère *et al.*, Figure 2

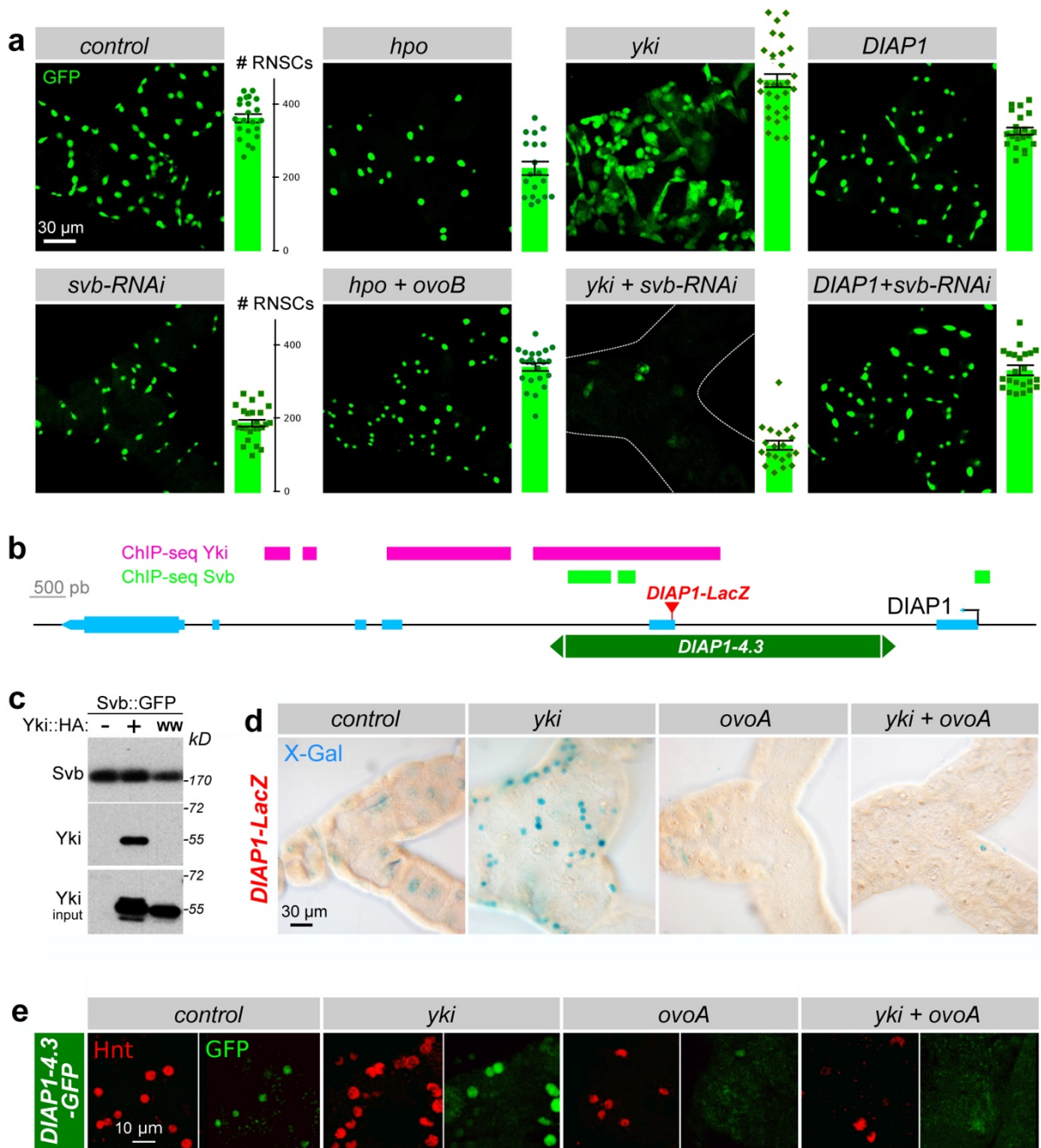
659 **Figure 2: Processing of Svb is essential for RNSC maintenance.** (a) Schematic representation of
 660 Svb maturation, as well as the germinal isoforms OvoA and OvoB that act as constitutive (*pri*-
 661 independent) repressor and activator, respectively. (b) Expression of *pri* monitored by the activity of *pri*-
 662 *Gal4* driving the expression of H2B::RFP (red). The nuclei (DAPI) are in blue. (c) MARCM clones of
 663 control and *ubr3^B* cells, 25 days after induction. Arrowheads indicate positions of *ubr3* mutant cells. (d)
 664 Fork region of Malpighian tubules, with *esg^{ts}*-driven expression of GFP and the indicated transgenes,
 665 after 8 days of induction. Quantification of the number of *esg*⁺ cells *per* tubule is indicated on the right
 666 of each picture (see also Supplementary Figure 2).



Bohère *et al.*, Figure 3

667

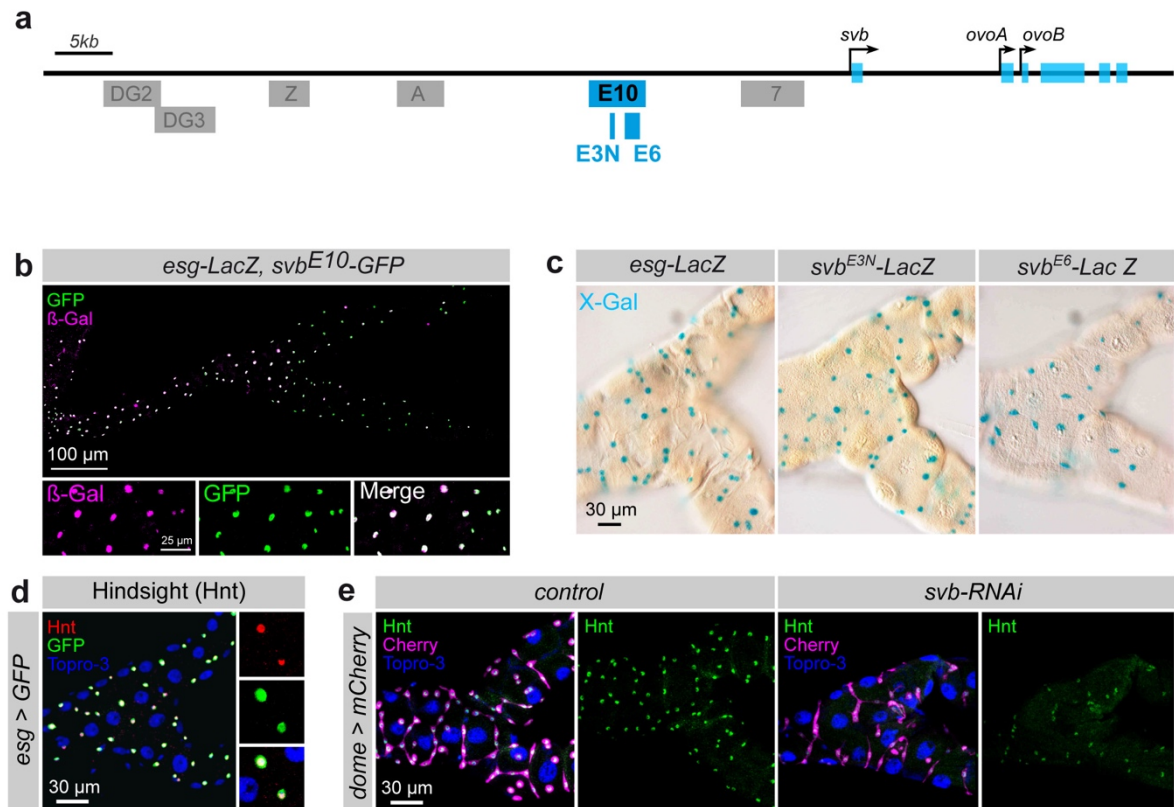
668 **Figure 3: *svb* protects RNSCs from apoptosis.** (a) Lineage-tracing experiments (*esg*-ReDDM) at 8
 669 days after induction. While RNSCs express both mCD8::GFP (green) and H2B::RFP (red), only the
 670 stable H2B::RFP protein persists in their progeny. Nuclei are in blue (DAPI). RFP positive cells that lack
 671 or display remnants of GFP levels are indicated by arrows and arrowheads, respectively. (b) Left,
 672 three-dimensional reconstruction of 3 different RNSCs in *control* (*esg^{ts}>GFP*) and *svb-RNAi* contexts. Pictures
 673 show GFP after 8 days of treatment. Right, quantification of the RNSC volume in *control* (*Ctrl*, green)
 674 and *svb-RNAi* conditions. (c) Rescue of *svb*-depleted RNSCs by *p35*. *esg^{ts}* was used to drive the
 675 expression of indicated transgenes (together with GFP), during 8 days. Quantification of *esg*+ cells is
 676 shown at the right of each picture.



677

Bohère *et al.*, Figure 4

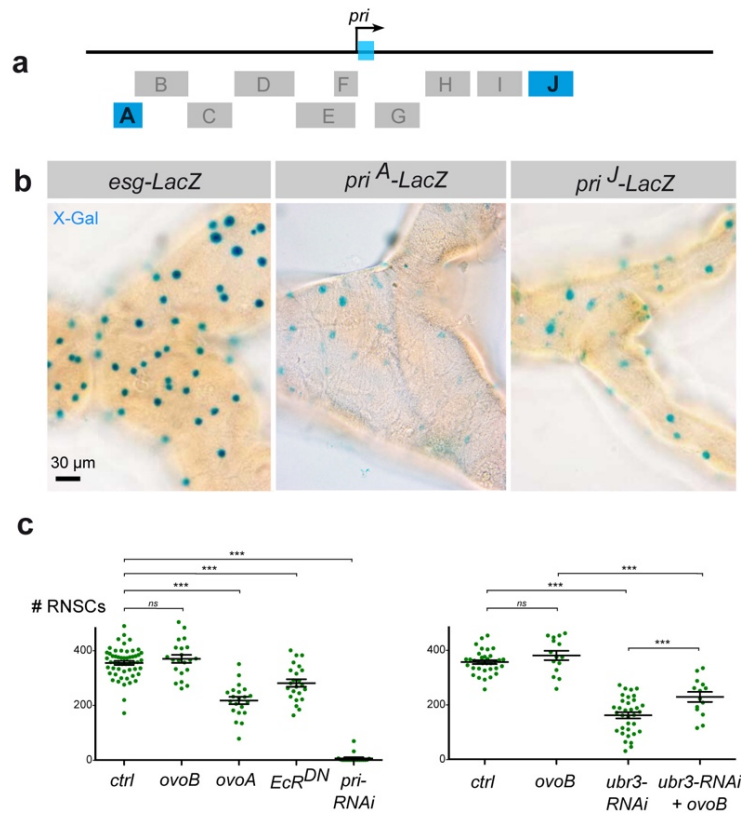
678 **Figure 4: *svb* is a member of the Hippo pathway.** (a) Pictures of Malpighian tubules with *esg^{ts}*-driven
679 expression of GFP (control) and indicated transgenes. Quantification of *esg⁺* cells is given on each
680 picture (see also Supplementary Figure 3f). (b) Drawing of the *DIAP1* locus. Exons are represented in
681 cyan, the *DIAP1-4.3* enhancer in dark green and the insertion site of the *DIAP1-LacZ* reporter (J5C8) is
682 in red. Regions bound in ChIP-seq (MACS peaks) by Svb and Yki are indicated in green and magenta,
683 respectively. (c) Svb co-immuno-precipitates with Yki in S2 cells. Svb::GFP and Yki::HA, or a mutated
684 form of Yki substituting the WW domains (Yki^{WW}::HA), were expressed in S2 cells. Protein immuno-
685 precipitated by anti-GFP were blotted with anti-GFP and anti-HA antibodies. (d) *esg^{ts}* was used to drive
686 the expression of *yki*, *svb^{REP}* (*ovoA*), and *yki* together with *svb^{REP}* in RNSCs. The expression of *DIAP1*
687 was followed by the activity of *DIAP1-lacZ*. (e) Expression of the *DIAP1-4.3-GFP* enhancer was followed
688 by immuno-staining against GFP (green) and Hindsight (Hnt, red) revealing the antagonistic influence
689 of Yki and OvoA on RNSCs.



690

Bohère *et al.*, Figure Supp 1

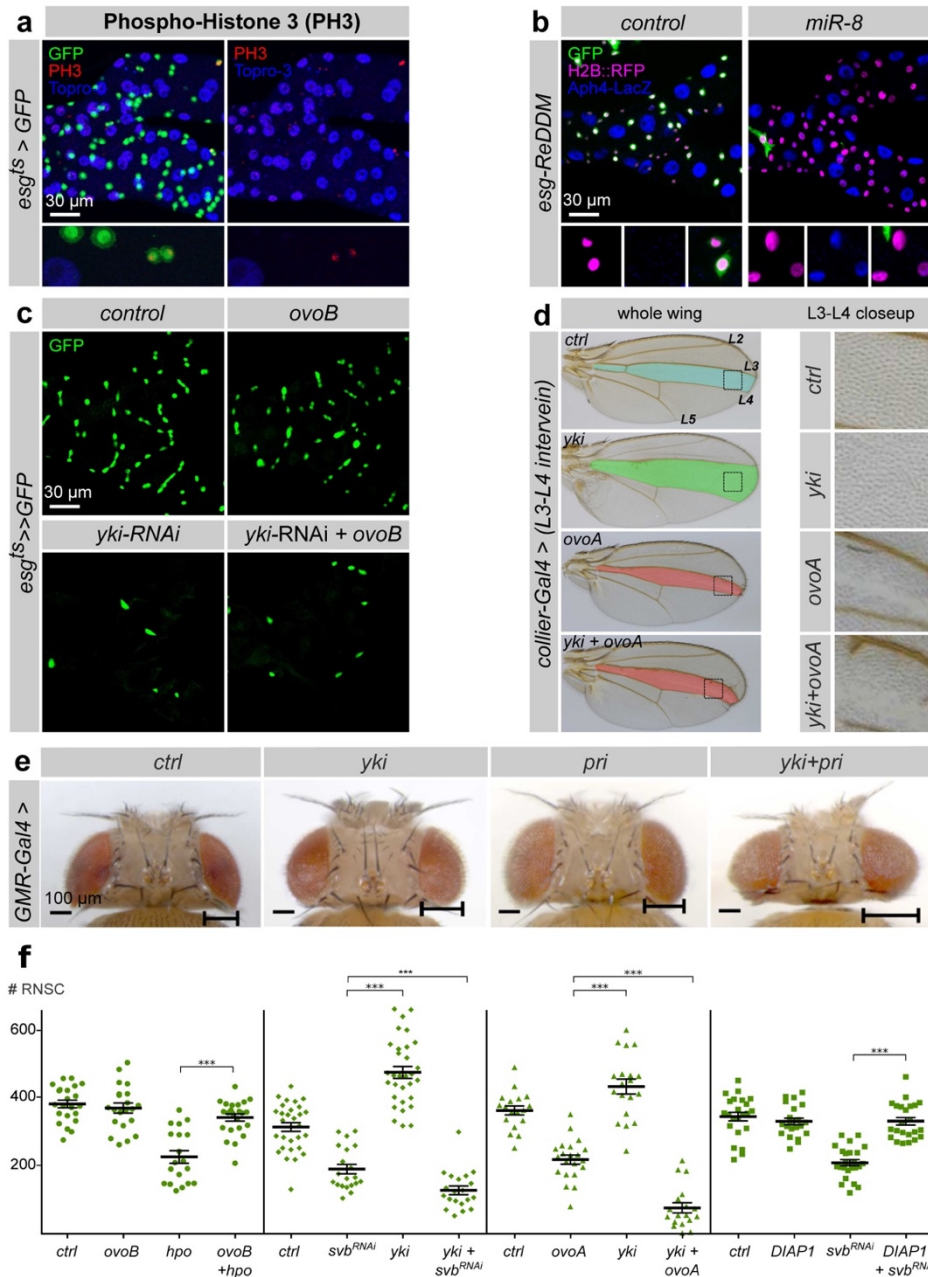
691 **Supplementary Figure 1: *svb* is expressed in RNSCs.** (a) Schematic representation of the *svb* locus,
 692 with validated enhancers indicated as boxes; those driving expression in RNSCs are in blue. (b) The
 693 *svb^{E10}* enhancer (*svb^{E10}-GFP*) is active in RNSCs, as shown by co-expression with *esg-LacZ* (red). (c)
 694 The shorter elements *svb^{E3N}* and *svb^{E6}* are each sufficient to drive expression in RNSCs, as revealed
 695 by X-Gal staining and comparison with *esg-lacZ*. (d) The transcription factor Hindsight (Hnt, red) is
 696 expressed in *esg+* RNSCs (green). (e) *Dome-meso-Gal4* drives specific expression (mCherry,
 697 magenta) in RNSCs, as shown by colocalization with Hnt (green). *Dome-meso*-driven expression of
 698 *svb-RNAi* leads to a strong reduction in the number of Hnt-positive RNSCs. Nuclei are in blue.



Bohère *et al.*, Figure Supp2

699

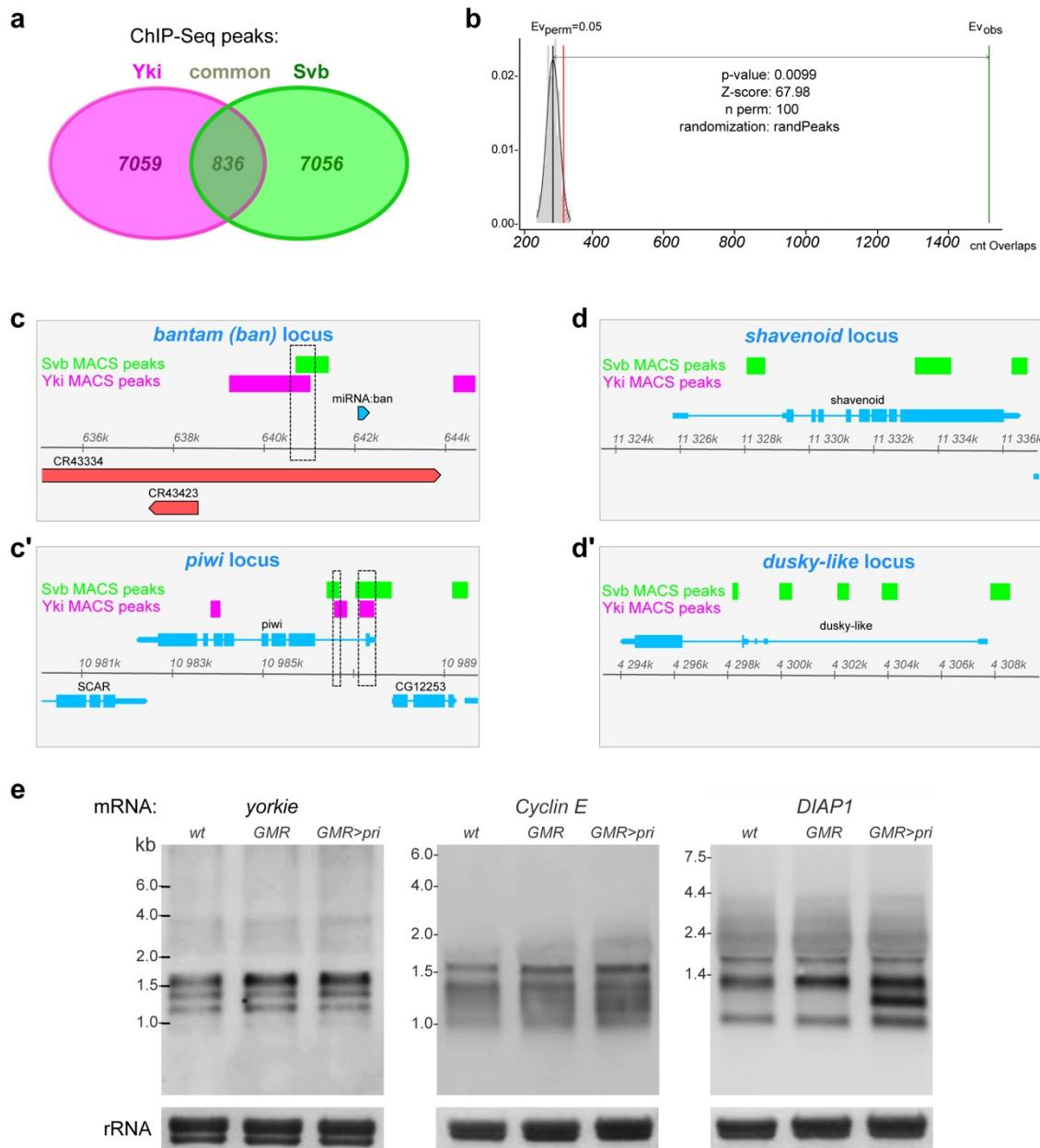
700 **Supplementary Figure 2: *pri* enhancers are active in RNSCs.** (a) Drawing of the *pri* locus, with the
 701 *pri^A* and *pri^J* enhancers (blue) that are both active in the RNSCs. (b) Fork region of Malpighian tubules
 702 of the indicated genotype; X-Gal staining reveals the activity of *pri^A* and *J* enhancers in a subset of
 703 RNSCs in comparison to the *esg-LacZ* reporter. (c) Quantification of the data presented in Figure 2.
 704 *esg^{fs}* expression of the indicated transgenes (8 days of induction). Left: effect of the constitutive activator
 705 (OvoB) and repressor form (OvoA) of Svb, a dominant negative form of the Ecdysone receptor (EcRDN)
 706 and well as *pri*-RNAi. Right: Rescue of *ubr3* loss of function by the activator form of Svb (OvoB).



707

Bohère et al., Figure Supp 3

708 **Supplementary Figure 3: genetic interaction between Svb and components of the Hippo**
 709 **pathway. (a)** Fork region of the Malpighian tubules, with RNSCs marked by *esg-Gal4>GFP* (green) and
 710 mitotic cells by immuno-staining against phosphorylated-Histone 3 (H3P, red). Nuclei were stained by
 711 Topro-3 (blue). The bottom panels show a closeup of two RNSCs undergoing mitosis. **(b)** *esg-REDDM*
 712 lineage-tracing with or without *mir8* expression. RNSCs display a green cytoplasm (GFP) and a magenta
 713 nucleus (H2B::RFP), while their progeny maintain only the stable H2B-RFP signal. Principal Cells also
 714 express the *Aph4-LacZ* reporter (blue). **(c)** *esg^{ts}* was used to drive the expression of the indicated
 715 transgenes, for 8 days. Expression of *OvoB* had not significant effect, in contrast to *yki-RNAi* that induces
 716 a drastic drop in the RNSC number. This phenotype was not rescued by the co-expression of *OvoB*. **(d)**
 717 Adult wings expressing the indicated transgenes under the control of *col-Gal4*, a driver active in the L3-
 718 L4 region. **(e)** Adult head cases dissected from flies expressing the indicated transgenes in the eye,
 719 under the control of *GMR-Gal4*. **(f)** Quantification of the data presented in Figure 4A.



720

Bohère *et al.*, Figure Supp 4

721 **Supplementary Figure 4: Interactions between Svb and Yki in the control of target gene**
 722 **expression.** (a) Venn diagram representing the genome-wide intersection between Yki and Svb ChIP-
 723 seq peaks, in pink and green, respectively. (b) Comparison of the observed intersection (Ev_{obs}) between
 724 Yki and Svb ChIP-seq peaks *versus* a series of 100 randomly permuted (Ev_{perm}) samples, indicating
 725 the significance of the observed intersection (p<0,01). (c-d') Location of Svb and/or Yki binding sites on
 726 *bantam*, *piwi*, *singed* and *dusky-like* loci. MACS peaks of Svb and Yki are in green and magenta,
 727 respectively. (e) Northern blots of adult head mRNAs revealing the expression of *yorkie*, *Cyclin E* and
 728 *DIAP1* in *wild-type* (wt), *GMR-Gal4* (*GMR>*) and *GMR-Gal4, UAS-pri* (*GMR>pri*) flies.

V- Résultats supplémentaires et conclusion

Le manuscrit présenté ci-avant et soumis au journal Nature Communications illustre donc que l'activité de *Svb* est essentielle au maintien des cellules souches rénales (CSR) au cours du temps. Ces données sont soutenues par les résultats obtenus dans l'intestin par Dani Osman et Sandy Al Hayek auquel j'ai aussi participé dans une moindre mesure. La seule différence majeure entre les 2 organes est l'activité de la forme activatrice de *Svb* (mimée par l'expression forcée de *OvoB*). Dans l'intestin, à l'inverse des tubules de Malpighi, la surexpression d'*OvoB* pousse les cellules souches intestinales vers la prolifération de façon similaire à un gain de fonction pour la protéine Yorkie tandis que dans les tubules de Malpighi, elle n'a pas d'effet sur le nombre de cellules souches rénales.

Si nous avons choisi pour le rein de pousser plus avant les mécanismes moléculaires qui permettent d'expliquer la fonction anti-apoptotique de *Svb*, l'étude dans l'intestin et cela de manière complémentaire est d'avantage centrée sur le mode de régulation de *svb* dans les cellules souches.

1- Comment est régulée l'expression de *shavenbaby* dans les cellules souches rénales ?

L'étude du mode de régulation de l'expression de *svb* dans l'épiderme a permis de démontrer que ses différents *enhancers* intègrent les voies de signalisation EGF, Notch, Wg et Hh, afin de réguler son expression spatiale (Arif et al., 2015; Payre et al., 1999). Ces observations suggèrent que *svb* pourrait aussi jouer le rôle d'intégrateur de ces voies de signalisation dans les cellules souches somatiques dont les CSR. Certaines données additionnelles acquises au sein de l'équipe et par moi-même, corroborent cette hypothèse. Ahmad Alsawadi durant sa thèse a identifié par des analyses de prédiction de sites de fixation de facteurs de transcription, la présence de sites de fixation consensus pour les protéines Pangolin (Pan) et Pointed (Pnt), dans l'*enhancer* E3 de *svb*. Ces facteurs sont les effecteurs nucléaires respectifs des voies de signalisation Wg et EGF (Morimoto et al., 1996; Schweizer et al., 2003). Des mutations ponctuelles introduites dans ces sites de

fixation consensus de Pan et Pnt au sein de l'enhancer E3 abolissent ou réduisent respectivement son activité dans les CSR (Figure 19). Il en est de même dans l'intestin. De plus, la surexpression d'une forme dominante négative de *pan* provoque une diminution du nombre de CSR comparable à la perte de fonction de *svb*. Pour conclure l'ensemble de nos données (intestin et rein) soutien que *svb* intègre au niveau de l'enhancer E3, les voies de signalisation EGF et Wg afin de réguler son expression dans les CSR. A ce jour les outils disponibles pour l'enhancer E6 sont moins performants et il serait intéressant d'étendre cette analyse à ce fragment afin de caractériser son mode de fonctionnement identique ou différent de l'enhancer E3. La redondance probable d'activité de ces 2 enhancers sera évoquée dans la discussion.

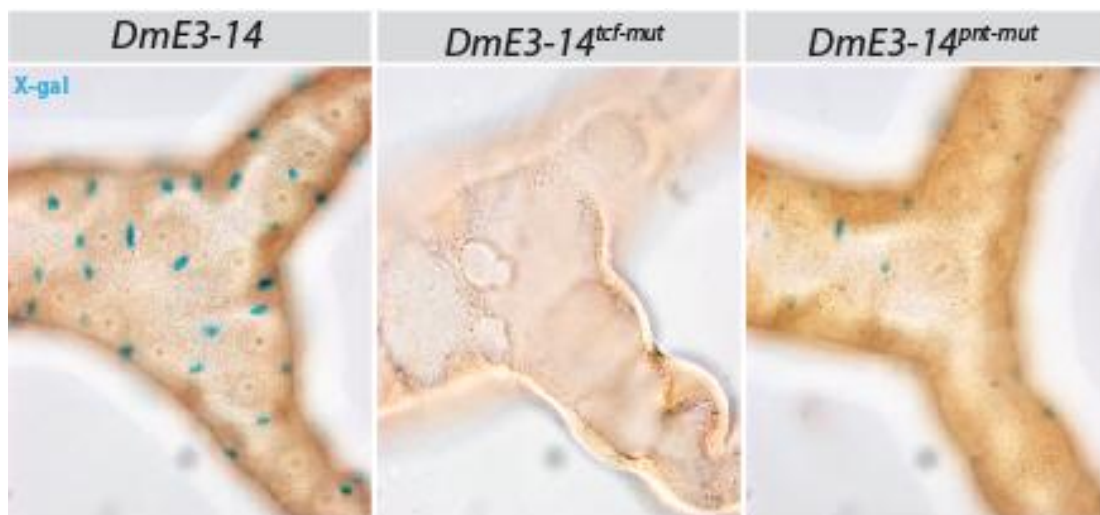


Figure 19 : Les voies de signalisation EGF et Wg régulent l'activité de l'enhancer E3-14 de *shavenbaby* dans les cellules souches rénales : Effet de la mutation des sites de fixation du facteur de transcription, effecteur de la voie Wg, Pangolin (*DmE3-14^{tcf-mut}*, cadre du milieu) et du facteur de transcription, effecteur de la voie de signalisation EGF, Pointed (*DmE3-14^{pnt-mut}*, cadre de gauche) sur l'activité normale de l'enhancer E3-14 de *svb* (*DmE3-14*, cadre de gauche) 8 jours après éclosion de la Drosophile adulte.

2- L'ecdysone contrôle-t-elle la temporalité de l'expression de polished-rice dans les cellules souches rénales ?

Nos travaux, tout comme ceux de Dani et Sandy, ont permis de montrer que la maturation de Svb orchestrée par les peptides Pri est aussi requise pour la fonction de Svb dans les cellules souches somatiques. De façon analogue à *svb*, l'étude de l'activité de différents enhancers de ce gène suggère que *pri* est spécifiquement exprimé dans les CSR. En plus

des *enhancers priA* et *priJ*, nous avons identifié deux autres régions *cis*-régulatrices de *pri*, *priH* et *priJ*, actives elles aussi dans les CSR. Individuellement ces 4 *enhancers* ne semblent pas être actifs dans toutes les CSR et il serait intéressant de déterminer si collectivement ils permettent une expression de *pri* dans toutes les CSR. Nous avons également voulu déterminer si la voie de signalisation ecdysone participe à la régulation des peptides Pri. Une première indication positive vient du fait que l'expression d'une forme dominante négative du récepteur à l'ecdysone (EcR) réduit le nombre de CSR. La surexpression de cette forme dominante négative de EcR abolit l'activité des *enhancers priH* et *J*, soutenant que l'expression de *pri* dans les CSR est, comme dans l'épiderme, sous le contrôle la signalisation ecdysone (Figure 20). Azza Dib durant sa thèse a pu caractériser l'existence de deux sites de fixation putatifs pour EcR nécessaires à l'activité épidermique de l'*enhancer priA*. Il serait intéressant d'observer l'effet de la mutation de ces sites ainsi que de la surexpression de EcRDN sur l'activité de cet *enhancer*. L'ensemble des données obtenues apporte des évidences supplémentaires pour dire que l'expression de *pri* est régulée par l'ecdysone dans les CSR. Je discuterai par ailleurs des perspectives de ces observations dans la partie discussion.

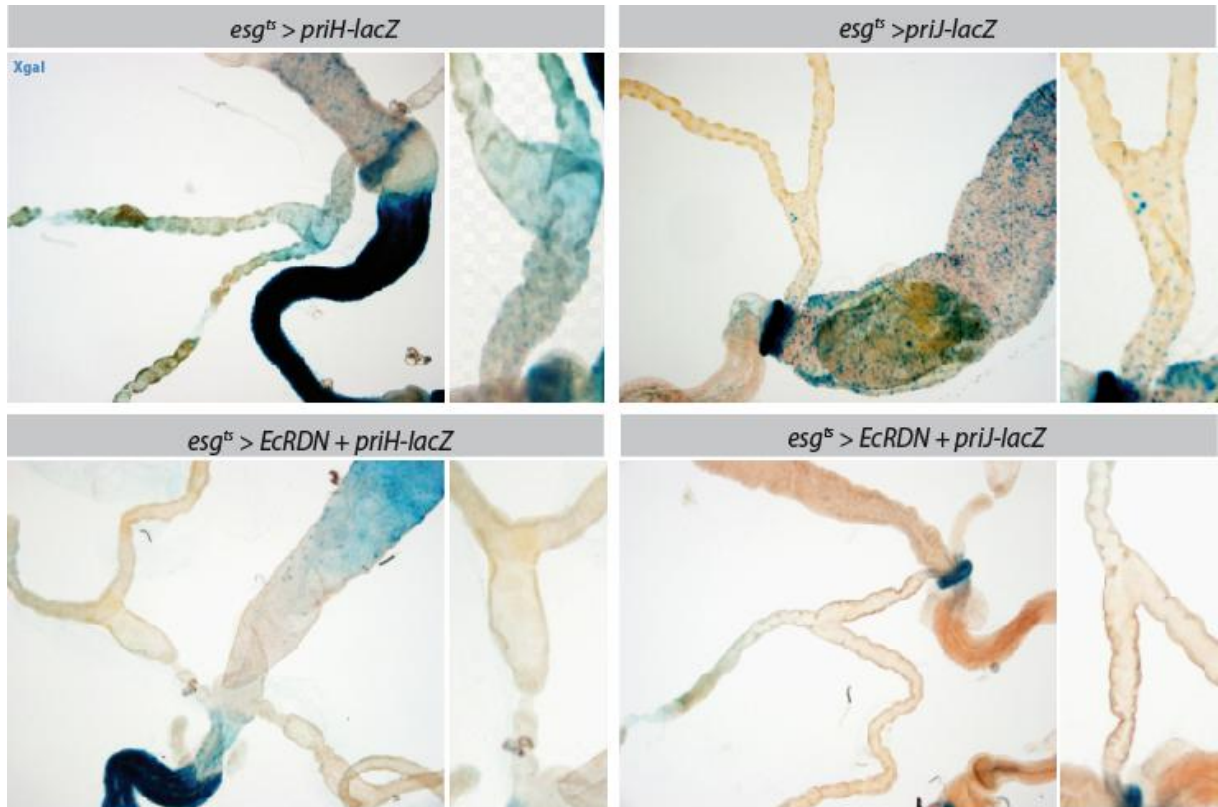


Figure 20 : Le récepteur à l'ecdysone EcR régule l'activité des *enhancers priH* et *priJ* dans les cellules souches rénales :

Activité des *enhancers priH* (cadres de gauche) et *priJ* (cadres de droite) révélé par coloration Xgal dans les tubules de Malpighi en conditions normale ($esg^{ts} > priH-lacZ$, $esg^{ts} > priJ-lacZ$ cadres du haut) ou après surexpression dans les cellules souches rénales d'une forme dominante négative de EcR ($esg^{ts} > EcRDN + priH-lacZ$, $esg^{ts} > EcRDN + priJ-lacZ$ cadres du bas) pendant 8 jours.

3- Comment visualiser directement l'apoptose dans les cellules souches rénales ?

La fonction précise de *svb* est d'inhiber l'apoptose dans les CSR. En effet, nous démontrons que la diminution du nombre de CSR provoquée par la perte de fonction de *svb* est sauvée par l'expression ectopique ou la surexpression des inhibiteurs d'apoptose *p35* et *DIAP1*. Afin de confirmer ces résultats nous avons entrepris d'utiliser différentes techniques (immunomarquage anti-caspases, utilisation de senseurs d'apoptose fournis par les laboratoires de Magali Suzanne et de Jean Paul Vincent) pour visualiser les cellules apoptotiques et confirmer l'entrée en apoptose précoce en absence de *svb*. Nous avons malheureusement rencontré des difficultés techniques probablement inhérente au tissu car même dans un contexte de surexpression du gène pro-apoptotique *reaper*, qui provoque une diminution progressive du nombre de CSR (disparition totale après 8 jours dans nos mains), nous n'avons pas pu observer une augmentation des signaux apoptotiques à l'aide de ces techniques. Même si nos données sont robustes et convergentes, nous pensons qu'il est important de visualiser l'apoptose dans les CSR afin de conforter notre modèle selon lequel *Svb* protège les CSR de l'apoptose. Pour ce faire, nous allons utiliser la technique de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase -mediated dUTP Nick End Labeling) qui permet d'observer les cassures double brins de l'ADN lors de l'apoptose.

4- L'expression de *shavenbaby* est elle régulée par *Yorkie* pour assurer la survie des cellules souches rénales ?

En étudiant les mécanismes génétiques impliqués dans la fonction anti-apoptotique de *svb* au sein des CSR, nous avons pu montrer que *Svb* est épistatique à la voie de signalisation Hippo. Suite aux interactions génétiques que nous avons effectuées, nous sommes arrivés à la conclusion que *svb* agit en parallèle ou en aval de *yorkie* (*yki*) et en amont de *DIAP1*. Nous pensions initialement que *Yki* pouvait réguler l'expression de *svb*, hypothèse soutenue par la présence de sites de fixation pour le facteur de transcription, et partenaire de *Yki*, *Scalloped* au sein de l'*enhancer* E3. Nous avons aussi montré que la surexpression de *Yki* dans les CSR provoquait une activité plus forte de l'*enhancer* E. Cependant, comme la surexpression de *Yki* conduit à une surprolifération des CSR, il était pour nous difficile d'interpréter ces résultats. Nous nous sommes donc tournés vers le disque d'aile où *yki* et *svb* sont tous les deux exprimés de façon endogène (Delon et al., 2003). Un des principaux avantages de ce modèle est la possibilité grâce à différents promoteurs d'induire l'expression ou la perte de fonction d'un gène dans une région

réduite du disque d'aile pour comparer l'effet de cette modification avec le reste du tissu qui est sauvage. La surexpression de *yki* sous la dépendance du promoteur de *engrailed* (*en*), permettant une expression dans le compartiment postérieur du disque d'aile (Garcia-Bellido et al., 1973), bien qu'entraînant une surprolifération du dit compartiment, n'affecte pas de façon significative l'activité de l'enhancer E (Figure 21). De plus, dans les mêmes conditions, aucune modification significative du niveau d'expression de l'ARNm de *svb* n'a été observé lors de la surexpression de YKi (Zhang et al., 2015). L'ensemble des résultats acquis au cours de ma thèse soutient que *svb* agit au même niveau que *yki* et que les deux protéines agissent de concert pour activer la transcription d'un groupe de gènes dont *DIAP1*.

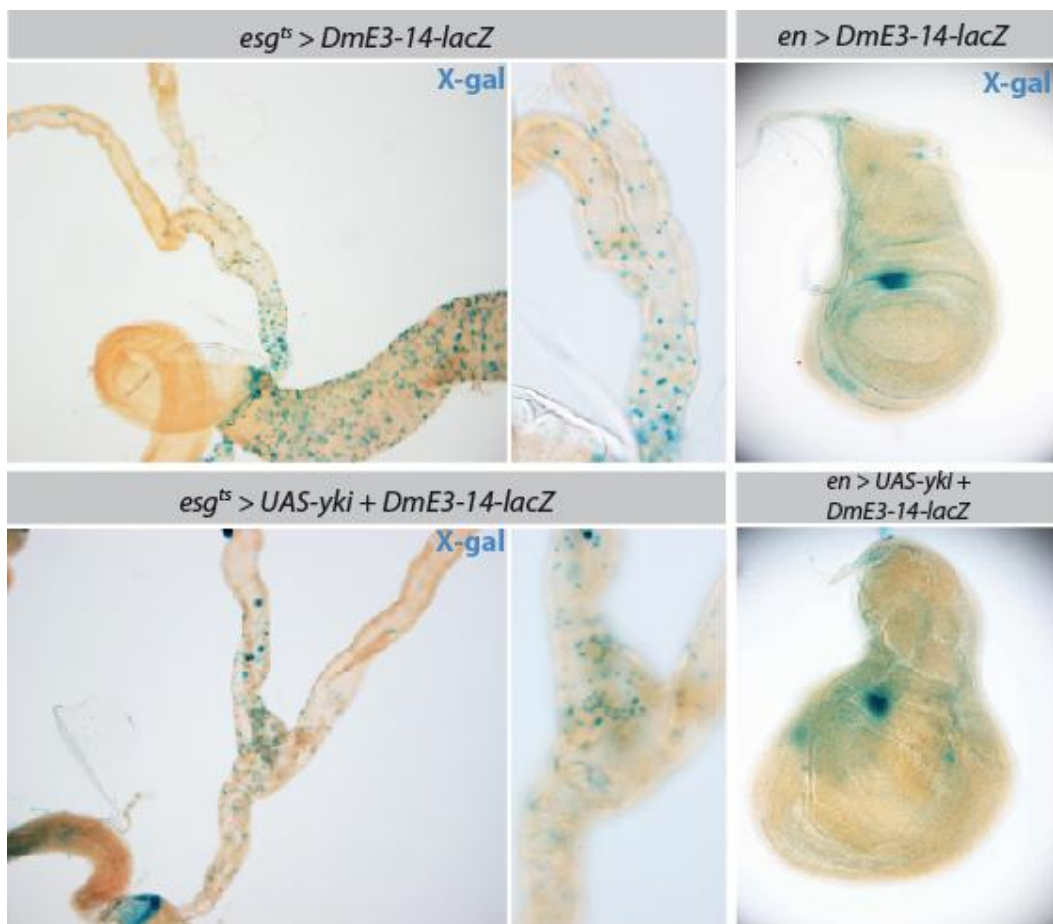


Figure 21 : Yki ne semble pas impliqué dans la régulation de l'expression de *svb* dans les cellules souches rénales et le disque imaginal d'aile :

Activité de l'enhancer E3-14 de *shavenbaby* révélée par coloration X-gal dans les tubules de Malpighi (*esg^{ts} > DmE3-14-lacZ*, cadre du haut à gauche) et le disque imaginal d'aile de larve L3 (*en > DmE3-14-lacZ*, cadre du haut à droite).

Effet de la surexpression de *yki* pendant 8 jours dans les cellules souches rénales (*esg^{ts} > UAS-Yki + DmE3-14-lacZ*, cadre du bas à gauche) et dans la partie postérieure du disque imaginal d'aile de larve L3 (*en > UAS-yki + DmE3-14-lacZ*, cadre du bas à droite) sur l'activité de l'enhancer E3-14 révélée par coloration X-gal.

5- Quels sont les gènes cibles de Shavenbaby dans les cellules souches rénales ?

Nos données suggèrent que le complexe protéique Svb/Yki régule directement l'expression de *DIAP1*. Les deux protéines interagissent physiquement et se lient à l'ADN sur des régions chevauchantes dans les séquences *cis*-régulatrices de *DIAP1* et plus précisément au sein de *l'enhancer 4.3* (Zhang et al., 2008). La recherche de motifs de fixation spécifiques de la forme somatique de Ovo (*i.e.* Svb) (Menoret et al., 2013) nous a permis d'identifier deux de ces sites de fixation dans *l'enhancer 4.3* de *DIAP1*. L'existence de ces deux sites est soutenue par une dizaine de sites dit Ovo, plus caractéristiques de la forme germinale mais aussi sélectifs que le site Svb, dont la présence est un bon signe de l'influence de Svb sur l'expression des gènes sur lesquels ils s'accumulent (Menoret et al., 2013). Afin de valider l'influence directe de Svb sur l'expression de *DIAP1*, il est donc envisageable de muter spécifiquement ces sites de fixation à Svb et de tester leur contribution dans la régulation de l'expression de *DIAP1*. Une manière plus ambitieuse d'appréhender ou de valider la fonction de Svb au sein des CSR serait de réaliser des analyses transcriptomiques (RNA-seq) spécifiques aux CSR en conditions sauvages et mutantes pour *svb*. Nous aurions ainsi accès à l'ensemble des gènes régulés par Svb dans les CSR.

En conclusion, les résultats présentés dans la publication ajoutés aux évidences présentées ici convergent vers le modèle suivant : Svb protège les CSR de l'apoptose en interagissant physiquement avec Yki pour activer l'expression du gène anti-apoptotique *DIAP1*. Mes travaux de thèse soutiennent que les facteurs de la famille OvoL puissent être impliqués dans la régulation des cellules de type souche depuis les planaires (Cross et al., 2015; Lapan and Reddien, 2012) jusqu'aux mammifères (Kim et al., 2014; Kitazawa et al., 2016; Lee et al., 2014). A la lueur de ces résultats, il serait intéressant de tester si les protéines OvoL et les protéines YAP/TAZ (orthologues de Yki chez les vertébrés) sont capables d'interagir et de contrôler de concert l'activité des cellules souches somatiques.

Discussion

I- Le « shadowing » dans les cellules souches somatiques

Une des questions fondamentales à la compréhension des mécanismes qui soutiennent le développement d'un organisme est d'appréhender ce qui détermine l'expression génétique. Les informations nécessaires à l'expression d'un gène donné dans un territoire particulier sont contenues dans le génome. Ainsi, les gènes clés du développement des métazoaires contiennent de longues séquences d'ADN localisées en amont et/ou dans les séquences introniques, jouant un rôle déterminant dans l'expression de ces gènes. La plupart de ces séquences sont courtes et nombre d'*enhancers* ont pu être mis en évidence par des approches classiques de transgènes. Ainsi, placés en amont d'un promoteur minimal et d'un gène rapporteur, l'activité des *enhancers* est capable de récapituler une partie du profil endogène duquel ils sont issus. L'activité des *enhancers* est générée par la présence de motifs de fixation reconnus par des facteurs de transcription (FT). Chez la Drosophile, ces *enhancers*, à quelques exceptions près dont *shavenbaby* fait partie, sont localisés dans le premier intron et/ou juste en amont (moins de 10kb) du gène dont ils contrôlent l'expression (Levine, 2010). La vision simpliste qui a longtemps perduré était qu'un *enhancer* soutenait l'expression d'un gène dans un territoire donné, un deuxième *enhancer* dans un autre territoire et ainsi de suite. Au milieu des années 2000, l'étude par des approches globales (ChiP) des mécanismes génétiques impliqués dans les programmes développementaux, comme la mise en place de l'axe Dorso/Ventral de l'embryon, ont permis de révéler qu'un FT peut se fixer sur deux régions « *enhancers* » distantes de plusieurs kb pour un même gène cible (Zeitlinger, Gene and dev 2007). Cette découverte étendue depuis à des gènes régulant la segmentation de l'embryon a permis l'apparition d'un nouveau concept, celui de « shadow » *enhancer* (Lagha et al., 2012). Ainsi, deux *enhancers*, un *enhancer* « pionnier » et l'*enhancer* « shadow », dirigent l'expression du gène dans un même territoire assurant ainsi la forte robustesse de l'expression génétique et donc celles des programmes développementaux qui en découlent (Lagha et al., 2012). La présence de deux *enhancers* distincts permettrait donc de faire face aux variations environnementales (changement de température) ou génétique (mutations) qui peuvent influencer sur l'efficacité de fixation des FT sur leurs *enhancers*.

1- Redondance et robustesse du programme épidermique gouverné par shavenbaby :

Le locus du gène *shavenbaby* (*svb*), bien que complexe et étendu sur 150kb, s'est avéré être un bon paradigme pour étudier l'activité et l'évolution des *enhancers* (Stern and Frankel, 2013). Ces différentes études ont conduit à l'identification d'activité « shadow » au sein des *enhancers* identifiés. Sur les 150 kb participant à la régulation de l'expression de *svb*, 7 *enhancers* ont été mis en évidence et ils récapitulent tous ensemble le domaine spatial d'expression de ce gène au sein de l'épiderme embryonnaire (Stern and Frankel, 2013) (Figure 22A). Les *enhancers* DG2, DG3 et Z ont été identifiés suite à l'observation de régions génomiques évolutivement conservées chez les Drosophilidae (Frankel et al., 2010). Les *enhancers* DG2 et Z additionnels présentent des domaines d'activité redondants dans la région dorsale avec les *enhancers* 7, E6 et A. DG3 est lui actif dans la région ventrale, recouvrant les domaines E3 et 7. La délétion des *enhancers* DG2, DG3 et Z ne provoque pas de réduction du nombre de trichomes lorsque les embryons se développent à une température optimale (25°C). Cependant les embryons exposés à des températures extrêmes (32°C) présentent une diminution du nombre de trichomes au niveau dorsal (Frankel et al., 2010) (Figure 22B). Ceci montre que les *enhancers* DG2 et Z assurent une certaine robustesse au patron d'expression de *svb* en condition de stress. A l'inverse, la déplétion de l'*enhancer* DG3 n'a aucun effet sur la formation des trichomes ventraux où les *enhancers* E3 et 7 sont déjà actifs. L'existence d'*enhancer* redondant ou « shadow » permet donc d'assurer un support fonctionnel et complémentaire à l'activité des autres *enhancers* dorsaux, et confère à l'expression d'un gène une certaine résistance et robustesse face aux variations environnementales et génétiques.

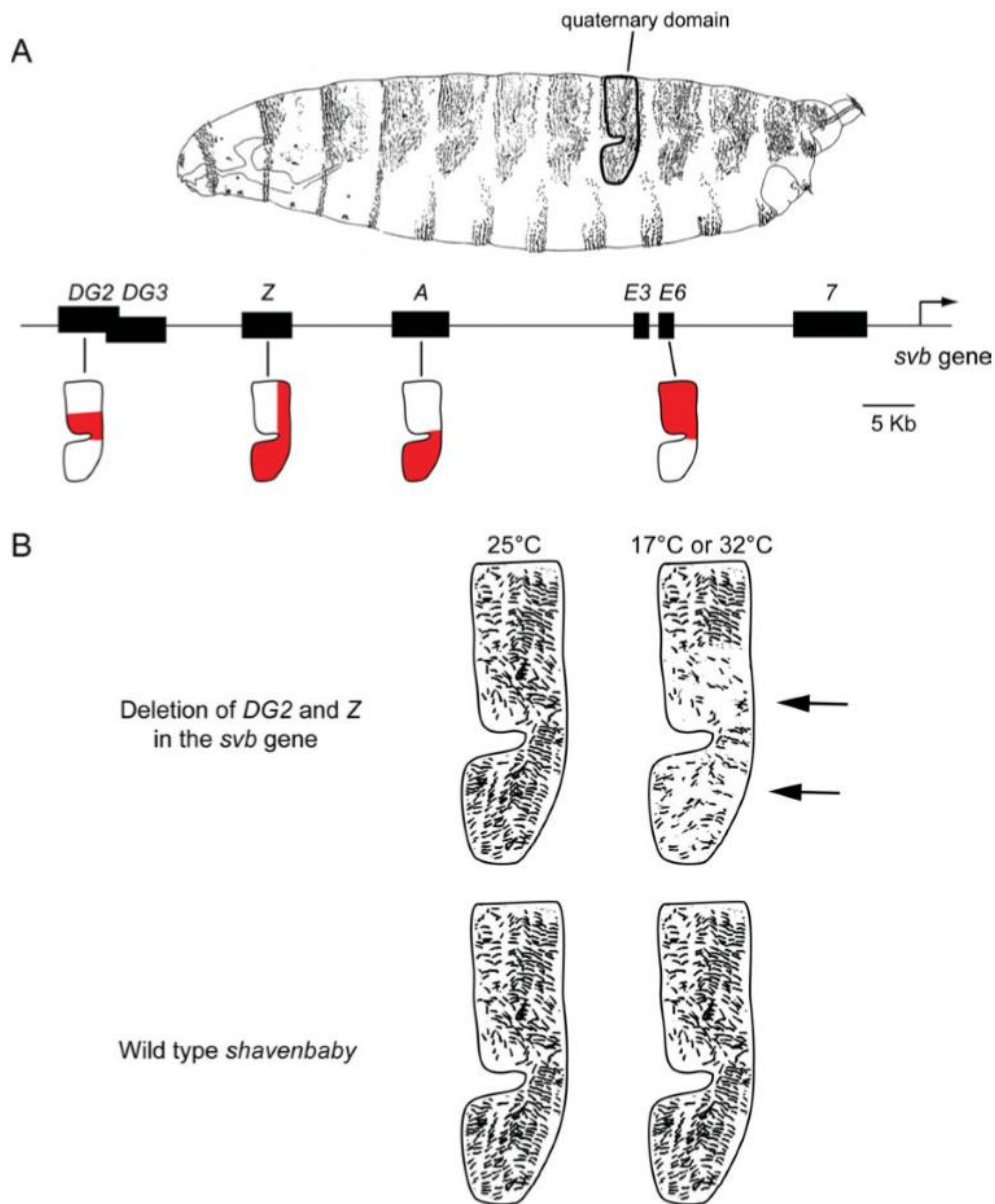


Figure 22 : Les *enhancers* « shadow » de *svb* assurent la robustesse du programme de formation des trichomes face aux variations de température :

(A) Domaine d'activité respectif des *enhancers* « pionniers » E3, E6 et A ainsi que des *enhancers* « shadow » Z et DG2 dans le quatrième segment abdominal dorsal (quaternary domain).

(B) Représentation schématique de l'effet de la température sur le programme de formation des trichomes du quatrième segment abdominal dorsal de larves de *Drosophiles* sauvages (wild type *shavenbaby*) et celles dont les *enhancers* « shadow » DG2 et Z ont été délétés (Deletion of DG2 and Z in the *svb* gene) qui se sont développées en conditions normales (25°C) ou exposées à des températures extrêmes (17°C or 32°C) (Frankel, 2012)

2- Des enhancers « shadow » différents dans les cellules souches rénales ?

Mes travaux ont permis de caractériser que l'expression de *svb* au sein des cellules souches rénales adultes est soutenue par l'activité des *enhancers* E3 et E6. Il est donc possible que ces deux *enhancers* possèdent des activités redondantes de type « shadow » au sein des cellules souches somatiques, conférant ainsi une certaine robustesse à l'expression de *svb* dans ces cellules. En effet, la fonction anti-apoptotique de *svb* étant primordiale à la survie des CSR, nous pouvons penser qu'il est important que ce gène y soit exprimé. On peut aussi suggérer que ces deux *enhancers* actifs simultanément permettent une intensité d'expression de *svb* suffisante pour maintenir un nombre normal de CSR. Pour tester ces hypothèses, il conviendrait d'abolir individuellement l'activité de ces *enhancers* et d'observer les effets sur l'intensité d'expression et la fonction anti-apoptotique de *svb* dans les CSR en conditions normales ou de stress (thermique par exemple). Il est intéressant de noter que les deux *enhancers* exprimés dans les CSR, bien que proches physiquement, ont des domaines d'expression très distincts dans l'embryon (Figure 14B). Si nous étions capables de montrer que les *enhancers* E3 et E6 ont des activités redondantes au sein des CSR, cela mettrait en évidence pour la première fois à ma connaissance que des *enhancers* puissent avoir des activités de type « shadow » différentes en fonction des tissus, complexifiant ainsi la compréhension de la grammaire de l'expression génique.

3- Une redondance fonctionnelle des voies de signalisation dans les cellules souches rénales ?

La robustesse de l'expression d'un gène donné peut également être assurée par la redondance fonctionnelle de certains facteurs de transcription paralogues possédant des registres d'expression chevauchant. Par exemple les gènes *soxN* et *dichaete*, codant tous deux des facteurs de transcription, possèdent des domaines d'expression similaires dans les cellules épidermiques ventrales de l'embryon de *Drosophile*. La mutation d'un des deux, n'entraîne qu'une faible diminution du nombre de trichomes (Overton et al., 2002, 2007), tandis que la délétion simultanée de ces deux gènes provoque une absence totale de trichomes (Overton et al., 2007). Ce phénotype s'explique par le fait que SoxN et Dichaete activent tous deux l'expression de *svb* afin de lancer le programme de formation des trichomes. Dans l'embryon, les *enhancers* E3 et E6 qui ont des registres d'expression distincts (Frankel et al., 2011), répondent différemment aux signaux venant des voies de

signalisation Wg, EGF, Notch et Hh dont l'activité est très régionalisée. A l'inverse, ces deux *enhancers*, tout comme on peut le supposer pour les voies de signalisation précédemment citées, sont actifs simultanément dans les cellules souches somatiques. Le gène *svb* intégrant toutes ces voies de signalisation via ses *enhancers*, nous pouvons penser que leur facteurs de transcription associés puissent avoir des activités redondantes pour soutenir l'expression de *svb* au sein des CSR. L'utilisation des outils à notre disposition pour l'*enhancer* E3 nous montre notamment qu'il est sensible aux voies de signalisation Wnt et EGF. La validité de ces hypothèses reste à vérifier pour l'*enhancer* E6.

Nos travaux suggèrent donc que l'expression fine de *svb* au sein des cellules souches somatiques est rendue robuste par l'existence d'*enhancers* de type « shadow » d'une part et par la complémentarité des voies de signalisation soutenant son expression d'autre part.

II- Le contrôle systémique des cellules souches rénales par l'ecdysone

L'étude des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans la formation des trichomes embryonnaires a permis de démontrer que l'activité du facteur de transcription Shavenbaby (Svb) est sous le contrôle temporel de la voie de signalisation de l'hormone stéroïdienne ecdysone (Chanut-Delalande et al., 2014). En effet, l'ecdysone, via sa fixation sur son récepteur EcR va permettre d'activer l'expression et la production de petits peptides Pri codés par le gène *polished-rice (pri)*. Les peptides Pri vont convertir Svb, initialement accumulé dans les cellules sous forme de répresseur, en activateur transcriptionnel initiant le programme de formation des trichomes (Chanut-Delalande et al., 2014; Kondo et al., 2010). La signalisation ecdysone qui contrôle de nombreux processus développementaux de manière non cellulaire autonome est impliquée dans la formation des tubules de Malpighi. Ainsi, une altération de la signalisation ecdysone (par l'utilisation d'une mutation thermo-sensible pour le gène *ecdysoneless*) aboutit à un défaut d'élongation des tubules ainsi qu'à une mauvaise répartition des cellules étoilées (Gautam et al., 2015). L'activation de la signalisation ecdysone est requise de façon cellulaire autonome au sein des cellules étoilées puisque l'expression dans ces cellules d'une forme dominante négative de l'EcR produit également un défaut d'intercalation de ces cellules (Gautam and Tapadia, 2010).

1- L'expression de *polished-rice* est très variable dans les cellules souches rénales :

Nous montrons pour notre part que la signalisation de l'ecdysone et le gène *pri* sont impliqués dans le maintien des cellules souches rénales chez la drosophile adulte, leur déplétion aboutissant à une forte diminution du nombre de CSR. Des expériences additionnelles montrent aussi que l'activité d'au moins deux *enhancers* de *pri* (*priH* et *priJ*), actifs dans les CSR, sont sensibles à l'activité de l'EcR. Cela soutient que la signalisation ecdysone régule l'expression de *pri* dans les CSR. De plus, nous avons pu

observer que l'activité des *enhancers* de *pri* fluctue énormément en fonction des expériences. En effet, certains lots d'individus présentent une forte activité tandis que d'autres peu ou pas d'activité et cela pour un même *enhancer* de *pri* actif dans les CSR. Cette observation a été confirmée lorsque nous avons effectué des expériences de lignage avec la lignée rapportrice *pri^{tal-Gal4}* en combinaison avec le système ReDDM dont l'expression simultanée d'une GFP instable et une RFP très stable permet de suivre les cellules actives ainsi que celles qui ont été actives pour un pilote Gal4, à un moment donnée. Les résultats ainsi obtenus, lorsque le pilote est activé spécifiquement chez la mouche adulte, montrent qu'une majorité des CSR sont RFP⁺. On peut donc en conclure que *tal-Gal4* a été actif dans l'ensemble de la population des CSR. Cependant, seulement une faible proportion de CSR exprime en plus de la RFP, la GFP, démontrant qu'à un instant *t* un faible nombre de ces cellules expriment *pri* (Figure 23). Ceci nous laisse penser que l'expression de *pri* évolue dans le temps et est hétérogène dans la population des CSR.

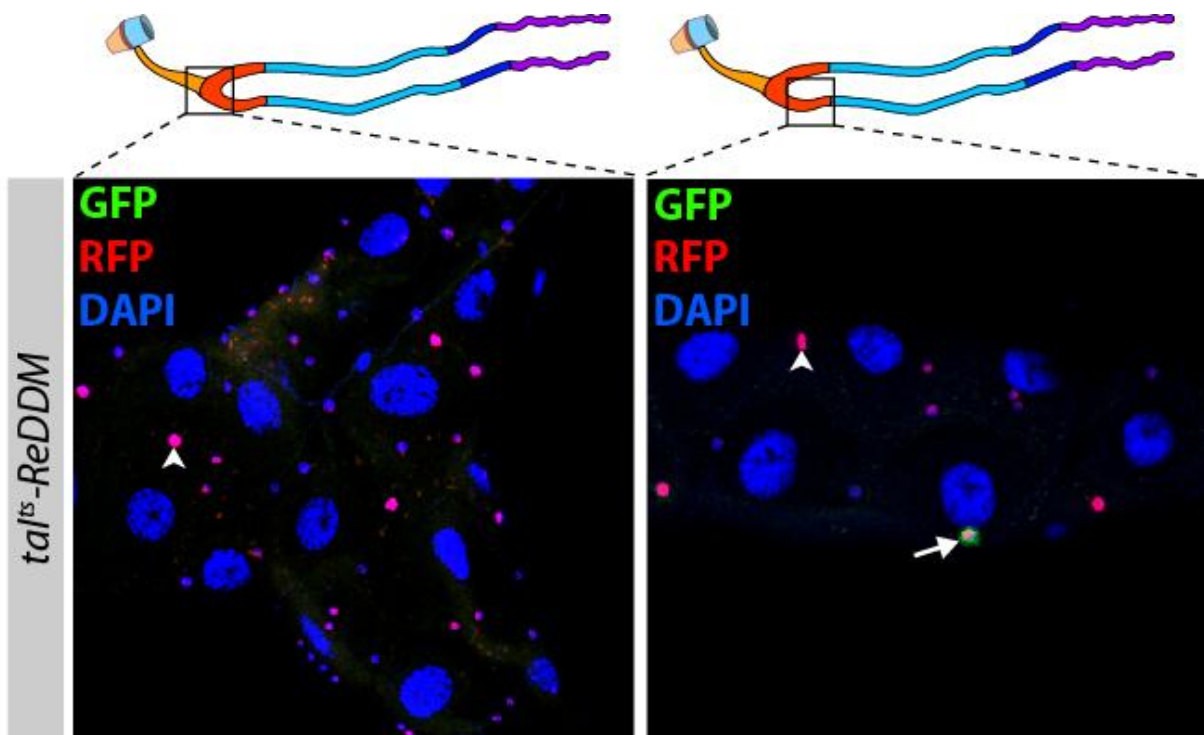


Figure 23 : L'expression de *pri* dans les cellules souches rénales varie au cours du temps :

Expression du système ReDDM dans les cellules souches rénales de *Drosophiles* adultes sauvages pendant 20 jours à l'aide du promoteur inductible du gène *pri* (*tal^{ts}-ReDDM*). Les cellules qui expriment *pri* sont GFP⁺ RFP⁺ (flèche) tandis que les cellules exprimant *pri* très faiblement ou ayant exprimé *pri* auparavant sont RFP⁺ (tête de flèche). Le cadre de gauche présente la partie supérieure de l'uretère tandis que le celui de droite les tubules inférieurs. Les noyaux sont visibles en bleu (DAPI)

2- L'ecdysone contrôle-t-elle l'activité des cellules souches rénales en réponse au statut nutritif ?

Nous pensons que l'expression de *pri* est contrôlée par la signalisation ecdysone dont la production est assurée chez les femelles par la chambre à œufs. L'ecdysone est produite sous sa forme active dans les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte (Petryk et al., 2003; Riddiford, 1993) et sa concentration dans l'hémolymphe est modifiée en fonction du statut nutritionnel (Terashima et al., 2005). En effet, une période de déprivation en nourriture augmente fortement la concentration d'ecdysone tandis qu'elle est maintenue à un niveau faible en condition d'alimentation normale (Terashima et al., 2005). Ces données combinées à nos observations suggèrent que l'ecdysone, produite par les ovaires, pourrait contrôler de façon systémique l'activité des CSR via la régulation de l'expression de *pri* par EcR, en fonction des conditions physiologiques de l'organisme. Il est important de noter que l'ensemble des expériences que nous avons effectuées a été réalisé en utilisant des tubules de Malpighi issus uniquement de femelles.

Afin de vérifier cette hypothèse il serait judicieux d'observer les effets sur les CSR d'une modification de la production d'ecdysone. Par exemple, l'ecdysone étant produite par les ovaires, on peut envisager différentes façons d'impacter sur sa concentration dans l'hémolymphe. Une manière radicale d'éliminer la production d'ecdysone est d'empêcher la formation des ovaires. Pour cela, nous pouvons utiliser la mutation *ovoD1* qui affectent spécifiquement la forme activatrice germinale (*OvoB*) du locus *ovo/svb* engendrant des adultes viables mais stériles puisque dépourvus d'ovaires. Dans ce contexte *ovoD1*, il sera possible de quantifier le nombre de CSR ainsi que l'impact sur l'expression de *pri*. Une autre possibilité serait d'utiliser la mutation thermosensible pour le gène *ecdysoneless* qui inhibe la synthèse d'ecdysone (Gautam et al., 2015). Enfin, étant donné que l'état nutritif chez l'adulte (Terashima et al., 2005) et la lumière chez la larve (Yamanaka et al., 2013b) module la production d'ecdysone on pourrait jouer sur ces deux éléments extérieurs et déterminer leur impact sur l'activité des CSR

Notre étude jette donc les bases d'une potentielle régulation systémique de l'activité des CSR via la voie de signalisation de l'ecdysone et permet de révéler que l'activité des cellules souches somatiques peut être hétérogène au sein d'un organe. Si nos hypothèses se confirment elles constitueraient une première évidence du rôle de l'ecdysone dans le

contrôle de l'activité de cellules souches somatiques et serait en accord avec la fonction de cette hormone stéroïdienne dans la maintenance des cellules souches germinales (Li et al., 2014a; Morris and Spradling, 2012).

III- L'identification et l'étude des cellules souches somatiques : un travail de longue haleine

Bien que l'identification et la caractérisation de cellules souches somatiques, capables de se diviser et de régénérer les organes ne soient plus toutes récentes, l'identification et le mode de fonctionnement précis de ces cellules restent encore un vaste champ d'investigation. En effet, dans certains organes, comme l'intestin et le rein chez les mammifères, l'identification précise (intestin) voir l'existence même (rein, voir Introduction III-1) de cellules souches somatiques sont à ce jours encore controversées. En m'appuyant sur l'intestin je présenterai les incertitudes qui peuvent encore persister et je rebondirai sur les données qui nous poussent à revoir le lignage au sein des tubules de Malpighi chez la Drosophile.

1- Deux sources apparentes de cellules souches intestinales chez les mammifères :

Au sein du **système intestinal des mammifères**, si l'existence de cellules souches intestinales (CSI) est indéniable (Umar, 2010), leur identité même est encore sujet à débat. Le système digestif comprend l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (Figure 24A). L'intestin grêle est composé d'un épithélium formant de nombreuses villosités et invaginations afin d'augmenter la surface de l'organe et optimiser l'absorption des nutriments. Tous comme la Drosophile on retrouve chez les mammifères des entérocytes et cellules entéro-endocrines qui sont situé au sein des villosités de l'intestin et assure les mêmes fonctions que leurs homologues. On retrouve dans les villosités un troisième type cellulaire différencié absent chez la Drosophile, les cellules à gobelet, qui sécrètent le mucus. Au sein des invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, l'épithélium est composé notamment d'un type de cellule différencié, les cellules de Paneth, qui sécrètent des agents antimicrobiens (Figure 24B). Dans les années 1970 les travaux de *Cheng et al.* ainsi que *Chwalinski et al.* ont permis de démontrer l'existence de

cellules possédant des caractéristiques de cellules souches somatiques dans les cryptes (Cheng and Leblond, 1974; Chwalinski et al., 1988). Ces cellules sont quiescentes mais peuvent proliférer et donner les quatre types de cellules différenciées de l'intestin (Bjerknes and Cheng, 1999). Une première tentative d'identification d'un marqueur spécifique des CSI a permis de montrer que *Lrg5* (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*), gène cible de la voie de signalisation Wnt (Wg chez la Drosophile) qui est primordiale pour la prolifération des CSI (Korinek et al., 1998), est exprimé spécifiquement dans des cellules capables de donner les quatre types de cellules différenciées de l'intestin (Barker et al., 2007) (Figure 24B). Cependant, il est apparu que les CSI historiquement décrites n'expriment pas ce marqueur (Potten et al., 1974). Il est maintenant suggéré que les CSI *Lrg5*⁺, ou « +4 stem cells », sont des cellules souches quiescentes (Li and Clevers, 2010), mobilisées en cas de lésions pour la régénération de l'épithélium intestinal (Tian et al., 2012) (Figure 24B). Une autre étude suggère que les CSI *Lrg5*⁻ sont des précurseurs de cellules différenciées qui ont la capacité de revenir à l'état de CSI (dédifférenciation) afin de participer au renouvellement de l'intestin suite à des dommages importants (Buczacki et al., 2013).

L'exemple de l'intestin de mammifères illustre donc la difficulté rencontrée pour identifier de manière précise et non ambiguë, les cellules souches somatiques, au sein d'un organe. En effet, il n'existe pas à ce jour de marqueur « pan cellules souches ».

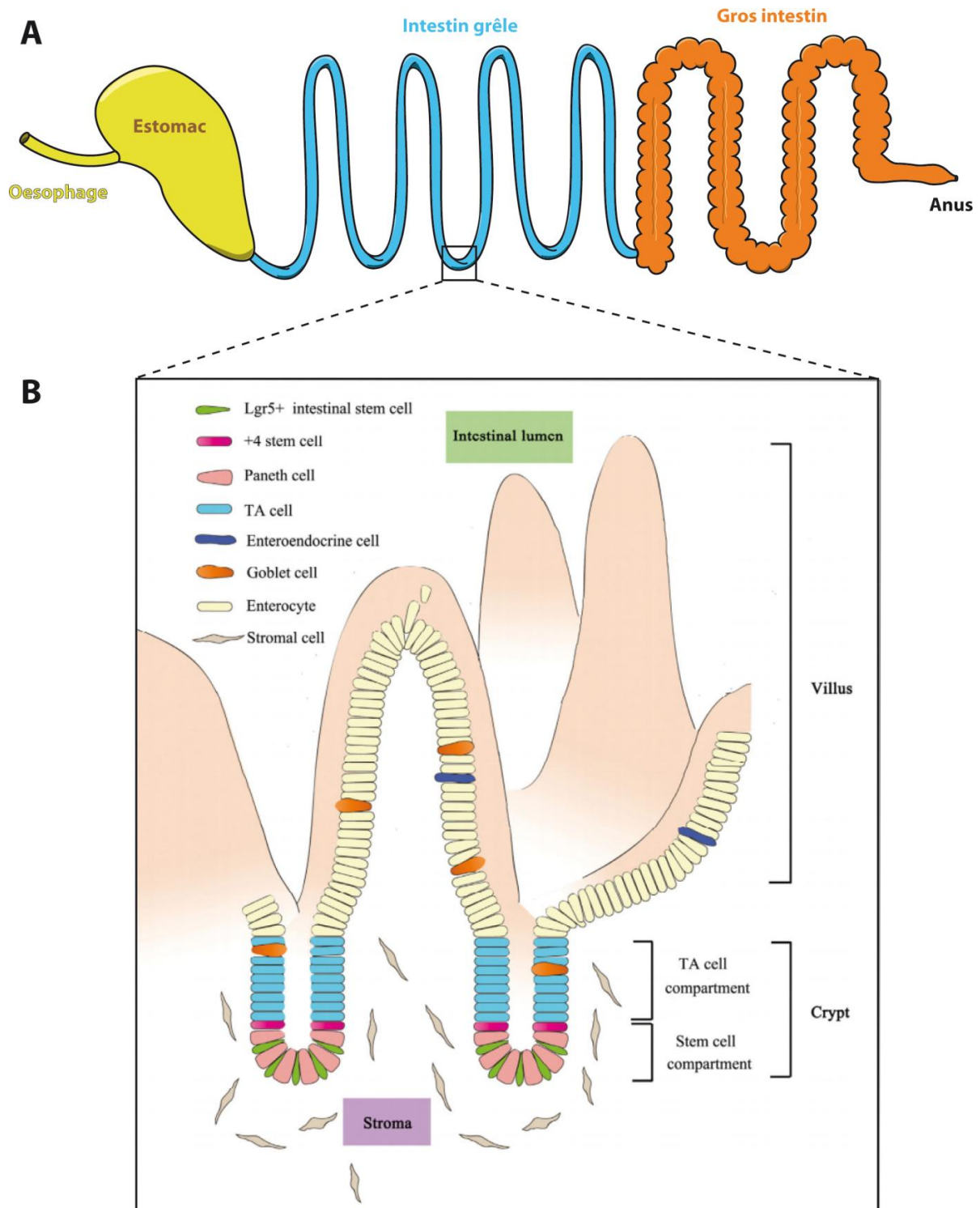


Figure 24 : Les 2 types de cellules souches intestinales de l'intestin des mammifères sont localisées au fond des cryptes :

(A) Schéma de l'organisation du système digestif : il est composé de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle puis du gros intestin qui se termine par l'anus.

(B) Schéma de l'organisation de l'épithélium intestinal chez les mammifères. Les cellules souches intestinales ("Lgr5⁺" et "+4 stem cell") et les cellules de Paneth ("Paneth cell") sont localisées au fond des cryptes ("Crypt"). Les cellules amplificantes ("TA cell"), progéniteurs qui dérivent des CSI et renouvellent les cellules des villosités, sont situées dans la partie supérieure des cryptes tandis que les entérocytes, les cellules à gobelet ("Goblet cells") et entéro-endocrines ("enteroendocrine cells") se trouvent au niveau des villosités ("villus") (Qi and Chen, 2015)

2- Quelle est la descendance des cellules souches rénales chez la Drosophile ?

Un des grands problèmes pour l'identification des cellules souches somatiques est leur accessibilité au sein des organes, d'où la nécessité d'étudier les mécanismes généraux qui contrôlent l'activité des cellules souches somatiques chez des organismes plus accessibles et simples comme la Drosophile. Néanmoins y compris chez cet organisme modèle, *a priori* simple, certains aspects du fonctionnement des cellules souches somatiques et notamment celle du lignage, peuvent être remis en cause. Dans mon introduction, j'ai ainsi illustré que le lignage des cellules souches intestinales a évolué au cours du temps et des avancées réalisées. Initialement, il était admis que les cellules souches intestinales (CSI) donnent naissance à un enteroblaste (EB) qui peut se différencier en entérocyte (EC) ou en cellule entré-endocrine (EE). Le dernier modèle privilégie le fait que les CSI donnent naissance soit à un EB qui va former à terme un EC, soit à un pré-EE assurant la régénération des EE. Les observations que nous avons effectuées avec Cédric, soutenues par des données indépendantes issues des laboratoires de Julia Cordero (renouvellement de l'intestin) et Barry Denholm (développement des tubules de Malpighi, voir ci-après), en étudiant la progénie des CSR dans les tubules de Malpighi (TM) et l'origine des tubules inférieurs nous ont poussé à revoir la nature du lignage du système rénal. En effet, Singh *et al* (Singh *et al.*, 2007) propose que les CSR ont la capacité de renouveler les cellules réabsorbantes situées dans les tubules inférieurs ainsi que les cellules principales et étoilées localisées dans les tubules supérieurs. À l'aide des différents systèmes de lignage à notre disposition, G-TRACE (Evans *et al.*, 2009), ReDDM (Antonello *et al.*, 2015) et MARCM (Lee and Luo, 2001) nous avons pu suivre la descendance des CSR. Nous avons obtenu des résultats identiques avec ces trois techniques différentes qui soutiennent que les CSR assurent uniquement le renouvellement des cellules réabsorbantes contenues dans les tubules inférieurs (Figure 25A, B). Nous n'avons jamais obtenu d'évidence supportant que les CSR contribuent au renouvellement des tubules supérieurs et donc des cellules étoilées et principales. J'ai profité de ma présence en Ecosse pour présenter mes résultats à Barry Denholm qui s'intéresse aux mécanismes impliqués dans la mise en place des TM lors du développement. Il a été montré que dans l'embryon les TM se forment à partir de deux évaginations du futur intestin postérieur (Skaer, 1989). Cependant, Barry grâce à des marqueurs spécifiques de l'intestin embryonnaire moyen et postérieur nous a présenté une hypothèse alternative. En effet, ses observations prédisent que les tubules inférieurs et supérieurs, bien que partageant une continuité anatomique, ont une origine différente et proviennent d'évaginations respectives de l'intestin moyen pour l'un et postérieur pour

l'autre. Toutes ces observations convergent vers un nouveau modèle où les CSR, issues des « Adult Midgut Precursors » (AMP) (voir introduction III-3), assurent le renouvellement des cellules réabsorbantes au sein des tubules inférieurs qui pourraient être considérés comme une partie intégrante de l'intestin.

A la lumière de ces résultats, il serait intéressant dans un premier temps d'éliminer, à l'aide de l'expression d'un gène pro-apoptotique comme *reaper*, spécifiquement chacun des types cellulaires différenciés (cellules réabsorbante, principales, étoilées) pour observer comment réagissent les CSR (index mitotique, nombre de CSR) dans chaque condition. Parallèlement, nous pourrions appréhender l'impact de la perte des CSR (par la perte de fonction de *pri* par exemple) sur le nombre de cellules réabsorbantes, principales et étoilées afin d'identifier le type cellulaire renouvelé par les CSR. Il serait aussi intéressant d'analyser l'impact de la perte des CSR sur la physiologie des TM. Les cellules réabsorbantes étant impliquées dans la réabsorption de l'eau, des ions K^+ et Cl^- tout en sécrétant du Ca^{2+} (O'Donnell and Maddrell, 1995; Rheault and O'Donnell, 2004) nous avons cherché un moyen de mesurer cette activité. Pour cela, j'ai passé 2 mois dans le laboratoire de Julian Dow (University of Glasgow) qui étudie depuis de nombreuses années l'activité physiologique des tubules de Malpighi. L'objectif de cet échange était d'apprendre une technique pour mesurer les variations de sécrétion d'eau (test de sécrétion) au sein des tubules. Si je maîtrise maintenant la technique, il me reste à mesurer l'impact de la perte des CSR sur le taux de sécrétion. Une manière alternative de tester l'impact de l'ablation génétique des CSR sur la physiologie rénale, serait de mesurer le transport des ions K^+ , Cl^- et Ca^{2+} auquel les cellules réabsorbantes participent. Cela est possible par l'utilisation de sondes calciques (en temps réel ou sur des tissus fixés), ou en mesurant la concentration ionique des sécrétions. Pour finir, nous voudrions identifier un stress spécifique des cellules réabsorbantes afin de définir quels facteurs environnementaux impactent sur leur fonctionnement et impliquent un renouvellement spécifique de ces cellules dans le système rénal.

Si nos recherches remettent en cause le lignage dans les tubules de Malpighi, des données issues du laboratoire de Julian Dow remettent en question même leurs fonctions. En effet, son laboratoire a montré que les CSR expriment une enzyme « horseradish peroxydase » spécifique du système nerveux central et périphérique (Sozen et al., 1997). Cette observation suggère que les CSR puissent agir comme des cellules neuroendocrines. Si elles se vérifient, l'ensemble de ces informations pourraient modifier notre vision de la

structure des tubules de Malpighi, du lignage rénal ainsi que de la fonction des cellules souches qui composent cet organe.

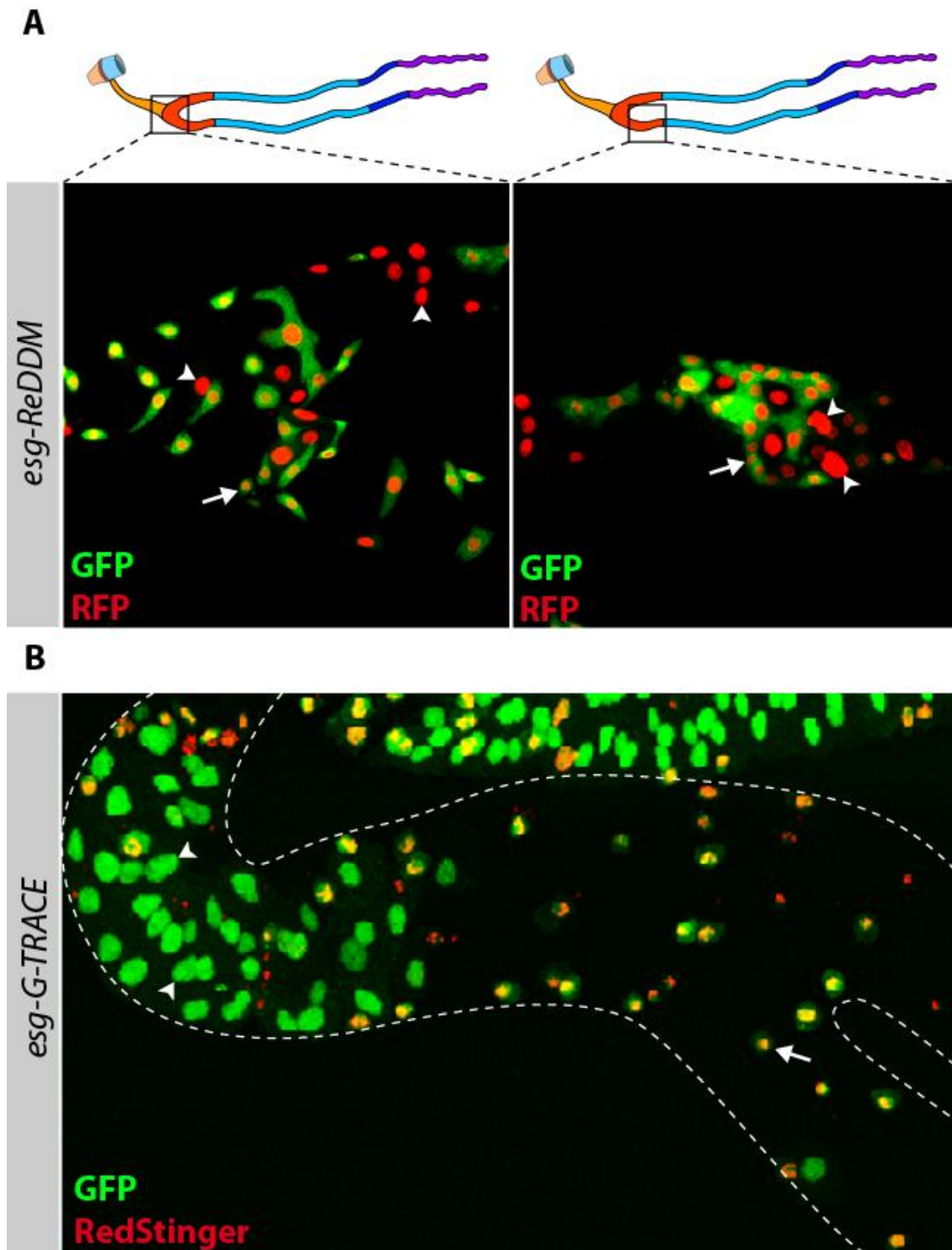


Figure 25 : Les cellules souches rénales renouvellent les cellules différenciées des tubules inférieurs mais pas des tubules supérieurs :

(A) Expression du système ReDDM dans les cellules souches rénales de *Drosophiles* adultes sauvages pendant 20 jours à l'aide du promoteur inducible du gène *escargot* (*esg-ReDDM*). Les cellules souches rénales sont marquées GFP⁺ et RFP⁺ (flèches) et ont la capacité de remplacer les cellules différenciées RFP⁺ (têtes de flèche) dans l'uretère (cadre gauche) et dans les tubules inférieurs (cadre droit) mais jamais dans les tubules supérieurs.

(B) Expression du système G-TRACE dans les cellules souches rénales d'une *Drosophile* adulte sauvage pendant 15 jours à l'aide du promoteur du gène *escargot* (*esg-G-TRACE*). Les cellules souches rénales GFP⁺ RedStinger⁺ (flèche) renouvellent massivement les cellules différenciées GFP⁺ de l'uretère mais pas des tubules supérieurs. Les pointillés représentent le contour des tubules inférieurs.

L'ensemble des points évoqués ici mettent donc en évidence la difficulté de localiser, d'identifier les cellules souches somatiques ainsi que d'appréhender les relations de filiation qu'elles ont avec les autres cellules qui composent l'organe. Le développement de nouvelles techniques de lignage combinées avec des techniques d'imagerie de pointe en temps réel devraient permettre dans le futur de répondre aux questions qui restent en suspens.

Références

Bibliographiques

- Abbate, M., Brown, D., and Bonventre, J. V (1999). Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am. J. Physiol.* 277, F454-63.
- Aerne, B.L., Gailite, I., Sims, D., and Tapon, N. (2015). Hippo stabilises its adaptor Salvador by antagonising the HECT ubiquitin ligase Herc4. *PLoS One* 10, 1–19.
- Aghajanian, P., Takashima, S., Paul, M., Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (2016). Metamorphosis of the *Drosophila* visceral musculature and its role in intestinal morphogenesis and stem cell formation. *Dev. Biol.* 420, 43–59.
- Akiyama, T., and Gibson, M.C. (2015). Decapentaplegic and growth control in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 527, 375–378.
- Albuquerque, J.P., Tobias-Santos, V., Rodrigues, A.C., Mury, F.B., and Da Fonseca, R.N. (2015). small ORFs: A new class of essential genes for development. *Genet. Mol. Biol.* 38, 278–283.
- Amcheslavsky, A., Jiang, J., and Ip, Y.T. (2009). Tissue Damage-Induced Intestinal Stem Cell Division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 4, 49–61.
- Amcheslavsky, A., Song, W., Li, Q., Nie, Y., Bragatto, I., Ferrandon, D., Perrimon, N., and Ip, Y.T. (2014). Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Rep.* 9, 32–39.
- Andersen, D.S., Colombani, J., and Léopold, P. (2013). Coordination of organ growth: Principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends Cell Biol.* 23, 336–344.
- Andrew, D.J., and Baker, B.S. (2008). Expression of the *Drosophila* secreted cuticle protein 73 (*dsc73*) requires shavenbaby. *Dev. Dyn.* 237, 1198–1206.
- Andrews, J., Garcia-Estefania, D., Delon, I., Lü, J., Mével-Ninio, M., Spierer, a, Payre, F., Pauli, D., and Oliver, B. (2000). OVO transcription factors function antagonistically in the *Drosophila* female germline. *Development* 127, 881–892.
- Antonello, Z. a, Reiff, T., Ballesta-Illan, E., and Dominguez, M. (2015). Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch. *EMBO J.* 34, 2025–2041.
- Apidianakis, Y., Pitsouli, C., Perrimon, N., and Rahme, L. (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20883–20888.
- Appel, D., Kershaw, D.B., Smeets, B., Yuan, G., Fuss, A., Frye, B., Elger, M., Kriz, W., Floege, J., and Moeller, M.J. (2009). Recruitment of Podocytes from Glomerular Parietal Epithelial Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 333–343.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., and Elvassore, N. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP / TAZ Regulation by Actin-Processing Factors Mechanical Regulation of Cell Proliferation through. *Cell* 154, 1047–1059.
- Arif, S., Kittelmann, S., and Mcgregor, A.P. (2015). From shavenbaby to the naked valley: Trichome formation as a model for evolutionary developmental biology. *Evol. Dev.* 17, 120–126.

- Aue, A., Hinze, C., Walentin, K., Ruffert, J., Yurtdas, Y., Werth, M., Chen, W., Rabien, A., Kilic, E., Schulzke, J.-D., et al. (2015). A Grainyhead-Like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1–12.
- Ayyaz, A., Li, H., and Jasper, H. (2015). Haemocytes control stem cell activity in the *Drosophila* intestine. *Nat. Cell Biol.* 17, 736–748.
- Badouel, C., Gardano, L., Amin, N., Garg, A., Rosenfeld, R., Le Bihan, T., and McNeill, H. (2009). The FERM-Domain Protein Expanded Regulates Hippo Pathway Activity via Direct Interactions with the Transcriptional Activator Yorkie. *Dev. Cell* 16, 411–420.
- Baechler, B.L., McKnight, C., Pruchnicki, P.C., Biro, N.A., and Reed, B.H. (2016). Hindsight/RREB-1 functions in both the specification and differentiation of stem cells in the adult midgut of *Drosophila*. *Biol. Open* 5, 1–10.
- Bai, J., Uehara, Y., and Montell, D.J. (2000). Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a *Drosophila* Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell* 103, 1047–1058.
- Bardin, A.J., Perdigoto, C.N., Southall, T.D., Brand, A.H., and Schweisguth, F. (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* 137, 705–714.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Beehler-Evans, R., and Micchelli, C.A. (2015). Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* 142, 654–664.
- Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* (80-.). 348, 1024–1027.
- Bennett, F.C., and Harvey, K.F. (2006). Fat Cadherin Modulates Organ Size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo Signaling Pathway. *Curr. Biol.* 16, 2101–2110.
- Beyenbach, K.W., Skaer, H., and Dow, J.A.T. (2010). The Developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighian Tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 351–374.
- Biteau, B., and Jasper, H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* 138, 1045–1055.
- Biteau, B., and Jasper, H. (2014). Slit/Robo Signaling Regulates Cell Fate Decisions in the Intestinal Stem Cell Lineage of *Drosophila*. *Cell Rep.* 7, 1867–1875.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7–14.
- Bonfini, A., Liu, X., and Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 22–38.

- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* *113*, 25–36.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., and Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* *23*, 2333–2344.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B. (2009b). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host Microbe* *5*, 200–211.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Kuraishi, T., and Lemaitre, B. (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* *8*, 152.
- Buczacki, S.J.A., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing *Lgr5*. *Nature* *495*, 65–69.
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Buttiglieri, S., Deregibus, M.C., Cantino, D., and Camussi, G. (2005). Isolation of Renal Progenitor Cells from Adult Human Kidney. *Am. J. Pathol.* *166*, 545–555.
- Busson, D., Gans, M., Komitopoulou, K., and Masson, M. (1983). Genetic Analysis of Three Dominant Female-Sterile Mutations Located on the X Chromosome of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* *105*, 309–325.
- Cabrero, P., Pollock, V.P., Davies, S.A., and Dow, J.A.T. (2004). A conserved domain of alkaline phosphatase expression in the Malpighian tubules of dipteran insects. *J. Exp. Biol.* *207*, 3299–3305.
- Callus, B.A., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, *Mst1* and *Mst2*, with *hSalvador* via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J.* *273*, 4264–4276.
- Campbell, K.K.M.C., and Wingert, R.A. (2012). Renal stem cells : fact or science fiction ? *Biochem. J.* *168*, 153–168.
- Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M., and Chovnick, A. (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* *6*, 367–379.
- Carlson, B.M. (2005). Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat. Rec. Part B New Anat.* *287B*, 4–13.
- Chakrabarti, S., Dudzic, J.P., Li, X., Collas, E.J., Boquete, J.P., and Lemaitre, B. (2016). Remote Control of Intestinal Stem Cell Activity by Haemocytes in *Drosophila*. *PLoS Genet.* *12*, 1–24.
- Chan, E.H.Y., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schäfer, A., Nigg, E.A., and Silljé, H.H.W. (2005). The *Ste20*-like kinase *Mst2* activates the human large tumor suppressor kinase *Lats1*. *Oncogene* *24*, 2076–2086.
- Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F., and Plaza, S. (2006). Shavenbaby Couples Patterning to Epidermal Cell Shape Control. *PLoS Biol.* *4*, e290.

- Chanut-Delalande, H., Hashimoto, Y., Pelissier-Monier, A., Spokony, R., Dib, A., Kondo, T., Bohère, J., Niimi, K., Latapie, Y., Inagaki, S., et al. (2014). Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. *Nat. Cell Biol.* *16*, 1035–1044.
- Chen, C.-L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 15810–15815.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* *141*, 461–479.
- Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 329–340.
- Chiasson-MacKenzie, C., Morris, Z.S., Baca, Q., Morris, B., Coker, J.K., Mirchev, R., Jensen, A.E., Carey, T., Stott, S.L., Golan, D.E., et al. (2015). NF2/Merlin mediates contact-dependent inhibition of EGFR mobility and internalization via cortical actomyosin. *J. Cell Biol.* *211*, 391–405.
- Cho, E., and Irvine, K.D. (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development* *131*, 4489–4500.
- Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., and Irvine, K.D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat. Genet.* *38*, 1142–1150.
- Choi, N.H., Kim, J.G., Yang, D.J., Kim, Y.S., and Yoo, M.A. (2008). Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* *7*, 318–334.
- Choi, N.H., Lucchetta, E., and Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18702–18707.
- Chwalinski, S., Potten, C.S., and Evans, G. (1988). Double Labelling With Bromodeoxyuridine and (3H)-Thymidine of Proliferative Cells In Small Intestinal Epithelium In Steady State and After Irradiation. *Cell Prolif.* *21*, 317–329.
- Cognigni, P., Bailey, A.P., and Miguel-Aliaga, I. (2011). Enteric Neurons and Systemic Signals Couple Nutritional and Reproductive Status with Intestinal Homeostasis. *Cell Metab.* *13*, 92–104.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., and Léopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* *310*, 667–670.
- Cordero, J.B., Stefanatos, R.K., Scopelliti, A., Vidal, M., and Sansom, O.J. (2012). Inducible progenitor-derived Wingless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *EMBO J.* *31*, 3901–3917.
- Couso, J.-P., and Patraquim, P. (2017). Classification and function of small open reading frames. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Cox, D.N., Chao, A., and Lin, H. (2000). Piwi Encodes a Nucleoplasmic Factor Whose Activity Modulates the Number and Division Rate of Germline Stem Cells. *Development* *127*, 503–514.

- Cronin, S.J.F., Nehme, N.T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J.A., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes, R.D.M., Gruber, S., Puc, U., et al. (2009). Genome-Wide RNAi Screen Identifies Genes Involved in Intestinal Pathogenic Bacterial Infection. *Science* (80-). 325, 340–343.
- Cross, S.D., Johnson, A.A., Gilles, B.J., Bachman, L.A., Inoue, T., Agata, K., Marmorstein, L.Y., and Marmorstein, A.D. (2015). Control of maintenance and regeneration of planarian eyes by ovo. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 7604–7610.
- Dai, X., Schonbaum, C., Degenstein, L., Bai, W., Mahowald, A., and Fuchs, E. (1998). The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice. *Genes Dev.* 12, 3452–3463.
- Dang, C. V (1999). c-Myc Target Genes Involved in Cell MINIREVIEW c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth , Apoptosis , and Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11.
- Davies, S.A., Goodwin, S.F., Kelly, D.C., Wang, Z., Ali Sözen, M., Kaiser, K., and Dow, J.A.T. (1996). Analysis and inactivation of vha55, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype. *J. Biol. Chem.* 271, 30677–30684.
- Davis, M.M., and Engström, Y. (2012). Immune Response in the Barrier Epithelia: Lessons from the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *J. Innate Immun.* 4, 273–283.
- Day, J.P., Wan, S., Allan, A.K., Kean, L., Davies, S.A., Gray, J. V., and Dow, J.A.T. (2008). Identification of two partners from the bacterial Kef exchanger family for the apical plasma membrane V-ATPase of Metazoa. *J. Cell Sci.* 121, 2612–2619.
- Delanoue, R., Slaidina, M., and Léopold, P. (2010). The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *drosophila* fat cells. *Dev. Cell* 18, 1012–1021.
- Delon, I., and Payre, F. (2004). Evolution of larval morphology in flies: Get in shape with shavenbaby. *Trends Genet.* 20, 305–313.
- Delon, I., Chanut-Delalande, H., and Payre, F. (2003). The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 120, 747–758.
- Denholm, B. (2013). Shaping up for action: the path to physiological maturation in the renal tubules of *Drosophila*. *Organogenesis* 9, 40–54.
- Denholm, B., Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Artero, R., Lawrence, P., Maddrell, S., Baylies, M., and Skaer, H. (2003). Dual origin of the renal tubules in *Drosophila*: Mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr. Biol.* 13, 1052–1057.
- Doggett, K., Grusche, F.A., Richardson, H.E., and Brumby, A.M. (2011). Loss of the *Drosophila* cell polarity regulator Scribbled promotes epithelial tissue overgrowth and cooperation with oncogenic Ras-Raf through impaired Hippo pathway signaling. *BMC Dev. Biol.* 11, 57.
- Du, J., Kean, L., Allan, A.K., Southall, T.D., Davies, S.A., McNerny, C.J., and Dow, J.A.T. (2006). The SzA mutations of the B subunit of the *Drosophila* vacuolar H⁺ ATPase identify conserved residues essential for function in fly and yeast. *J. Cell Sci.* 119, 2542–2551.

- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183.
- Edgar, B.A. (2006). From cell structure to transcription: Hippo Forges a new path. *Cell* 124, 267–273.
- Evans, C.J., Olson, J.M., Ngo, K.T., Kim, E., Lee, N.E., Kuoy, E., Patananan, A.N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.-T., et al. (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* 6, 603–605.
- Fahrback, S.E., Smagghe, G., and Velarde, R.A. (2012). Insect Nuclear Receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 83–106.
- Fallahi, E., O’Driscoll, N., and Matallanas, D. (2016). The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair. *Genes (Basel)*. 7, 28.
- Feng, Y., and Irvine, K.D. (2007). Fat and expanded act in parallel to regulate growth through warts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20362–20367.
- Fernandes, I., Chanut-Delalande, H., Ferrer, P., Latapie, Y., Waltzer, L., Affolter, M., Payre, F., and Plaza, S. (2010). Zona Pellucida Domain Proteins Remodel the Apical Compartment for Localized Cell Shape Changes. *Dev. Cell* 18, 64–76.
- Fernandez, B.G., Gaspar, P., Bras-Pereira, C., Jezowska, B., Rebelo, S.R., and Janody, F. (2011). Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* 138, 2337–2346.
- Fernández, B.G., Jezowska, B., and Janody, F. (2014). *Drosophila* actin-Capping Protein limits JNK activation by the Src proto-oncogene. *Oncogene* 33, 2027–2039.
- Frankel, N. (2012). Multiple layers of complexity in cis -regulatory regions of developmental genes. *Dev. Dyn.* 241, 1857–1866.
- Frankel, N., Davis, G.K., Vargas, D., Wang, S., Payre, F., and Stern, D.L. (2010). Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466, 490–493.
- Frankel, N., Erezyilmaz, D.F., McGregor, A.P., Wang, S., Payre, F., and Stern, D.L. (2011). Morphological evolution caused by many subtle-effect substitutions in regulatory DNA. *Nature* 474, 598–603.
- Frankel, N., Wang, S., and Stern, D.L. (2012). Conserved regulatory architecture underlies parallel genetic changes and convergent phenotypic evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20975–20979.
- Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A., and Couso, J.P. (2007). Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol.* 5, 1052–1062.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., and Morata, G. (1973). Developmental Compartmentalisation of the Wing Disk of *Drosophila*. *Nat. New Biol.* 245, 251–253.

- Gaspar, P., Holder, M. V., Aerne, B.L., Janody, F., and Tapon, N. (2015). Zyxin antagonizes the FERM protein expanded to couple f-actin and yorkie-dependent organ growth. *Curr. Biol.* *25*, 679–689.
- Gautam, N.-K., and Tapadia, M. (2010). Ecdysone signaling is required for proper organization and fluid secretion of stellate cells in the Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 635–642.
- Gautam, N.K., Verma, P., and Tapadia, M.G. (2015). Ecdysone regulates morphogenesis and function of malpighian tubules in *Drosophila melanogaster* through EcR-B2 isoform. *Dev. Biol.* *398*, 163–176.
- Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J., and Tapon, N. (2010). Kibra Is a Regulator of the Salvador/Warts/Hippo Signaling Network. *Dev. Cell* *18*, 300–308.
- Giot, L. (2003). A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science* (80-.). *302*, 1727–1736.
- Goulev, Y., Fauny, J.D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., and Zider, A. (2008). SCALLOPED Interacts with YORKIE, the Nuclear Effector of the Hippo Tumor-Suppressor Pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *18*, 435–441.
- Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* *10*, 593–601.
- Grzeschik, N.A., Parsons, L.M., Allott, M.L., Harvey, K.F., and Richardson, H.E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs Regulate the Salvador/Warts/Hippo Pathway through Two Distinct Mechanisms. *Curr. Biol.* *20*, 573–581.
- Gunsalus, K.C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M., and Goldberg, M.L. (1995). Mutations in twinstar, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J. Cell Biol.* *131*, 1243–1259.
- Guo, Z., and Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science* (80-.). *350*, aab0988-aab0988.
- Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* *138*, 9–22.
- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., Jafar-Nejad, H., and Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* *8*, 27–36.
- Han, H., Pan, C., Liu, C., Lv, X., Yang, X., Xiong, Y., Lu, Y., Wu, W., Han, J., Zhou, Z., et al. (2015). Gut–neuron interaction via Hh signaling regulates intestinal progenitor cell differentiation in *Drosophila*. *Cell Discov.* *1*, 15006.
- Harmansa, S., Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Caussinus, E. (2015). Dpp spreading is required for medial but not for lateral wing disc growth. *Nature* *527*, 317–322.
- Harvey, K.F. (2015). Growth control: Re-examining zyxin’s role in the hippo pathway. *Curr. Biol.* *25*, R230–R231.

- Harvey, K., and Tapon, N. (2007). The Salvador–Warts–Hippo pathway — an emerging tumour-suppressor network. *Nat. Rev. Cancer* 7, 182–191.
- Harvey, K.F., Pflieger, C.M., and Hariharan, I.K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114, 457–467.
- Hashimoto, Y., Kondo, T., and Kageyama, Y. (2008). Lilliputians get into the limelight: Novel class of small peptide genes in morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* 50.
- Hawkins, C.J., Wang, S.L., and Hay, B. a (1999). A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of *Drosophila* IAP1 as an inhibitor of the *Drosophila* caspase DCP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2885–2890.
- Hayashi, M., Shinozuka, Y., Shigenobu, S., Sato, M., Sugimoto, M., Ito, S., Abe, K., and Kobayashi, S. (2017). Conserved role of *Ovo* in germline development in mouse and *Drosophila*. *Sci. Rep.* 7, 40056.
- Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2011). Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science* (80-.). 332, 458–461.
- Helmstädter, M., and Simons, M. (2017). Using *Drosophila* nephrocytes in genetic kidney disease. *Cell Tissue Res.* 369, 119–126.
- Hermle, T., Braun, D.A., Helmstädter, M., Huber, T.B., and Hildebrandt, F. (2016). Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the *Drosophila* Garland Cell Nephrocyte. *J. Am. Soc. Nephrol. ASN.*2016050517.
- Hill, R.J., Billas, I.M.L., Bonneton, F., Graham, L.D., and Lawrence, M.C. (2013). Ecdysone Receptors: From the Ashburner Model to Structural Biology. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 251–271.
- Hong, T., Watanabe, K., Ta, C.H., Villarreal-Ponce, A., Nie, Q., and Dai, X. (2015). An *Ovol2-Zeb1* Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. *PLoS Comput. Biol.* 11, 1–20.
- Huang, H., Li, J., Hu, L., Ge, L., Ji, H., Zhao, Y., and Zhang, L. (2014). *Bantam* is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. *Dev. Biol.* 385, 211–219.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* 122, 421–434.
- Hwang, H.C., and Clurman, B.E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24, 2776–2786.
- Ihunwo, A., Tembo, L., and Dzamalala, C. (2016). The dynamics of adult neurogenesis in human hippocampus. *Neural Regen. Res.* 11, 1869.
- Inagaki, S., Numata, K., Kondo, T., Tomita, M., Yasuda, K., Kanai, A., and Kageyama, Y. (2005). Identification and expression analysis of putative mRNA-like non-coding RNA in *Drosophila*. *Genes to Cells* 10, 1163–1173.

- Insall, R.H., and Machesky, L.M. (2009). Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks. *Dev. Cell* 17, 310–322.
- Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2700–2704.
- Jang, A.C.-C., Chang, Y.-C., Bai, J., and Montell, D. (2009). Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. *Nat. Cell Biol.* 11, 569–579.
- Jezowska, B., Fernández, B.G., Amândio, A.R., Duarte, P., Mendes, C., Brás-Pereira, C., and Janody, F. (2011). A dual function of *Drosophila* capping protein on DE-cadherin maintains epithelial integrity and prevents JNK-mediated apoptosis. *Dev. Biol.* 360, 143–159.
- Jia, J. (2003). The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2514–2519.
- Jia, D., Jolly, M.K., Boareto, M., Parsana, P., Mooney, S.M., Pienta, K.J., Levine, H., and Ben-Jacob, E. (2015). OVOL guides the epithelial-hybrid-mesenchymal transition. *Oncotarget* 6, 15436–15448.
- Jiang, H., and Edgar, B. a (2009). EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development* 136, 483–493.
- Jiang, H., Patel, P.H., Kohlmaier, A., Grenley, M.O., McEwen, D.G., and Edgar, B.A. (2009). Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* 137, 1343–1355.
- Jiang, H., Grenley, M.O., Bravo, M.-J., Blumhagen, R.Z., and Edgar, B.A. (2012). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Biophys. Chem.* 34, 13–23.
- Jin, Y., Xu, J., Yin, M.X., Lu, Y., Hu, L., Li, P., Zhang, P., Yuan, Z., Ho, M.S., Ji, H., et al. (2013). Brahma is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation and regulated by Hippo signaling. *Elife* 2, e00999.
- Johnson, a D., Fitzsimmons, D., Hagman, J., and Chamberlin, H.M. (2001). EGL-38 Pax regulates the ovo-related gene *lin-48* during *Caenorhabditis elegans* organ development. *Development* 128, 2857–2865.
- Jolly, M.K., Jia, D., Boareto, M., Mani, S. a, Pienta, K.J., Ben-Jacob, E., and Levine, H. (2015). Coupling the modules of EMT and stemness : A tunable “ stemness window ” model. *Oncotarget* 6, 1–14.
- Jukam, D., Xie, B., Rister, J., Terrell, D., Charlton-Perkins, M., Pistillo, D., Gebelein, B., Desplan, C., and Cook, T. (2013). Opposite Feedbacks in the Hippo Pathway for Growth Control and Neural Fate. *Science* (80-.). 342, 1238016–1238016.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The *Drosophila* Tumor-Suppressor Gene Warts Encodes a Homolog of Human Myotonic-Dystrophy Kinase and Is Required for the Control of Cell-Shape and Proliferation. *Genes Dev.* 9, 534–546.

- Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). TAZ: A novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* *19*, 6778–6791.
- Kango-Singh, M. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* *129*, 5719–5730.
- Kannan, K., and Fridell, Y.-W.C. (2013). Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front. Physiol.* *4*, 288.
- Kapuria, S., Karpac, J., Biteau, B., Hwangbo, D., and Jasper, H. (2012). Notch-Mediated Suppression of TSC2 Expression Regulates Cell Differentiation in the *Drosophila* Intestinal Stem Cell Lineage. *PLoS Genet.* *8*, 1–14.
- Karpowicz, P., Perez, J., Perrimon, N., Amcheslavsky, A., Jiang, J., Ip, Y.T., Apidianakis, Y., Pitsouli, C., Perrimon, N., Rahme, L., et al. (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* *137*, 4135–4145.
- Kastenmayer, J.P. (2006). Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*. *Genome Res.* *16*, 365–373.
- Khila, A., El Haidani, A., Vincent, A., Payre, F., and Souda, S.I. (2003). The dual function of ovo/shavenbaby in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *33*, 691–699.
- Kiger, A.A., White-Cooper, H., and Fuller, M.T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* *407*, 750–754.
- Kim, J.Y., Lee, R.H., Kim, T.M., Kim, D.-W., Jeon, Y.-J., Huh, S.-H., Oh, S.-Y., Kyba, M., Kataoka, H., Choi, K., et al. (2014). OVOL2 is a critical regulator of ER71/ETV2 in generating FLK1+, hematopoietic, and endothelial cells from embryonic stem cells. *Blood* *124*, 2948–2952.
- Kirilly, D., Spana, E.P., Perrimon, N., Padgett, R.W., and Xie, T. (2005). BMP signaling is required for controlling somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* ovary. *Dev. Cell* *9*, 651–662.
- Kitazawa, K., Hikichi, T., Nakamura, T., Mitsunaga, K., Tanaka, A., Nakamura, M., Yamakawa, T., Furukawa, S., Takasaka, M., Goshima, N., et al. (2016). OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* *15*, 1359–1368.
- Kondo, T., Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S., and Kageyama, Y. (2007). Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat. Cell Biol.* *9*, 660–665.
- Kondo, T., Plaza, S., Zanet, J., Benrabah, E., Valenti, P., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Payre, F., and Kageyama, Y. (2010). Small Peptides Switch the Transcriptional Activity of Shavenbaby During *Drosophila* Embryogenesis. *Science* (80-.). *329*, 336–339.
- König, A., Yatsenko, A.S., Weiss, M., and Shcherbata, H.R. (2011). Ecdysteroids affect *Drosophila* ovarian stem cell niche formation and early germline differentiation. *EMBO J.* *30*, 1549–1562.

- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* *19*, 379–383.
- Korzelius, J., Naumann, S.K., Loza-Coll, M.A., Chan, J.S., Dutta, D., Oberheim, J., Gläßer, C., Southall, T.D., Brand, A.H., Jones, D.L., et al. (2014). *Escargot* maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells. *EMBO J.* *33*, 2967–2982.
- Kramann, R., Kusaba, T., and Humphreys, B.D. (2015). Who regenerates the kidney tubule? *Nephrol. Dial. Transplant.* *30*, 903–910.
- Kumar, A., Bhandari, A., Sinha, R., Sardar, P., Sushma, M., Goyal, P., Goswami, C., and Grapputo, A. (2012). Molecular phylogeny of OVOL genes illustrates a conserved C2H2 zinc finger domain coupled by hypervariable unstructured regions. *PLoS One* *7*, 1–12.
- Lagha, M., Bothma, J.P., and Levine, M. (2012). Mechanisms of transcriptional precision in animal development. *Trends Genet.* *28*, 409–416.
- Lai, Z.-C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.-L., and Li, Y. (2005). Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Mob as Tumor Suppressor, *Mats. Cell* *120*, 675–685.
- Lane, S.W., Williams, D. a, and Watt, F.M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat. Biotechnol.* *32*, 795–803.
- Langworthy, M., Zhou, B., de Caestecker, M., Moeckel, G., and Baldwin, H.S. (2009). NFATc1 Identifies a Population of Proximal Tubule Cell Progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 311–321.
- Lapan, S.W., and Reddien, P.W. (2012). Transcriptome Analysis of the Planarian Eye Identifies ovo as a Specific Regulator of Eye Regeneration. *Cell Rep.* *2*, 294–307.
- Lazzeri, E., Crescioli, C., Ronconi, E., Mazzinghi, B., Sagrinati, C., Netti, G.S., Angelotti, M.L., Parente, E., Ballerini, L., Cosmi, L., et al. (2007). Regenerative Potential of Embryonic Renal Multipotent Progenitors in Acute Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* *18*, 3128–3138.
- Lee, T., and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* *24*, 251–254.
- Lee, B., Villarreal-Ponce, A., Fallahi, M., Ovadia, J., Sun, P., Yu, Q.C., Ito, S., Sinha, S., Nie, Q., and Dai, X. (2014). Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev. Cell* *29*, 47–58.
- Lee, S.H., Park, J.S., Kim, Y.S., Chung, H.Y., and Yoo, M.A. (2012). Requirement of matrix metalloproteinase-1 for intestinal homeostasis in the adult *Drosophila* midgut. *Exp. Cell Res.* *318*, 670–681.
- Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2008). TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 2426–2436.
- Levine, M. (2010). Transcriptional Enhancers in Animal Development and Evolution. *Curr. Biol.* *20*, R754–R763.

- Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science* (80-.). 327, 542–545.
- Li, Y., Ma, Q., Cherry, C.M., and Matunis, E.L. (2014a). Steroid signaling promotes stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Dev. Biol.* 394, 129–141.
- Li, Z., Zhang, Y., Han, L., Shi, L., and Lin, X. (2013). Trachea-Derived Dpp Controls Adult Midgut Homeostasis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 24, 133–143.
- Li, Z., Liu, S., and Cai, Y. (2014b). Differential notch activity is required for homeostasis of malpighian tubules in adult *drosophila*. *J. Genet. Genomics* 41, 649–652.
- Li, Z., Liu, S., and Cai, Y. (2015). EGFR/MAPK signaling regulates the proliferation of *drosophila* renal and nephric stem cells. *J. Genet. Genomics* 42, 9–20.
- Lin, A.Y.T., and Pearson, B.J. (2014). Planarian yorkie/YAP functions to integrate adult stem cell proliferation, organ homeostasis and maintenance of axial patterning. *Development* 141, 1197–1208.
- Lin, G., and Xi, R. (2008). Paracrine Wntless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature* 2, 1119–1123.
- Lin, F., Moran, A., and Igarashi, P. (2005). Intrarenal cells , not bone marrow – derived cells , are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J. Clin. Invest.* 115, 1756–1764.
- Lin, G., Zhang, X., Ren, J., Pang, Z., Wang, C., Xu, N., and Xi, R. (2013). Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 377, 177–187.
- Lindgren, D., Boström, A.-K., Nilsson, K., Hansson, J., Sjölund, J., Möller, C., Jirström, K., Nilsson, E., Landberg, G., Axelson, H., et al. (2011). Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am. J. Pathol.* 178, 828–837.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10532–10537.
- Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., et al. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 285, 37159–37169.
- Lucchetta, E.M., and Ohlstein, B. (2017). Amitosis of Polyploid Cells Regenerates Functional Stem Cells in the *Drosophila* Intestine. *Cell Stem Cell* 1–12.
- Ma, M., Zhao, H., Zhao, H., Binari, R., Perrimon, N., and Li, Z. (2016). Wildtype adult stem cells, unlike tumor cells, are resistant to cellular damages in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 411, 207–216.
- Matakatsu, H., and Blair, S.S. (2004). Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development* 131, 3785–3794.
- Matsuda, S., and Affolter, M. (2017). Dpp from the anterior stripe of cells is crucial for the growth of the *Drosophila* wing disc. *Elife* 6.

- Mayhew, T.M. (1999). Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol. Histopathol.* *14*, 257–267.
- McGettigan, J., McLennan, R.K.J., Broderick, K.E., Kean, L., Allan, A.K., Cabrero, P., Regulski, M.R., Pollock, V.P., Gould, G.W., Davies, S.A., et al. (2005). Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *35*, 741–754.
- McGregor, A.P., Orgogozo, V., Delon, I., Zanet, J., Srinivasan, D.G., Payre, F., and Stern, D.L. (2007). Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene. *Nature* *448*, 587–590.
- Meier, P., Silke, J., Leervers, S.J., and Evan, G.I. (2000). The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *EMBO J.* *19*, 598–611.
- Meignin, C., Alvarez-Garcia, I., Davis, I., and Palacios, I.M. (2007). The Salvador-Warts-Hippo Pathway Is Required for Epithelial Proliferation and Axis Specification in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *17*, 1871–1878.
- Menoret, D., Santolini, M., Fernandes, I., Spokony, R., Zanet, J., Gonzalez, I., Latapie, Y., Ferrer, P., Rouault, H., White, K.P., et al. (2013). Genome-wide analyses of Shavenbaby target genes reveals distinct features of enhancer organization. *Genome Biol.* *14*, R86.
- Messier, B., and Leblond, C.P. (1960). Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am. J. Anat.* *106*, 247–285.
- Mével-Ninio, M., Terracol, R., Salles, C., Vincent, A., and Payre, F. (1995). *ovo*, a *Drosophila* gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with *shavenbaby*, a gene involved in embryo patterning. *Mech. Dev.* *49*, 83–95.
- Micchelli, C.A., and Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* *439*, 475–479.
- Micchelli, C.A., Sudmeier, L., Perrimon, N., Tang, S., and Beehler-Evans, R. (2011). Identification of adult midgut precursors in *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns* *11*, 12–21.
- Mo, J.-S., Park, H.W., and Guan, K.-L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* *15*, 642–656.
- Morimoto, a M., Jordan, K.C., Tietze, K., Britton, J.S., O’Neill, E.M., and Ruohola-Baker, H. (1996). Pointed, an ETS domain transcription factor, negatively regulates the EGF receptor pathway in *Drosophila* oogenesis. *Development* *122*, 3745–3754.
- Moroishi, T., Hansen, C.G., and Guan, K.-L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 73–79.
- Morris, L.X., and Spradling, A.C. (2012). Steroid Signaling within *Drosophila* Ovarian Epithelial Cells Sex-Specifically Modulates Early Germ Cell Development and Meiotic Entry. *PLoS One* *7*, 1–11.
- Mulinari, S., Barmchi, M.P., and Hacker, U. (2008). DRhoGEF2 and Diaphanous Regulate Contractile Force during Segmental Groove Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1883–1892.

- Nadasdy, T., Laszik, Z., Buck, K.E., Johnson, L.D., and Silva, F.G. (1994). Proliferative Activity of Intrinsic Cell Populations in the Normal Human Kidney Tibor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4.
- Neto-Silva, R.M., de Beco, S., and Johnston, L.A. (2010). Evidence for a growth-stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the drosophila homolog of Yap. *Dev. Cell* 19, 507–520.
- Niwa, R., and Niwa, Y.S. (2014). Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1283–1292.
- O'Brien, L.E., Soliman, S.S., Li, X., and Bilder, D. (2011). Altered Modes of Stem Cell Division Drive Adaptive Intestinal Growth. *Cell* 147, 603–614.
- O'Donnell, M.J., and Maddrell, S.H. (1995). Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* 198, 1647–1653.
- O'Donnell, M.J., Dow, J.A., Huesmann, G.R., Tublitz, N.J., and Maddrell, S.H. (1996). Separate control of anion and cation transport in malpighian tubules of *Drosophila Melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 199, 1163–1175.
- O'Donnell, M.J., Rheault, M.R., Davies, S. a, Rosay, P., Harvey, B.J., Maddrell, S.H., Kaiser, K., and Dow, J. a (1998). Hormonally controlled chloride movement across *Drosophila* tubules is via ion channels in stellate cells. *Am. J. Physiol.* 274, R1039–R1049.
- Oh, H., and Irvine, K.D. (2008). In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development* 135, 1081–1088.
- Oh, H., and Irvine, K.D. (2011). Cooperative Regulation of Growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev. Cell* 20, 109–122.
- Oh, H., Reddy, B.V.V.G., and Irvine, K.D. (2009). Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Dev. Biol.* 335, 188–197.
- Oh, H., Slattery, M., Ma, L., Crofts, A., White, K.P., Mann, R.S., and Irvine, K.D. (2013). Genome-wide Association of Yorkie with Chromatin and Chromatin-Remodeling Complexes. *Cell Rep.* 3, 309–318.
- Ohlstein, B., and Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439, 470–474.
- Ohlstein, B., and Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling. *Science* (80-.). 315, 988–992.
- Oliver, B., Singer, J., Laget, V., Pennetta, G., and Pauli, D. (1994). Function of *Drosophila* ovo+ in germ-line sex determination depends on X-chromosome number. *Development* 120, 3185–3195.
- Overton, P.M., Meadows, L. a, Urban, J., and Russell, S. (2002). Evidence for differential and redundant function of the Sox genes Dichaete and SoxN during CNS development in *Drosophila*. *Development* 129, 4219–4228.

- Overton, P.M., Chia, W., and Buescher, M. (2007). The *Drosophila* HMG-domain proteins SoxNeuro and Dichaete direct trichome formation via the activation of shavenbaby and the restriction of Wingless pathway activity. *Development* *134*, 2807–2813.
- Pan, D. (2007). Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.* *21*, 886–897.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* *19*, 491–505.
- Pantalacci, S., Tapon, N., and Léopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *5*, 921–927.
- Payre, F. (2004). Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 207–215.
- Payre, F., Vincent, A., and Carreno, S. (1999). *ovo/svb* integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* *400*, 271–275.
- Peng, H.W., Slattery, M., and Mann, R.S. (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: Homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* *23*, 2307–2319.
- Perdigoto, C.N., Schweisguth, F., and Bardin, A.J. (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* *138*, 4585–4595.
- Petryk, A., Warren, J.T., Marques, G., Jarcho, M.P., Gilbert, L.I., Kahler, J., Parvy, J.-P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C., and O'Connor, M.B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 13773–13778.
- Plaza, S., Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Wassarman, P.M., and Payre, F. (2010). From A to Z: Apical structures and zona pellucida-domain proteins. *Trends Cell Biol.* *20*, 524–532.
- Poernbacher, I., Baumgartner, R., Marada, S.K., Edwards, K., and Stocker, H. (2012). *Drosophila* Pez acts in hippo signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Curr. Biol.* *22*, 389–390.
- Polesello, C., and Tapon, N. (2007). Salvador-warts-hippo signaling promotes *Drosophila* posterior follicle cell maturation downstream of notch. *Curr. Biol.* *17*, 1864–1870.
- Potten, C.S., Kovacs, L., and Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Prolif.* *7*, 271–283.
- Potten, C.S., Saffhill, R., and Maibach, H.I. (1987). Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell Prolif.* *20*, 461–472.
- Praskova, M., Xia, F., and Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Curr. Biol.* *18*, 311–321.
- Qi, Z., and Chen, Y.-G. (2015). Regulation of intestinal stem cell fate specification. *Sci. China Life Sci.* *58*, 570–578.

- Rauskolb, C., Pan, G., Reddy, B.V.V.G., Oh, H., and Irvine, K.D. (2011). Zyxin links fat signaling to the hippo pathway. *PLoS Biol.* *9*.
- Ren, F., Zhang, L., and Jiang, J. (2010a). Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* *337*, 303–312.
- Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.-Y., Ip, Y.T., and Jiang, J. (2010b). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Pnas* *107*, 21064–21069.
- Ren, F., Shi, Q., Chen, Y., Jiang, A., Ip, Y.T., Jiang, H., and Jiang, J. (2013). *Drosophila* Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Res.* *23*, 1133–1146.
- Restrepo, S., Zartman, J.J., and Basler, K. (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol.* *24*, 245–255.
- Rheault, M.R., and O'Donnell, M.J. (2004). Organic cation transport by Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: application of two novel electrophysiological methods. *J. Exp. Biol.* *207*, 2173–2184.
- Ribeiro, P., Holder, M., Frith, D., Snijders, A.P., and Tapon, N. (2014). Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the SCFSlimb/ -TrCP ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E1980–E1989.
- Ricketts, C.J., Morris, M.R., Gentle, D., Brown, M., Wake, N., Woodward, E.R., Clarke, N., Latif, F., and Maher, E.R. (2012). Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Epigenetics* *7*, 278–290.
- Riddiford, L.M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* *3*, 203–209.
- Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y., and Moberg, K.H. (2010). Crumbs Regulates Salvador/Warts/Hippo Signaling in *Drosophila* via the FERM-Domain Protein Expanded. *Curr. Biol.* *20*, 582–590.
- Roca, H., Hernandez, J., Weidner, S., McEachin, R.C., Fuller, D., Sud, S., Schumann, T., Wilkinson, J.E., Zaslavsky, A., Li, H., et al. (2013). Transcription Factors OVOL1 and OVOL2 Induce the Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Cancer. *PLoS One* *8*, 1–20.
- Roca, H., Pande, M., Huo, J.S., Hernandez, J., Cavalcoli, J.D., Pienta, K.J., and McEachin, R.C. (2014). A bioinformatics approach reveals novel interactions of the OVOL transcription factors in the regulation of epithelial - mesenchymal cell reprogramming and cancer progression. *BMC Syst. Biol.* *8*, 29.
- Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M.L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., Parente, E., Becherucci, F., Gacci, M., Carini, M., et al. (2009). Regeneration of Glomerular Podocytes by Human Renal Progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 322–332.
- Rosay, P., Davies, S. a, Yu, Y., Sözen, M. a, Kaiser, K., and Dow, J. a (1997). Cell-type specific calcium signalling in a *Drosophila* epithelium. *J. Cell Sci.* *110* (Pt 1, 1683–1692.

- Sagrinati, C., Netti, G.S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., et al. (2006). Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 2443–2456.
- Sakuma, C., Saito, Y., Umehara, T., Kamimura, K., Maeda, N., Mosca, T.J., Miura, M., and Chihara, T. (2016). The Strip-Hippo Pathway Regulates Synaptic Terminal Formation by Modulating Actin Organization at the *Drosophila* Neuromuscular Synapses. *Cell Rep.* *16*, 2289–2297.
- Sallustio, F., De Benedictis, L., Castellano, G., Zaza, G., Loverre, A., Costantino, V., Grandaliano, G., and Schena, F.P. (2010). TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells. *FASEB J.* *24*, 514–525.
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K.-I., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., and Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J.* *30*, 2325–2335.
- Saucedo, L.J., and Edgar, B.A. (2007). Filling out the Hippo pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 613–621.
- Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M., and Tautz, D. (2006). A Segmentation Gene in *Tribolium* Produces a Polycistronic mRNA that Codes for Multiple Conserved Peptides. *Cell* *126*, 559–569.
- Schweizer, L., Nellen, D., and Basler, K. (2003). Requirement for Pangolin/dTCF in *Drosophila* Wingless signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 5846–5851.
- Scopelliti, A., Cordero, J.B., Diao, F., Strathdee, K., White, B.H., Sansom, O.J., and Vidal, M. (2014). Local control of intestinal stem cell homeostasis by enteroendocrine cells in the adult *Drosophila* midgut. *Curr. Biol.* *24*, 1199–1211.
- Scott, R.P., and Quaggin, S.E. (2015). The cell biology of renal filtration. *J. Cell Biol.* *209*, 199–210.
- Shaw, R.L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B.A., and Tapon, N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* *137*, 4147–4158.
- Shu, Z., and Deng, W.-M. (2017). Differential Regulation of Cyclin E by Yorkie-Scalloped Signaling in Organ Development. *Genes|Genomes|Genetics* *7*, 1049–1060.
- Siddiqui, S., and Culotti, J. (1984). A Neural Antigen Conserved in Different Invertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *435*, 341–343.
- Siew, W.C., Chun, J.L., Guo, K., Chee, P.N., Lee, I., Hunziker, W., Zeng, Q., and Hong, W. (2008). A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* *68*, 2592–2598.
- Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N., and McNeill, H. (2006). The Tumor-Suppressor Gene fat Controls Tissue Growth Upstream of Expanded in the Hippo Signaling Pathway. *Curr. Biol.* *16*, 2081–2089.

- Simmonds, A.J., Liu, X., Soanes, K.H., Krause, H.M., Irvine, K.D., and Bell, J.B. (1998). Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3815–3820.
- Singh, S.R., Liu, W., and Hou, S.X. (2007). The Adult *Drosophila* Malpighian Tubules Are Maintained by Multipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 1, 191–203.
- Skaer, H. (1989). Cell division in Malpighian tubule development in *D. melanogaster* is regulated by a single tip cell. *Nature* 342, 566–569.
- Slattery, M., Voutev, R., Ma, L., Nègre, N., White, K.P., and Mann, R.S. (2013). Divergent Transcriptional Regulatory Logic at the Intersection of Tissue Growth and Developmental Patterning. *PLoS Genet.* 9, 22–25.
- Somogyi, K., and Rørth, P. (2004). Evidence for Tension-Based Regulation of *Drosophila* MAL and SRF during Invasive Cell Migration. *Dev. Cell* 7, 85–93.
- Sozen, M.A., Armstrong, J.D., Yang, M., Kaiser, K., and Dow, J.A.T. (1997). Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5207–5212.
- Srivastava, A., Simmonds, A.J., Garg, A., Fossheim, L., Campbell, S.D., and Bell, J.B. (2004). Molecular and Functional Analysis of scalloped Recessive Lethal Alleles in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 166, 1833–1843.
- Staley, B.K., and Irvine, K.D. (2010). Warts and yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* 20, 1580–1587.
- Steinhardt, A.A., Gayyed, M.F., Klein, A.P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., Montgomery, E.A., and Anders, R.A. (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum. Pathol.* 39, 1582–1589.
- Stern, D.L., and Frankel, N.N. (2013). The structure and evolution of cis-regulatory regions: the shavenbaby story. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B-Biological Sci.* *in press*, 20130028.
- Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccharini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., et al. (2005). The transcriptional coactivator yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA damage. *Mol. Cell* 18, 447–459.
- Szibor, M., Pöling, J., Warnecke, H., Kubin, T., and Braun, T. (2014). Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1907–1916.
- Takashima, S., Paul, M., Aghajanian, P., Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (2013). Migration of *Drosophila* intestinal stem cells across organ boundaries. *Development* 140, 1903–1911.
- Tapadia, M.G., and Verma, P. (2012). Immune response and anti-microbial peptides expression in malpighian tubules of *drosophila melanogaster* is under developmental regulation. *PLoS One* 7.
- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C.R., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). *salvador* promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467–478.

- Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Ditzel, M., and Meier, P. (2005). IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* *7*, 70–77.
- Terashima, J., Takaki, K., Sakurai, S., and Bownes, M. (2005). Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Endocrinol.* *187*, 69–79.
- Thompson, B.J., and Cohen, S.M. (2006). The Hippo Pathway Regulates the bantam microRNA to Control Cell Proliferation and Apoptosis in *Drosophila*. *Cell* *126*, 767–774.
- Tian, A., Shi, Q., Jiang, A., Li, S., Wang, B., and Jiang, J. (2015). Injury-stimulated Hedgehog signaling promotes regenerative proliferation of *Drosophila* intestinal stem cells. *J. Cell Biol.* *208*, 807–819.
- Tian, A., Benchabane, H., Wang, Z., and Ahmed, Y. (2016). Regulation of Stem Cell Proliferation and Cell Fate Specification by Wingless/Wnt Signaling Gradients Enriched at Adult Intestinal Compartment Boundaries. *PLoS Genet.* *12*, 1–31.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2012). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* *482*, 120–120.
- Tupy, J.L., Bailey, A.M., Dailey, G., Evans-Holm, M., Siebel, C.W., Misra, S., Celniker, S.E., and Rubin, G.M. (2005). Identification of putative noncoding polyadenylated transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 5495–5500.
- Tyler, D.M., and Baker, N.E. (2007). Expanded and fat regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Dev. Biol.* *305*, 187–201.
- Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* *5*, 914–920.
- Umar, S. (2010). Intestinal Stem Cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *12*, 340–348.
- Vassilev, A. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* *15*, 1229–1241.
- Vaughan, M.R., and Quaggin, S.E. (2008). How Do Mesangial and Endothelial Cells Form the Glomerular Tuft? *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 24–33.
- Verghese, S., Waghmare, I., Kwon, H., Hanes, K., and Kango-Singh, M. (2012). Scribble Acts in the *Drosophila* Fat-Hippo Pathway to Regulate Warts Activity. *PLoS One* *7*, 1–10.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 11414–11419.
- Vogetseder, A., Karadeniz, A., Kaissling, B., and Le Hir, M. (2005). Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem. Cell Biol.* *124*, 97–104.

- Vogetseder, A., Palan, T., Bacic, D., Kaissling, B., and Le Hir, M. (2006). Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *AJP Cell Physiol.* 292, C807–C813.
- Vogetseder, A., Picard, N., Gaspert, A., Walch, M., Kaissling, B., and Le Hir, M. (2008). Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *AJP Cell Physiol.* 294, C22–C28.
- Voog, J., Sandall, S.L., Hime, G.R., Resende, L.P.F., Loza-Coll, M., Aslanian, A., Yates, J.R., Hunter, T., Fuller, M.T., and Jones, D.L. (2014). Escargot Restricts Niche Cell to Stem Cell Conversion in the *Drosophila* Testis. *Cell Rep.* 7, 722–734.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138, 3907–3914.
- Wang, Z., and Lin, H. (2004). Nanos Maintains Germline Stem Cell Self-Renewal by Preventing Differentiation. *Science* (80-.). 303, 2016–2019.
- Wang, C., Guo, X., Dou, K., Chen, H., and Xi, R. (2015). Ttk69 acts as a master repressor of enteroendocrine cell specification in *Drosophila* intestinal stem cell lineages. *Development* 142, 3321–3331.
- Wang, L., Kounatidis, I., and Ligoxygakis, P. (2014). *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 113.
- Wang, Z.H., Li, Z., Hu, M., Yang, Q.J., Yan, S., Wu, R.S., Li, B.A., and Guo, M. (2017). *Ovol2* gene inhibits the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in lung adenocarcinoma by transcriptionally repressing *Twist1*. *Gene* 600, 1–8.
- Watanabe, K., Villarreal-Ponce, A., Sun, P., Salmans, M.L., Fallahi, M., Andersen, B., and Dai, X. (2014). Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by *ovol2* transcriptional repressor. *Dev. Cell* 29, 59–74.
- Wei, X., Shimizu, T., and Lai, Z.-C. (2007). *Mob* as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J.* 26, 1772–1781.
- Whiteley, M., Noguchi, P.D., Sensabaugh, S.M., Odenwald, W.F., and Kassis, J.A. (1992). The *Drosophila* gene *escargot* encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mech. Dev.* 36, 117–127.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. 3. Zygotic loci on the X chromosome and 4 th chromosome. *Dev. Genes Evol.* 193, 296–307.
- Willecke, M., Hamaratoglu, F., Kango-Singh, M., Udan, R., Chen, C. lin, Tao, C., Zhang, X., and Halder, G. (2006). The Fat Cadherin Acts through the Hippo Tumor-Suppressor Pathway to Regulate Tissue Size. *Curr. Biol.* 16, 2090–2100.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). *hippo* encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell* 114, 445–456.

- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., and Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* *14*, 388–398.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* *121*, 1053–1063.
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F., and O'Connor, M.B. (2013a). Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annu. Rev. Entomol.* *58*, 497–516.
- Yamanaka, N., Romero, N.M., Martin, F.A., Rewitz, K.F., Sun, M., O'Connor, M.B., and Léopold, P. (2013b). Neuroendocrine Control of *Drosophila* Larval Light Preference. *Science* (80-.). *341*, 1113–1116.
- Yan, N., Wu, J.-W., Chai, J., Li, W., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 420–428.
- Yang, C.-C., Graves, H.K., Moya, I.M., Tao, C., Hamaratoglu, F., Gladden, A.B., and Halder, G. (2015). Differential regulation of the Hippo pathway by adherens junctions and apical-basal cell polarity modules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 1785–1790.
- Yang, M.Y., Wang, Z., MacPherson, M., Dow, J.A.T., and Kaiser, K. (2000). A novel *Drosophila* alkaline phosphatase specific to the ellipsoid body of the adult brain and the lower Malpighian (renal) tubule. *Genetics* *154*, 285–297.
- Ye, G.-D., Sun, G.-B., Jiao, P., Chen, C., Liu, Q.-F., Huang, X.-L., Zhang, R., Cai, W.-Y., Li, S.-N., Wu, J.-F., et al. (2016). OVOL2, an Inhibitor of WNT Signaling, Reduces Invasive Activities of Human and Mouse Cancer Cells and Is Down-regulated in Human Colorectal Tumors. *Gastroenterology* *150*, 659–671.e16.
- Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., and Pan, D. (2013). Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2. *Cell* *154*, 1342–1355.
- You, J., Zhang, Y., Li, Z., Lou, Z., Jin, L., and Lin, X. (2014). *Drosophila* perlecan regulates intestinal stem cell activity via cell-matrix attachment. *Stem Cell Reports* *2*, 761–769.
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.M., and Pan, D. (2010). Kibra Functions as a Tumor Suppressor Protein that Regulates Hippo Signaling in Conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* *18*, 288–299.
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1218–1227.
- Zanet, J., Benrabah, E., Li, T., Pelissier-Monier, A., Chanut-Delalande, H., Ronsin, B., Bellen, H.J., Payre, F., and Plaza, S. (2015). Pri sORF peptides induce selective proteasome-mediated protein processing. *Science* (80-.). *349*, 1356–1358.
- Zanet, J., Chanut-Delalande, H., Plaza, S., and Payre, F. (2016). Small Peptides as Newcomers in the Control of *Drosophila* Development. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier Inc.), pp. 199–219.

- Zeng, X., and Hou, S.X. (2015). Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut. *Development* *142*, 644–653.
- Zeng, X., Singh, S.R., Hou, D., and Hou, S.X. (2010). Tumor suppressors Sav/scrib and oncogene ras regulate stem-cell transformation in adult *Drosophila* malpighian tubules. *J. Cell. Physiol.* *224*, 766–774.
- Zhang, C., Robinson, B.S., Xu, W., Yang, L., Yao, B., Zhao, H., Byun, P.K., Jin, P., Veraksa, A., and Moberg, K.H. (2015). The Ecdysone Receptor Coactivator Taiman Links Yorkie to Transcriptional Control of Germline Stem Cell Factors in Somatic Tissue. *Dev. Cell* *34*, 168–180.
- Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., and Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* *14*, 377–387.
- Zhang, N., Bai, H., David, K.K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R.A., and Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 Tumor Suppressor Functions through the YAP Oncoprotein to Regulate Tissue Homeostasis in Mammals. *Dev. Cell* *19*, 27–38.
- Zhao, B., Zhao, B., Wei, X., Wei, X., Li, W., Li, W., Udan, R.S., Udan, R.S., Yang, Q., Yang, Q., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., and Lin, J.D. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 1962–1971.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev.* *24*, 72–85.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 877–883.
- Ziosi, M., Baena-López, L.A., Grifoni, D., Froidi, F., Pession, A., Garoia, F., Trotta, V., Bellosta, P., Cavicchi, S., and Pession, A. (2010). dMyc functions downstream of yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant Cells. *PLoS Genet.* *6*.

Résumé :

Les cellules souches adultes assurent le renouvellement des cellules différenciées, un mécanisme indispensable à la régénération des organes soumis au vieillissement et aux agressions extérieures. Des cellules souches ont été identifiées dans les tubules de Malpighi (TM) qui assurent les fonctions rénales chez la Drosophile. Ces cellules souches rénales (CSR) proviennent à l'origine de précurseurs des cellules souches intestinales (CSI) qui migrent et colonisent les TM pendant la métamorphose. Nous montrons que le facteur de transcription *shavenbaby* (*svb*) est exprimé au sein des CSR. *Svb* est connu pour contrôler la morphogenèse épidermique durant le développement de la Drosophile tandis que son homologue chez l'Homme, *OvoL*, est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse et est dérégulé dans certains cancers. Nous avons découvert que la principale fonction de *svb* au sein des CSR est de prévenir l'apoptose. En effet, la perte de fonction de *svb*, spécifiquement au sein des CSR adultes, induit leur disparition progressive et cet effet est abolit par l'expression d'inhibiteurs d'apoptose. Tout comme dans l'épiderme, nous avons pu observer que la fonction de *svb* est supportée par sa maturation protéolytique induite par les gènes *polished-rice* et *ubr3*. De plus, nous démontrons que *Svb* interagit avec *Yorkie* (*Yki*) un membre de la voie de signalisation Hippo, connue pour contrôler le nombre de CSI. Ce complexe *Svb/Yki* régule l'expression de l'inhibiteur apoptotique *DIAP1* afin de maintenir un nombre normal de CSR. Ces travaux ont donc permis d'identifier un nouveau membre de la voie de signalisation Hippo et de découvrir un mécanisme inattendu de protection des cellules souches contre la mort cellulaire qui pourrait expliquer leur capacité de résistance à l'apoptose.

Abstract :

Throughout adult life, homeostasis of fundamental functions requires cell renewal to compensate for tissue damage and cell death. The renal (Malpighian) tubules in *Drosophila* are responsible for excretion of metabolic waste like kidney in vertebrates. Although Malpighian tubules are thought to be very stable during development, evidence of adult cell renewal have been showed and stem cells identified. Renal and nephric stem cells (RNSC) derived from intestinal stem cell precursors that colonize Malpighian tubules during metamorphosis. We showed that the gene *shavenbaby* (*svb*) which encodes a transcription factor belonging to the OVO-Like family (OVOL) is expressed in RNSCs. In vertebrates, *OvoL* factors act as guardian of epithelial integrity, while in *Drosophila*, *Svb* is well identified for its role in epidermal cell shape remodeling. The transcriptional activity of *Svb* requires its proteolytic processing mediated by the SmORF peptides *Pri* encoded by the *polished-rice* gene. Here, we show that this processing occurs also in RNSC and that the main function of *svb* in these cells is to protect them from apoptosis. *Svb* loss of function induces a progressive disappearance of RNSC that can be rescued by blocking programmed cell death. At the molecular level, we found that *Svb* physically interacts with *Yorkie*, the downstream effector of the hippo pathway to favor the expression of the inhibitor of apoptosis *DIAP1*. To conclude, our work identified a new member of the hippo pathway and uncovered an additional way to protect stem cell from apoptosis that may explain their capacity to resist apoptosis.