



HAL
open science

Rôle des gènes Polycomb dans l'homéostasie intestinale et impact des bioinsecticides Bt sur le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin

Aurélia Joly

► To cite this version:

Aurélia Joly. Rôle des gènes Polycomb dans l'homéostasie intestinale et impact des bioinsecticides Bt sur le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6018 . tel-03972286

HAL Id: tel-03972286

<https://theses.hal.science/tel-03972286>

Submitted on 3 Feb 2023

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 DE DOCTORAT

Rôle des gènes Polycomb dans l'homéostasie
intestinale et impact des bioinsecticides *Bt* sur
le développement de pathologies
inflammatoires de l'intestin

Aurélia JOLY

Institut Sophia Agrobiotech (UMR INRAe 1355 – CNRS 7254 – UCA), Sophia-Antipolis, FRANCE

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences de la vie
et de la Santé, option « Interactions
moléculaires et cellulaires »
de l'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Dr. Raphaël ROUSSET
Soutenue le : Octobre 2022

Devant le jury, composé de :
Dr. Christine COUSTAU, DR, HDR, CNRS
Institut Sophia Agrobiotech, Sophia-Antipolis
Pr. Anne-Marie MARTINEZ, Pr, HDR,
Université de Montpellier
Dr. Julien COLOMBANI, DR, HDR, Université
de Copenhague, DANEMARK
Dr. Benoît CHASSAING, DR, HDR, INSERM
Institut Cochin, Paris
Dr. Raphaël ROUSSET, CR, HDR, CNRS
Institut Sophia Agrobiotech, Sophia-Antipolis

Rôle des gènes Polycomb dans l'homéostasie intestinale et impact des bioinsecticides *Bt* sur le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin

Jury :

Présidente du jury*

Dr. Christine COUSTAU, DR, HDR, CNRS Institut Sophia Agrobiotech, Sophia-Antipolis, FRANCE

Rapporteurs

Pr. Anne-Marie MARTINEZ, Pr, HDR, Université de Montpellier, FRANCE

Dr. Julien COLOMBANI, DR, HDR, Université de Copenhague, DANEMARK

Examineurs

Dr. Benoît CHASSAING, DR, HDR, INSERM Institut Cochin, Paris, FRANCE

Directeur de thèse

Dr. Raphaël ROUSSET, CR, HDR, CNRS Institut Sophia Agrobiotech, Sophia-Antipolis, FRANCE

Titre:

Rôle des gènes Polycomb dans l'homéostasie intestinale et impact des bioinsecticides *Bt* sur le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin

Résumé:

Pour maintenir intégrité et fonctions, l'intestin fait face aux agressions grâce aux cellules souches intestinales (ISC). Générant de nouvelles cellules pour remplacer celles lésées ou mortes, elles sont le pilier de la bonne santé de l'intestin. Mes travaux de thèse montrent que les protéines Polycomb (PcG), connues comme régulateurs de l'expression des gènes, agissent comme suppresseur de tumeur dans les ISC. Les PcG maintiennent ainsi l'identité des ISC, jouant un rôle central dans la santé intestinale. Par ailleurs, l'intestin est soumis à rude épreuve lors d'ingestion de pathogènes. Bioinsecticide le plus utilisé en agriculture, la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se retrouve dans le tube digestif *via* l'alimentation. En montrant que son ingestion répétée à des doses agricoles induit un vieillissement précoce de l'intestin, ce travail fournit une première évaluation des risques liés à la consommation des insecticides *Bt*.

Mots clés:

Homéostasie intestinale ; cellules souches intestinales ; tumorigénèse ; Bioinsecticides *Bt* ; pathologies intestinales ; *Drosophila*

Title:

Role of Polycomb genes in intestinal homeostasis and *Bt* bioinsecticides impact on the intestinal inflammatory pathologies development

Abstract:

To maintain integrity and functions, the intestine faces aggressions thanks to intestinal stem cells (ISC). Generating new cells to replace the damaged or dead ones, they are the mainstay of the intestine's good health. My thesis work shows that Polycomb proteins (PcG), known as regulators of gene expression, act as tumor suppressor in ISCs. PcG thus maintain the identity of ISC, playing a central role in gut health. Furthermore, the gut is subjected to severe stress when pathogens are ingested. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), the most widely used bioinsecticide in agriculture, is present in the gastrointestinal tract via the diet. By showing that its repeated ingestion at agricultural doses induces premature aging of the intestine, our work provides a first assessment of the risks associated with the consumption of *Bt* insecticides.

Keywords:

Intestinal homeostasis ; intestinal stem cells ; tumorigenesis ; *Bt* bioinsecticides ; intestinal pathologies ; *Drosophila*

Ces travaux de doctorat ont été effectués à l'**Institut Sophia Agrobiotech** (ISA), INRAE, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 1355-7254 entre Novembre 2018 et Octobre 2022. J'ai réalisé ma thèse dans l'équipe Bioinsecticides, Environnement et Santé (BES) sous la direction de **Dr. Raphaël ROUSSET**.

Mes trois premières années ont été financées par la **Ligue Nationale Contre le Cancer** et une année supplémentaire par la **Fondation Arc**.

REMERCIEMENTS

M

erci aux membres de mon jury et tout particulièrement à Anne-Marie Martinez et Julien Colombani d'avoir accepté d'être les membres rapporteurs de mon travail de thèse 📖.

Je remercie également Victoria et Laurianne de l'institut de génétique de Montpellier pour leur temps et leur aide sur le projet « Rsc » 🧬. Un immense merci également à Julie Soltys pour son aide primordiale sur le projet « St » 🔬. Merci à chacun d'entre vous, votre aide a été une réelle plus-value pour l'avancée de ma thèse 🧪🧴.

Je remercie chaleureusement le Dr. Arnel Gallet de m'avoir accueillie dans son équipe au cours de mon stage de M1, puis pour mon doctorat 🐝. Merci pour ta disponibilité en toute circonstances, tes conseils et les discussions bienveillantes que tu as partagé avec moi au cours de mon stage de M1 et tout au long de ces 4 années de doctorat. Doctorat qui n'aurait pas pu avoir lieu sans le soutien de mon directeur de thèse, le Dr. Raphaël Rousset. Merci de m'avoir soutenue et appuyée, afin que je puisse avoir l'opportunité de faire ma thèse au sein de l'équipe grâce à un financement de la Ligue contre le Cancer. Je te remercie pour ces 4 années au cours desquelles j'ai pu développer de solides compétences scientifiques et humaines au sein de l'équipe. Sous ta supervision, j'ai su me construire doucement mais sûrement en tant que scientifique 🧑🔬. Merci pour ta patience et ta présence.

Je remercie Julie Soltys, la personne avec qui j'ai passé le plus de temps au cours de ces 4 années. Merci à mon gens préféré, mon binôme de tous les jours, mon acolyte de chaque dinguerie 😊 et bien sûr mon Amie 🎀. Avoir chacune l'une l'autre nous a prodigué un

soutien indéniable face à la solitude qu'il pouvait régner parfois (souvent), et les remises en question qui pouvaient survenir. Je te remercie pour ton soutien, qu'il ait été personnel ou professionnel, en toutes circonstances au cours de ma thèse, même dans les moments difficiles 📖. Il s'en est passé des choses en 4 ans ⌚. Nous sommes chacune devenue une meilleure version de nous-même, 4 ans de voyage dans la vie partagé quotidiennement. Il est rare de rencontrer une personne sincère et honnête, encore plus dans le cadre professionnel. Tu m'as aidé à me canaliser et à mieux interagir avec mes semblables dans le cadre de mes relations professionnelles ... 🧠 PTDR

j'avoue quelquefois j'abuse mais je n'y peux rien si la stupidité, l'égoïsme et le manque de bienveillance m'insupporte. Et l'égoïsme, et la vanité aussi... Et le comportement de type anguille... et les panières qui traînent dans l'évier et la hotte pas nettoyée... Ouais bon beaucoup de choses en fait. Grâce à toi je tourne ma langue 7 fois dans ma bouche avant de râler !

Quoiqu'il en soit, le jour où j'écris ces lignes l'avenir est incertain mais je souhaite de tout cœur que tu trouves une place que tu mérites dans un environnement qui t'épanouisse.

Je tiens également à remercier sincèrement les membres de l'équipe. Merci Marie-Laure, Nathalie et Alexandra pour vos conseils avisés dès que j'en avais besoin et le partage de vos connaissances. Merci pour votre disponibilité ainsi que votre bienveillance. Merci également à Marcel avec qui j'ai pu partager mon bureau quelque temps, pour ces discussions passionnées et intéressantes. (Et bien évidemment pour la musique 🎸).

Merci à Fatima et Arnaud pour les trop rares mais sympathiques interactions que nous avons eues, qu'elles aient été scientifiques ou amicales. Je vous souhaite à tous les deux bon courage et de la réussite pour vos thèses respectives.

Un merci tout particulier à ma famille et mes amis 🌟. Qui je sais, ne sont pas peu fiers de compter un Docteur parmi leur proche et m'ont soutenue et encouragée dans la voie qui a toujours été la mienne, la science. Maman je sais à quel point tu es fière de moi 💜. Papa, merci infiniment pour tout. Brigitte, merci pour ton soutien et ton intérêt. A mes grands-parents, Jeannine et Roger, milles mercis... Frère, toi aussi même si tu mets 15 jours à répondre à

un message (les pigeons voyageurs étaient plus rapides au moyen-âge) 🐱. A tous mes amis, et à ceux qui m'ont encouragé de près ou de loin, merci les copains 🌻. Merci du fond du cœur. Votre présence le jour de ma soutenance est une source de joie incommensurable pour moi ❤️. J'ai la chance d'avoir une famille et des amis tels que vous 🍀.

Je te remercie, Jérôme mon Amoureux, pour le soutien et l'écoute que tu as su me prodiguer depuis le début, au cours de mon doctorat ❤️. Je suis très heureuse et reconnaissante que tu me suives afin de poursuivre cette aventure, au-delà de l'Atlantique 🌊 🍁. Un nouveau chapitre important de ma vie s'ouvre avec toi à mes côtés, et avec Mochi 🐱.

Enfin, un remerciement un peu atypique. On oublie toujours de remercier la personne la plus importante. Soi-même. Je tiens à me remercier pour avoir voulu chaque jour progresser et m'améliorer scientifiquement, techniquement et humainement 🦋. La progression et l'acquisition de compétences nécessite du temps et n'est pas un processus linéaire et encore moins exponentiel. Parfois il y a des plateaux, où la démotivation et la peur de l'échec, de ne pas être capable, pointe le bout de son nez (syndrome de l'imposteur you know) 🤪. Il faut rester indulgent, ne pas perdre ses objectifs de vue et avoir confiance en le processus de progression qui nécessite temps, de l'investissement et de la régularité 💎. Chacun progresse à son rythme et que tant qu'il travaille avec efforts et aiguisé son esprit critique, il est sur la bonne voie. C'est soi contre soi-même 🦋. Je suis reconnaissante et heureuse d'avoir pris le temps, malgré l'investissement que demande une thèse, d'accomplir des objectifs personnels qui m'étaient très importants ❤️.

Merci 🦋 ...

TABLE DES MATIERES

PARTIE I: INTRODUCTION

CHAPITRE I : L'intestin, organe modèle.....	20
I-1 L'intestin, de <i>Drosophila melanogaster</i> aux mammifères	20
I-1-1 Généralités et structure.....	20
I-1-2 Composition cellulaire et jonctions.....	23
I-2 Homéostasie et renouvellement du tissu intestinal.....	26
I-2-1 L'homéostasie, un équilibre en constante fluctuation.....	27
I-2-2 Les cellules souches, socle de l'intégrité tissulaire.....	29
I-2-3 Régulations du processus de différenciation des ISC	30
I-2-4 Régulations de la prolifération des ISC.....	33
I-3 Dérégulations et dysfonctionnements.....	39
I-3-1 Les pathologies de l'intestin.....	40
I-3-2 Des variables aux rôles cruciaux... ..	41
I-3-3 Le vieillissement de l'intestin (ou le concert désaccordé du microbiote, de l'immunité et des gènes)	49
CHAPITRE II : Maestro épigénétiques :	52
les protéines Polycomb et Trithorax.....	52
II-1 Historique et présentation des gènes Polycomb et Trithorax	52
II-2 Mode d'action des PcG	54
II-2-1 Le <i>Polycomb repressive complex 1</i> (PRC1)	56
II-2-2 Le <i>Polycomb repressive complex 2</i> (PRC2)	59
II-2-4 Le complexe PR-DUB	63
II-2-5 Le complexe Pho-RC	63
II-2-6 Recrutement et régulation des PcG.....	65
II-3 Fonctions biologiques et pathologies associées	68
II-3-1 Mécanismes biologiques impliquant les PcG	68
II-3-2 PRC1 et PRC2 dans les cancers	71
II-4 PRC1 et PRC2 dans l'intestin	73
CHAPITRE III : Les bioinsecticides à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	75
III-1 Les pesticides	75
III-2 Le genre <i>Bacillus</i> et ses nombreuses facettes	77
III-3 L'espèce <i>Bacillus thuringiensis</i>	79

III-3-1 Bioinsecticides <i>Bt</i> : mode d'action sur les insectes cibles.....	82
III-3-2 Conséquences de l'utilisation croissante de <i>Bt</i> comme bioinsecticide.....	85
OBJECTIFS DE LA THESE	
Rôle des protéines PcG dans l'homéostasie intestinale	90
Impact de <i>Bt</i> sur le développement de physiopathologies de l'intestin	91
PARTIE II : RESULTATS	
CHAPITRE I : Rôle des protéines Polycomb dans l'homéostasie de l'intestin.....	93
I-1 Résumé	93
I-2 Article : <i>Joly et al., en préparation</i>	94
CHAPITRE II : Rôle des E3 ubiquitines ligases dans l'homéostasie intestinale.....	113
II-1 Contexte	118
II-2 Hypothèse et méthodologie.....	119
II-3 Résultats obtenus.....	120
CHAPITRE III : Impact des bioinsecticides <i>Btk</i> sur le développement de physiopathologies de l'intestin.....	126
III-1 Résumé.....	126
III-2 Article : <i>Joly*, Soltys* et al., en préparation</i>	127
III-3 Impact des bioinsecticides <i>Btk</i> sur le développement de pathologies inflammatoires et de cancers chez des individus génétiquement prédisposés	144
PARTIE III : DISCUSSION	
III-1 Rôle des protéines Polycomb dans l'homéostasie de l'intestin	154
III-2 Rôle des E3 ubiquitines ligases dans l'homéostasie intestinale.....	159
III-2-1 Perte de fonction des E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1	159
III-2-2 Crible RNAi de la perte de fonction des E3 ub.L codées par le génome de la drosophile.....	160
III-3 Impact des bioinsecticides <i>Btk</i> sur le développement de physiopathologies de l'intestin	161
PARTIE IV : CONCLUSIONS	
ANNEXE I: REVUE 1 - Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells. <i>A. Joly and R. Rousset. IJMS, 2020.</i>	168
ANNEXE II : L'intestin de la drosophile comme modèle d'étude : les outils puissants utilisés.	186
ANNEXE III : REVUE 2 - Impact des bioinsecticides à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le développement de cancers de l'intestin. <i>A. Joly, J. Soltys, A. Gallet, R. Rousset. Médecine/sciences, 2020</i>	190

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Morphologie de l'intestin de mammifère et de drosophile et compartimentalisation du midgut de la drosophile.....	22
Figure 2: Organisation tissulaire et cellulaire de l'intestin de mammifère et de drosophile.....	25
Figure 3: Organisation apico-basal de l'épithélium intestinal.	26
Figure 4: Maintien de l'homéostasie intestinale.....	28
Figure 5: Principaux signaux du contrôle de la prolifération des ISC.	34
Figure 6: Variables impactant l'homéostasie intestinale	39
Figure 7: Variables importantes pouvant favoriser l'apparition/progression de pathologies inflammatoires et de cancers.	48
Figure 8: Dysbiose intestinale chez la drosophile au cours du vieillissement.....	50
Figure 9: Mécanisme d'action canonique de PRC1 et PRC2 dans la répression de la transcription chez la drosophile.	55
Figure 10: Composition des complexes PRC1 chez la drosophile et les mammifères.	58
Figure 11: Composition des complexes PRC2 chez la drosophile et les mammifères.	60
Figure 12: Composition des complexes PR-DUB et Pho-RC chez la drosophile et les mammifères.....	64
Figure 13: Mécanismes moléculaires additionnels de recrutement de PRC1 et PRC2 décrits chez les mammifères.....	67
Figure 14: Phylogénie du genre <i>Bacillus</i> , adaptée de Owusu-Darko et al., 2020.	78
Figure 15: Cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i>	79
Figure 16: Structure 3D Cry1Aa (PDB 1CIY)	80
Figure 17: Diversité des toxines Cry et leurs cibles.	81
Figure 18: Modes d'actions des toxines Cry selon les modèles décrits dans la littérature.....	84
Figure 19: Phénotypes observés pour la perte de fonction des E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1	121
Figure 20: Proportions des différents phénotypes observés du crible RNAi pour les 92 E3 ub.L testées	122
Figure 21: Phénotypes divers obtenus au cours du crible RNAi	124
Figure 22 : Impact de <i>Bt</i> sur des drosophiles pro-inflammées.	151
Figure 23 : Impact d'une ingestion chronique de <i>Bt</i> sur la survie des drosophiles portant une mutation pro-tumorale.....	153
Figure 24: Modèle d'action des PcG dans les ISC chez la drosophile	158

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : REVUE 1 - Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells. *A. Joly and R. Rousset. IJMS, 2020.*

ANNEXE II : L'intestin de la drosophile comme modèle d'étude : les outils puissants utilisés.

ANNEXE III : REVUE 2 - Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin. *A. Joly, J. Soltys, A. Gallet, R. Rousset. Médecine/sciences, 2020.*

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique
AEBP2: AE-1-Binding Proteins 2
AJ: Adherens junctions
ALP: Alcaline phosphatase
AMPs: Peptides antimicrobiens
APC: Adenomatous Polyposis Coli
APN: Aminopeptidase N
Arm: Armadillo
ARN: Acides ribonucléiques
ATM: Ataxia telangiectasia mutated
ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related

β -cat: β -caténine
Ba: *Bacillus anthracis*
Bc: *Bacillus cereus*
BMP: Bone morphogenetic protein
Bt: *Bacillus thuringiensis*
Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*
Btk: *Bacillus thuringiensis kurstaki*

Caf1-55: Chromatin assembly factor 1, p55 subunit
CBX: Chromobox-domain proteins
CFS: Common fragile sites
Cry: Crystal
Cyt: Cytolytic toxins
CytK: Cytotoxine K

DDR: DNA damage response
DI: Delta
Dpp: Decapentaplegic
dRAF: dRING-associated factors
dRING: drosophila really interesting new gene
DSB: Double-strand break
DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

EB: Entéroblaste
EC: Entérocyte
EE: Entéroendocrine
EED: Embryonic ectoderm development
EEp: Entéroendocrine précurseur
EFSA: Autorité européenne de sécurité des aliments

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EPOP: Elongin BC And Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein
Esc: Extra sexcombs
Esg: Escargot
EZH: Enhancer of zeste (mammifères)
E(z): Enhancer of zeste (drosophile)

Flp: Flipase
FRT: Flipase recognition target

GFP: Green fluorescent protein

Hbl: Hemolysin BL
Hpo: Hippo

IIS: Insulin/insulin-like signaling
IMD: Immune deficiency pathway
INSERM: Institut national de la santé et de la recherche médicale
ISC: Cellules souches intestinales (intestinal stem cells)

JNK: c-Jun-N-terminal kinase
Jarid2: Jumonji, AT rich interactive domain 2

LCOR: Ligand-dependent corepressor
Lgr5: Leucine-rich-repeat containing G-protein-coupled receptor 5

MARCM: Mosaic analysis with a repressible cell marker
MICI: Maladies inflammatoires chroniques intestinales
MPT: Modification post-traductionnelle

NHE: Non-hemolytic enterotoxin
NHEJ: Non-homologous end joining

Pc: Polycomb
PcG: Polycomb group
Pcl: Polycomb like
PDM1: POU/homeodomain
Ph: Polyhomeotic
PR-DUB : Polycomb repressive de-ubiquitinase
PRC: Polycomb repressive complex
PRE: Polycomb responsive element
Pros: Prospero
Psc: Posterior sex combs

RH: Recombinasion homologue

RNAi: ARN interference

ROS: Reactive oxygen species

SAM: Sterile Alpha Motif

Sc_e: Sex combs extra

Sc_m: Sex comb on midleg

Sc_r: Sexcombs reduced

Sfmbt: Scm-related gene containing four mbt domains

Sip: Secreted insecticidal proteins

SJ: Septate junctions

Su(H): Suppressor of Hairless

Su(z)₂: Suppressor of zeste 2

Su(z)₁₂: Suppressor of zeste 12

TA: Transient amplifying

TAD: Topological associated domain

TGF-β: Transforming Growth Factor β

TrxG: Trithorax group

UAS: Upstream activating sequences

UFC: Unité formant colonie

Upd: Unpaired

UV: Ultraviolet

Vip: Vegetative insecticidal proteins

VM: Visceral muscle

Wg: Wingless

Yki: Yorki

RESUME

L'intestin est un organe multifonctionnel complexe faisant partie du système digestif. Pour maintenir son intégrité et ses différentes fonctions (digestives, absorbantes, immunitaires, endocriniennes), l'épithélium intestinal doit faire aux agressions quotidiennes provenant des aliments, des métabolites, du microbiote, des pathogènes ou des molécules chimiques ingérés. L'épithélium intestinal étant une unique couche cellulaire, il doit lutter en permanence pour garder son intégrité et ses fonctions. Pour y parvenir, les cellules souches intestinales (ISC) permettent à l'intestin de générer de nouvelles cellules remplaçant celles lésées, âgées ou mortes, maintenant l'homéostasie tout en limitant le risque de développer des pathologies telles que les maladies inflammatoires et les cancers.

Mes travaux de thèse s'appuient sur l'intestin de *Drosophila melanogaster*, modèle reconnu pour étudier les mécanismes d'homéostasie intestinale et la biologie des cellules souches adultes. Dans un premier projet, j'ai analysé le rôle des protéines du groupe Polycomb (PcG) dans les ISC. J'ai également, dans un deuxième projet, étudié les effets de l'ingestion chronique d'insecticides à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) sur le développement de maladies intestinales.

Les protéines PcG participent à l'organisation 3D du génome et au contrôle de l'expression génique. Les PcG et leurs mécanismes sont conservés des plantes aux mammifères et ont d'abord été identifiés comme régulateurs dans les processus de développement. Plus tard, les PcG ont été décrits comme impliqués dans divers processus, notamment la régulation des cellules souches adultes. Les activités d'ubiquitination et de triméthylation de deux complexes répressifs Polycomb majeurs, PRC1 et 2, conduisent à la propagation et au maintien de la répression génique en compactant la chromatine. J'ai montré par des expériences de perte de fonction que PRC1 et PRC2 permettent le maintien de l'identité des ISC et de leur capacité à générer des cellules différenciées. En effet, les ISC mutantes perdent les marqueurs cellules souches et forment des tumeurs néoplasiques. En étudiant différentes voies de signalisation, j'ai identifié la voie JAK/STAT comme étant activée dans les tumeurs générées. Les protéines PcG impacte donc directement l'homéostasie intestinale en agissant comme suppresseur de tumeur dans les ISC.

En condition défavorable, le genre *Bacillus* a la particularité de former un état de dormance extrêmement résistant, la spore. La réponse de l'intestin face aux spores de bactéries a été très peu étudiée et fait l'originalité de la thématique de l'équipe. Sous forme de spores, *Bt* est le

bioinsecticide le plus utilisé en agriculture comme méthode alternative aux pesticides chimiques pour protéger les cultures des ravageurs. *Bt* est génétiquement très proche de *B. cereus* (*Bc*), qui est le deuxième agent responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France. Alors que l'impact de *Bt* sur les organismes non-cibles est controversé, des études récentes suggèrent que certaines TIAC pourraient être attribuées à des souches de *Bt* d'origine agricole. Ainsi, mon deuxième projet avait pour objectif d'évaluer si la présence répétée de *Bt* dans l'intestin via l'alimentation pouvait induire un contexte pathologique. Nous avons montré que l'ingestion chronique de *Bt*, à des doses agricoles, induit une dysplasie précoce et un vieillissement prématuré de l'intestin. J'ai également montré que ce phénomène était aggravé chez des drosophiles génétiquement prédisposées à développer des maladies inflammatoires. Ainsi, ce travail permet une première évaluation des risques de maladies intestinales liées à la consommation chronique d'insecticides *Bt*.

SUMMARY

The intestine is a complex multifunctional organ that is part of the digestive system. To maintain its integrity and its various functions (digestive, absorbent, immune, endocrine), the intestinal epithelium must deal with daily aggressions from food, metabolites, microbiota, pathogens or chemical molecules that are ingested. Since the intestinal epithelium is a single-cell layer, it must constantly fight to maintain its integrity and functions. To achieve this, intestinal stem cells (ISC) allow the intestine to generate new cells to replace injured, old or dead ones, maintaining homeostasis while limiting the risk of developing pathologies such as inflammatory diseases and cancers. My thesis work relies on the intestine of *Drosophila melanogaster*, a recognized model for studying intestinal homeostasis mechanisms and adult stem cell biology. In a first project, I analyzed the role of Polycomb group (PcG) proteins in ISC. In a second project, I also studied the effects of chronic ingestion of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) insecticides on the development of intestinal diseases.

PcG proteins participate in the genome 3D organization and in gene expression control. PcG and their mechanisms are conserved from plants to mammals and were first identified as regulators in developmental processes. Later, PcG were described as involved in various processes, including the regulation of adult stem cells. The ubiquitination and trimethylation activities of the two major Polycomb repressive complexes, PRC1 and 2, lead to the propagation and maintenance of gene repression by chromatin compaction. Through loss-of-function experiments, I have shown that PRC1 and PRC2 allow the maintenance of ISC identity and their ability to generate differentiated cells. Indeed, ISC mutant lose stem cell markers and form neoplastic tumors. By studying different signaling pathways, I identified the JAK/STAT pathway as being activated in the resulting tumors. PcG proteins therefore directly impact gut homeostasis by acting as tumor suppressors in ISCs.

In unfavorable conditions, the *Bacillus* genus can form an extremely resistant state of dormancy, the spore. The intestinal response to bacterial spores has been poorly studied and makes the originality of the team's work. In the form of spores, *Bt* is the most widely used bioinsecticide in agriculture as an alternative method to chemical pesticides to protect crops from pests. *Bt* is genetically very close to *B. cereus* (*Bc*), which is the second agent responsible for foodborne outbreaks (FBO) in France. While the impact of *Bt* on non-target organisms is controversial, recent studies suggest that some FBO could be attributed to *Bt* strains from agriculture. Thus, my second project aimed to assess whether the repeated presence of *Bt* in the

intestine through the food could induce a pathological context. We have shown that *Bt* chronic ingestion, at agricultural doses, induces early dysplasia and premature aging of the gut. I also showed that this phenomenon was aggravated in fruit flies genetically predisposed to develop inflammatory diseases. Thus, this work provides a first assessment of the risks of intestinal diseases linked to the chronic consumption of *Bt* insecticides.

PARTIE I: INTRODUCTION

CHAPITRE I : L'intestin, organe modèle

I-1 L'intestin, de *Drosophila melanogaster* aux mammifères

I-1-1 Généralités et structure

L'intestin est un organe vital qui constitue une partie du tractus gastro-intestinal (ou tube digestif). Son rôle principal est de digérer les aliments (afin de les dégrader en éléments plus simple), lui permettant ensuite d'absorber les nutriments qu'ils contiennent. De façon tout aussi importante, l'intestin constitue la principale barrière face aux agresseurs et pathogènes ingérés avec la nourriture. Plusieurs caractéristiques lui permettent d'assurer cette fonction :

- La monocouche de cellules épithéliales intestinales constitue en premier lieu une barrière physique. Des jonctions intercellulaires adhérentes et serrées permettent une imperméabilité face aux éléments extérieurs présents dans le lumen.
- L'épithélium intestinal est recouvert d'une couche de mucus chez les mammifères ou d'une membrane péritrophique de nature chitineuse chez les insectes comme la drosophile, qui prodigue une barrière protectrice supplémentaire à franchir avant d'atteindre la surface de l'épithélium.
- Il est également pourvu d'une réponse immunitaire innée par la sécrétion d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et de peptides antimicrobiens (AMPs).

L'intestin de la drosophile est plus simple que celui des vertébrés mais se compose de trois segments dont les fonctions physiologiques sont comparables à ceux présents chez les mammifères (**Fig. 1A**) : la partie antérieure nommée « **foregut** » (équivalent de l'œsophage des mammifères) régule le passage de la nourriture dans la partie suivante. La partie moyenne nommée « **midgut** » (équivalent de l'intestin grêle) est détaillée plus bas. Et la partie postérieure nommée « **hindgut** » (équivalent du colon) qui régule l'élimination des déchets. Rattaché à la partie antérieure, le « **crop** » est une structure ayant un rôle de stockage ainsi que la capacité à se contracter afin de favoriser le passage des aliments le long du tube digestif (Cai et al., 2020).

Dans le midgut se distinguent 3 sections composées au total de 5 régions (R1-5) (**Fig. 1B**). Le midgut antérieur (**R1** et **R2**) produit des enzymes pour le métabolisme des lipides et des protéines, responsables de la digestion. La zone acide ou dites des « *copper cells* » (**R3**) contient des cellules spécialisées qui maintiennent une région acidifiée semblable à l'estomac pour aider à la dégradation des aliments et réguler la population bactérienne (H. Li & Jasper, 2016b; Strand & Micchelli, 2013). Et le midgut postérieur (**R4** et **R5**) une région importante pour l'absorption des aliments. Cette région est hautement proliférative et très étudiée dans le cadre de la biologie des cellules souches intestinales (Buchon et al., 2013; Dutta et al., 2015; Marianes & Spradling, 2013; Strand & Micchelli, 2013).

Au-delà de cette compartimentation, une étude de Buchon et al. a permis de montrer qu'il existe une régionalisation de l'intestin de la drosophile encore plus fine en 14 sous-régions. Ces compartiments présentent des caractéristiques morphologiques, histologiques et d'expression géniques qui leur sont propres (Buchon et al., 2013) (**Fig.1B**). En effet, des facteurs de transcription impliqués dans le développement régulent la régionalisation de l'intestin moyen et sont nécessaire au maintien de l'homéostasie du tissu (Buchon et al., 2013). Cette même publication a mené à la mise à disposition d'une base de données interactive qui fournit un atlas complet de l'intestin moyen adulte de *Drosophila melanogaster*. Dans cette base de données se trouve une description exhaustive des différentes régions de l'intestin moyen, les coordonnées de chaque région, leurs caractéristiques anatomiques et histologiques, ainsi que des données d'expression géniques (<https://flygut.epfl.ch/>).

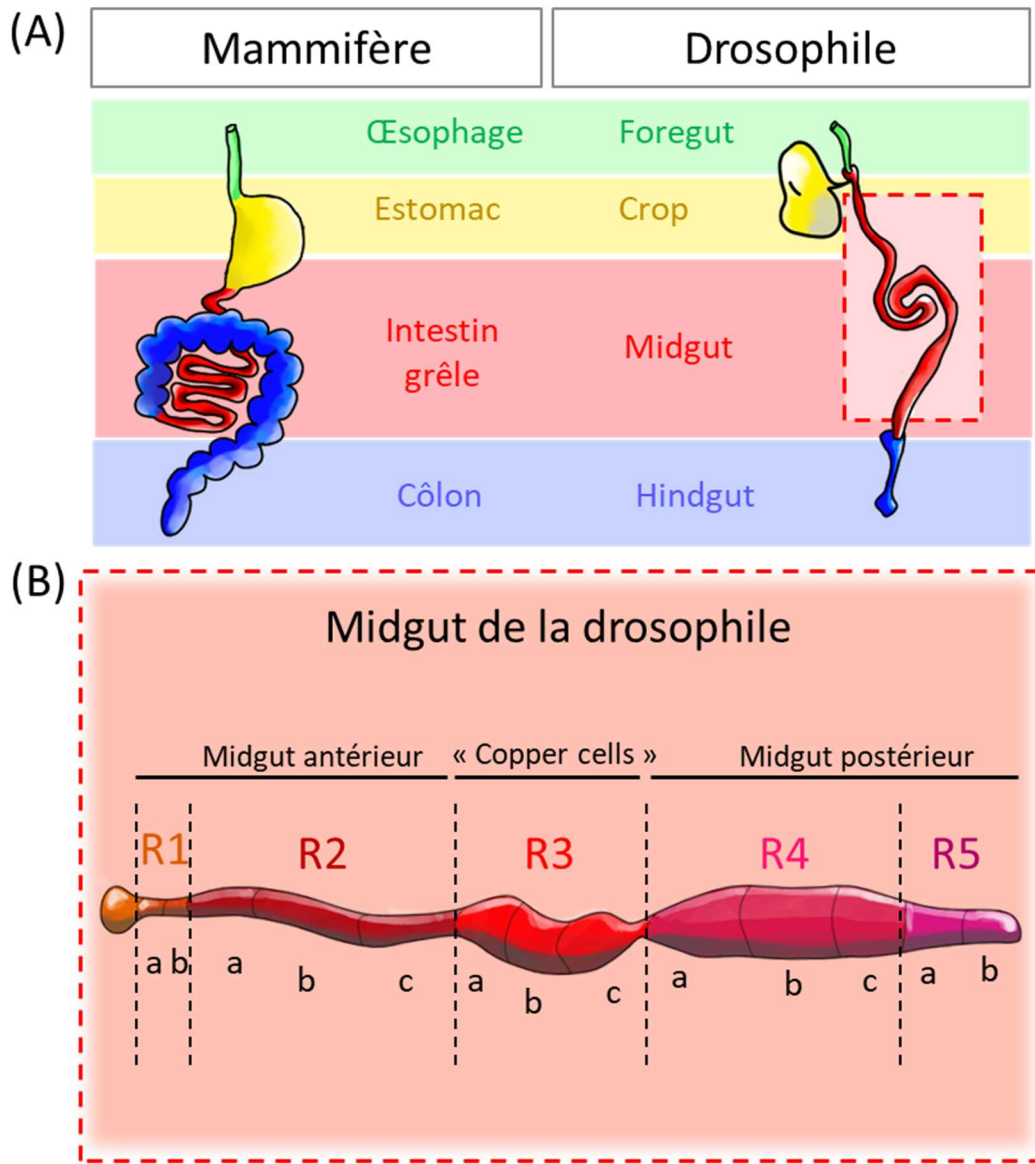


Figure 1: Morphologie de l'intestin de mammifère et de drosophile (A), et compartimentalisation du midgut de la drosophile (B).

I-1-2 Composition cellulaire et jonctions

Chez les mammifères comme chez la drosophile, l'épithélium intestinal se constitue d'une seule couche de cellules (**Fig. 2**). Chez les mammifères, elle est dite « simple » où chaque cellule sont alignées les unes par rapport aux autres. Chez la drosophile elle est dite « pseudostratifiées » en raison de l'imbrication des cellules les unes par rapport aux autres (**Fig. 2**). Cette disposition donne l'impression que l'épithélium est constitué de plusieurs couches cellulaires, alors qu'il s'agit d'une seule couche de cellules dont chacune d'entre elles est en contact avec la lame basale. Contrairement aux mammifères, l'épithélium intestinal de la drosophile ne s'organise pas en replis, qui permettent la formation de cryptes et de villosités. En dépit de cette différence, la structure et la morphologie cellulaire de l'épithélium intestinal de la drosophile restent très conservées jusqu'aux mammifères (H. Li & Jasper, 2016b) (**Fig. 2**). Dans le midgut, l'ensemble des cellules sont identifiables par leur morphologie et les gènes (marqueurs) qu'elles expriment (**Fig. 2**). Chez la drosophile, les cellules souches intestinales (ISC) sont de petites taille et bien protégées par les cellules adjacentes, et expriment les marqueurs *Delta (Dl)* et *escargot (esg)* (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Ces cellules ont la capacité de se diviser principalement de façon asymétrique afin de générer une nouvelle cellule souche et un progéniteur qui se différenciera en cellule fonctionnelle. Elles ont également la possibilité de le faire de façon symétrique selon les besoins du tissu pour générer deux ISC ou deux progéniteurs. Depuis 2015, deux types de progéniteurs (et non plus un commun) se distinguent. Ils permettent de générer chacune des lignées de cellules différenciées déjà caractérisées en amont (Benoît Biteau & Jasper, 2014; Zheng Guo & Ohlstein, 2015; X. Zeng & Hou, 2015). Les progéniteurs des cellules entéroendocrines (EEp) expriment les marqueurs *Delta (Dl)*, *escargot (esg)*, *piezo*, et *prospero (pros)* (He et al., 2018), tandis que les entéroblastes (EB) expriment *esg* et *Suppressor of Hairless (Su(H))*. Les EEp ont la possibilité de se différencier directement en cellule sécrétrice. Cependant, le plus souvent (71% des cas), elles se divisent pour générer deux cellules filles sécrétrices (He et al., 2018). Ces cellules sont appelées cellules entéroendocrines (EE). Il existe plusieurs sous-types de cellules EE caractérisées par les cocktails d'hormones/neuropeptides qu'elles expriment (Beehler-Evans & Micchelli, 2015; Ji Chen et al., 2016; X. Guo, Yin, et al., 2019). L'ensemble des cellules de la lignée sécrétrice ont de petits noyaux et expriment en communs le marqueur *pros*. Les EB quant à eux se différencient en cellules absorbantes nommées entérocytes (EC) représentant 90% des cellules du tissu. Elles possèdent un gros noyau polyploïde qui leur est

caractéristique et expriment notamment le marqueur *nubbin* aussi appelé *PDMI* pour « *POU/homeodomain* » (W.-C. Lee et al., 2009; Tang et al., 2018).

Deux populations d'ISC ont été décrites chez les mammifères. A la base des cryptes, une population de cellules nommées « CBC cells » pour « crypt base columnar cells » sont intercalées entre les cellules de Paneth et expriment le marqueur *Lgr5* (*Leucine-rich-repeat containing G-protein-coupled receptor 5*) (Barker et al., 2007) (**Fig. 2**). Ces cellules sont l'équivalent des ISC de drosophiles exprimant les marqueurs *Dl* et *esg* (Barker et al., 2007; Cheng & Leblond, 1974). Une seconde population de cellules souches a été décrite localisées à la position +4 à partir de la base de la crypte (nommées « cellules +4 »), juste au-dessus des cellules de Paneth (Barker et al., 2012; Cairnie et al., 1965; Clevers, 2013; Marshman et al., 2002; Potten et al., 2002). Ces cellules sont dites quiescentes car se divisent très peu. En effet, il a été montré qu'elles sont capables de retenir des marqueurs de l'ADN tel que le BrdU ou la thymidine tritiée (incorporés dans l'ADN lors de la phase de synthèse et qui se perd au cours des divisions), leur valant le nom alternatif de « label-retaining cells » (Potten et al., 1974). Il est également intéressant de noter que les cellules +4 seraient capables de redonner des ISC *Lgr5+* (CBC cells) lorsque celles-ci sont éliminées, constituant un pool d'ISC de réserve (Bankaitis et al., 2018; H. Tian, Biehs, Warming, Leong, Rangell, Klein, & de Sauvage, 2011; Yan et al., 2012). Des études ont permis de révéler de potentiels marqueurs de ces cellules tels que les gènes *Bmi-1*, *mTert*, *Hopx* et *Lrig1* (Montgomery et al., 2011; Powell et al., 2012; Sangiorgi & Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011). Les ISC *Lgr5+* se divisent principalement de manière asymétrique afin de se renouveler et générer un progéniteur nommé cellules transitoires (TA pour « transient amplifying cells »). Ces TA vont migrer de la crypte en direction des villosités de façon active afin de générer des cellules différenciées : soit des cellules absorbantes (EC), soit des cellules sécrétrices (Barker et al., 2007; Krndija et al., 2019). Chez les mammifères, il existe plusieurs types de cellules sécrétrices (**Fig. 2**). Il existe des cellules EE, mais également des cellules en gobelet (G), des cellules tuft (T) et des cellules de Paneth (P) absentes chez la drosophile. Leurs fonctions spécifiques sont donc assumées chez la drosophile par les EC et les cellules EE. Les cellules G sont des cellules en forme de vase, allongées, dont la fonction est de produire et de sécréter du mucus. Les cellules T possèdent un rôle récemment découvert dans la réponse immunitaire de type 2 (anti parasitaire et allergique). Cette découverte provient de trois équipes de recherche indépendante de façon simultanée (Gerbe et al., 2016; Howitt et al., 2016; Von Moltke et al., 2016). Enfin, les cellules P sont les seules à migrer en direction de la crypte contrairement à l'ensemble des autres cellules

différenciées, et participent à la niche des ISC et à la sécrétion d'AMPs (Sato et al., 2011). Récemment, les progrès du séquençage de l'ARN unicellulaire (« single cell ») ont permis la description complète des différents types cellulaires de l'intestin grêle de la souris et de l'intestin moyen de la drosophile (Haber et al., 2017; R.-J. Hung et al., 2020). Sur la base de l'expression des gènes, les cellules EE de drosophile sont similaires aux cellules EE de souris, aux cellules G et T. Les cellules du proventricule de la drosophile (structure arrondie localisée à l'extrémité antérieure de l'intestin moyen, en amont du R1) sont connues pour sécréter des composants de la membrane péritrophique, qui a le même rôle protecteur que le mucus des mammifères. Ces cellules sont également équivalentes aux cellules G (R.-J. Hung et al., 2020). De plus, les cellules de Paneth sont apparentées aux EC antérieurs producteurs de lysozymes. Il est intéressant de noter que cinq types de cellules chez la drosophile n'ont pas pu être clairement spécifiés, bien que trois d'entre eux puissent faire partie de la lignée EC (R.-J. Hung et al., 2020).

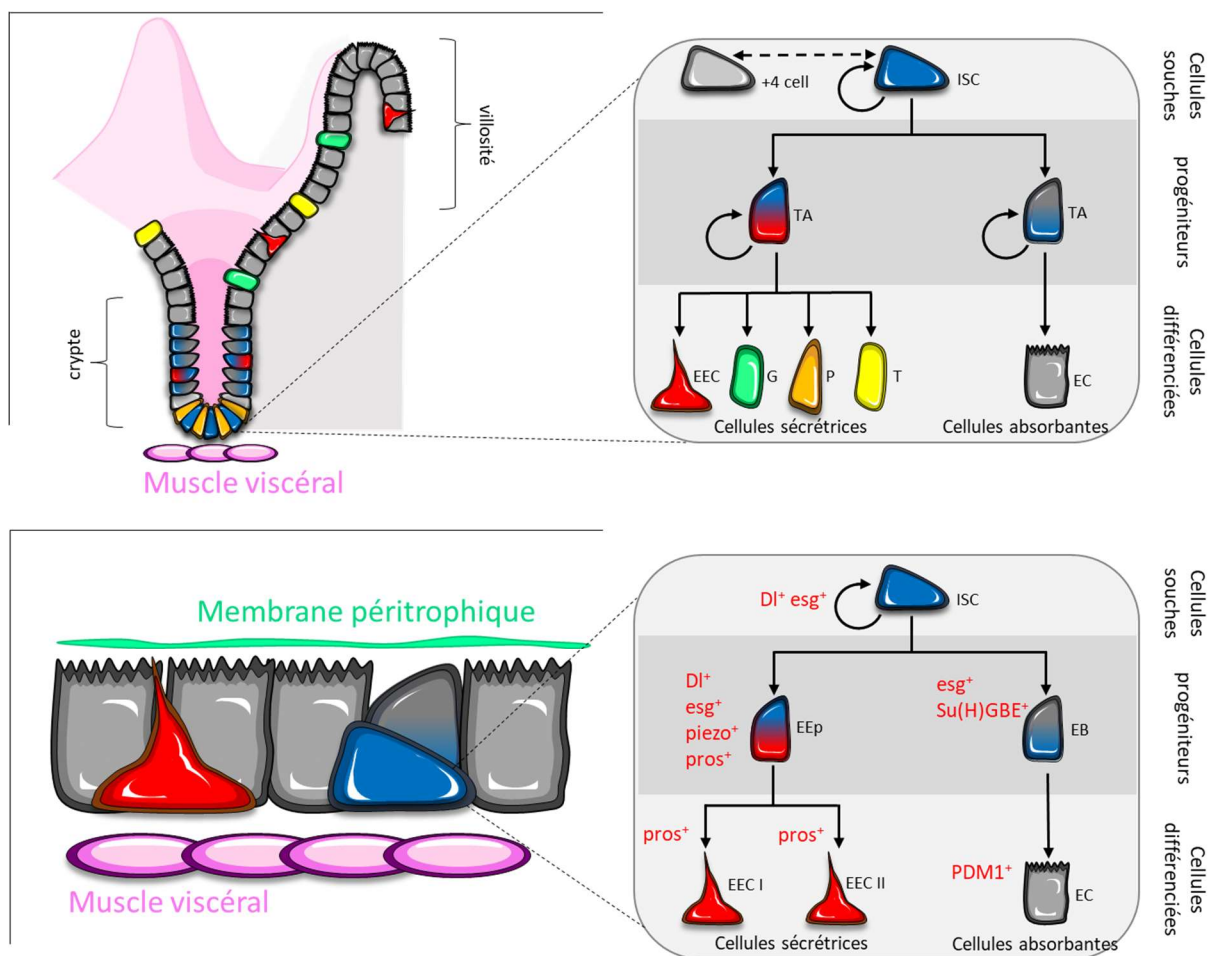


Figure 2: Organisation tissulaire et cellulaire de l'intestin de mammifère (en haut) et de drosophile (en bas).

A gauche, morphologie de l'épithélium intestinal. A droite, lignage cellulaire composant l'épithélium. Dans le lignage de la drosophile, en rouge les marqueurs exprimés par les différents types cellulaires

L'ensemble de ces cellules de l'intestin sont liées entre elles en une monocouche grâce à différentes jonctions intercellulaires caractéristiques des épithéliums. La structure, les compositions moléculaires et les dispositions relatives des jonctions cellulaires épithéliales le long de l'axe apico-basal sont différents entre les vertébrés et les invertébrés (H. A. J. Müller, 2018). Dans la plupart des épithéliums de drosophile, les **jonctions adhérentes (AJ)** sont localisées au-dessus des **jonctions septées (SJ)**, à l'inverse des mammifères pour lesquels leur équivalent (les **jonctions occlusives**) sont au-dessus des **AJ**. Il a été montré que l'arrangement des jonctions cellulaires dans l'épithélium de l'intestin moyen de drosophile est différent de ses autres épithéliums (Jia Chen et al., 2018b). En effet dans l'intestin moyen, les **SJ** se situent au-dessus des **AJ** (**Fig. 3**) (Jia Chen et al., 2018b). Ainsi, la cyto-architecture de l'épithélium de l'intestin moyen de la drosophile semble plus similaire à l'épithélium des vertébrés qu'à celui des autres épithéliums de la drosophile.

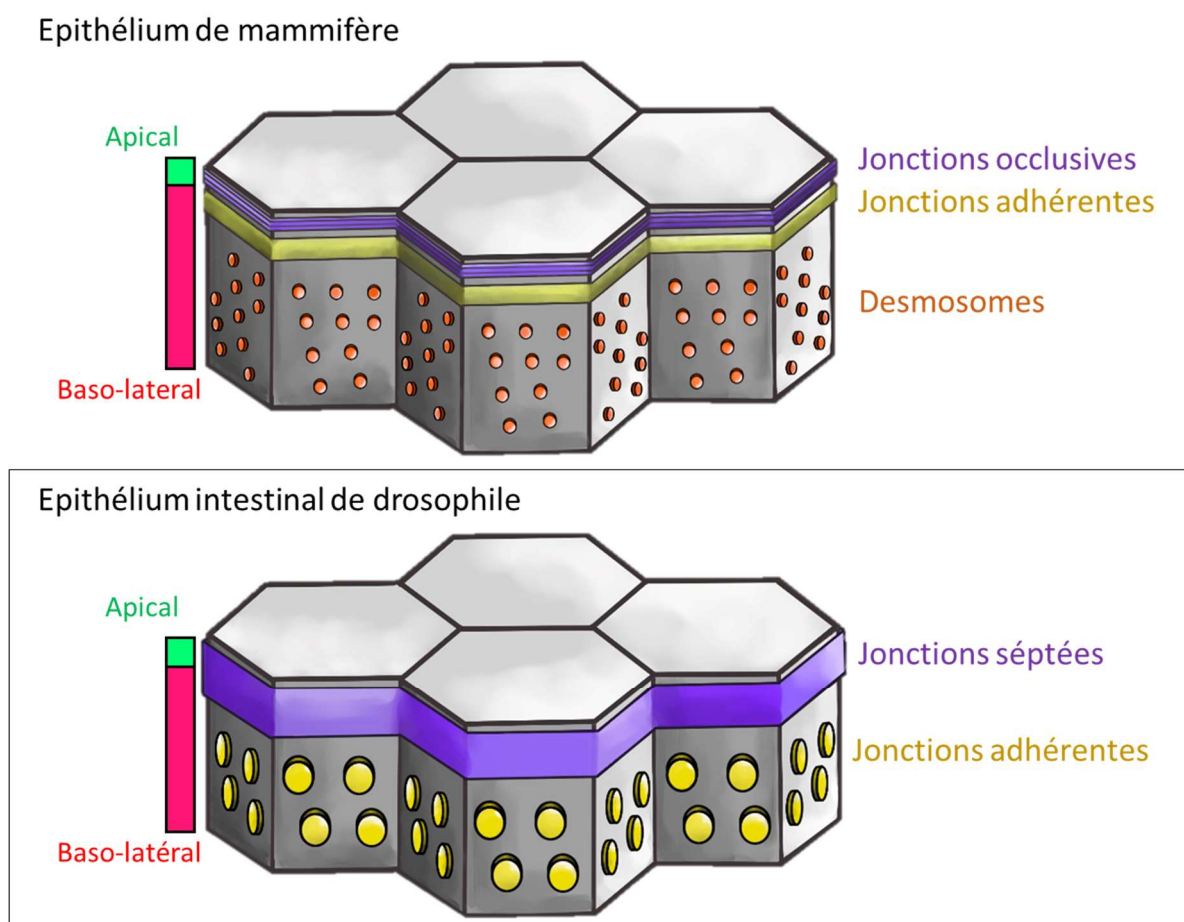


Figure 3: Organisation apico-basal de l'épithélium intestinal.

En haut jonctions des épithéliums de mammifère, en bas jonctions de l'épithélium d'intestin de drosophile.

I-2 Homéostasie et renouvellement du tissu intestinal

I-2-1 L'homéostasie, un équilibre en constante fluctuation

Le maintien d'un état d'équilibre au sein d'un tissu ou d'un organisme est défini par le terme d'homéostasie. Cette homéostasie est permise grâce à l'intégration de signaux par les cellules, pour leur permettre de répondre de façon adéquate et de stabiliser les différentes constantes du milieu intérieur. Des voies de signalisations moléculaires permettent aux cellules de communiquer et assurer ce processus de stabilisation. De façon physiologique, le renouvellement total de l'intestin s'effectue en 5 jours chez les mammifères et trois semaines chez la drosophile (Van Der Flier & Clevers, 2009).

L'épithélium intestinal est en contact permanent avec le milieu extérieur du lumen et doit faire face à de nombreuses agressions de natures diverses. Ces agressions peuvent être de type biotique tels que la présence de bactéries pathogènes, de virus ou autres micro-organismes allochtones, ou bien abiotiques tels que l'ingestion de molécules chimiques (pesticides, médicaments, polluants...). Pour combattre et réagir face à ces stress, des programmes spécifiques de régénération sont mis en place grâce à ces mêmes voies de signalisation.

L'épithélium intestinal étant composé d'une seule couche cellulaire, il est crucial pour lui de maintenir son intégrité. Empêcher la formation de trous dans le tissu permet de protéger l'individu d'agresseurs tels que les bactéries pathogènes. En effet, si un pathogène pénètre cette barrière, il peut provoquer une septicémie et mettre en danger la santé voire la vie de l'individu. Que ça soit pour renouveler les cellules âgées et endommagées afin de maintenir l'homéostasie ou régénérer l'épithélium en cas de stress, les ISC reçoivent des signaux de la part des autres cellules avoisinantes et de leur environnement afin d'adapter leur taux de prolifération aux besoins du tissu (Ayyaz et al., 2019a; Capo et al., 2019; Lucchetta & Ohlstein, 2012) (**Fig. 4**). Générer de nouvelles cellules différenciées permet de maintenir l'étanchéité de l'épithélium, et le bon fonctionnement physiologique du tissu. La régulation précise de ces signaux tant en force d'activation que dans le temps, est crucial pour une réponse adaptée des ISC et donc du tissu (Pasco et al., 2015; Takahashi & Shiraishi, 2020). Récemment, une plasticité cellulaire considérable a été notée dans l'intestin des mammifères. Chez la souris, des progéniteurs de lignée restreinte et des cellules entièrement différenciées ont su reconstituer le tissu dans certaines conditions (telles que des lésions induites par des dommages à l'ADN) mettant ainsi en évidence la mise en place de processus de dédifférenciation afin de régénérer les ISC perdues

(Ishibashi et al., 2018; Jadhav et al., 2017; Tetteh et al., 2016; H. Tian, Biehs, Warming, Leong, Rangell, Klein, & De Sauvage, 2011; Tomic et al., 2018; Van Es et al., 2012; Yan et al., 2017; Yousefi et al., 2018). Un autre mécanisme témoignant de la plasticité considérable de cet épithélium a été décrit récemment cette fois-ci chez la drosophile. Les EC seraient capables de recourir à un processus de division atypique, l'amarose, permettant un cycle de division sans formation de chromosomes, uniquement par constriction du cytoplasme et du noyau (Lucchetta & Ohlstein, 2017). Ces études montrent une incroyable plasticité de certaines cellules. Cependant il faut garder à l'esprit que très souvent cette plasticité est déclenchée dans des conditions très peu physiologiques ne reflétant pas les conditions réelles dans lesquelles le tissu peut-être amené à évoluer.

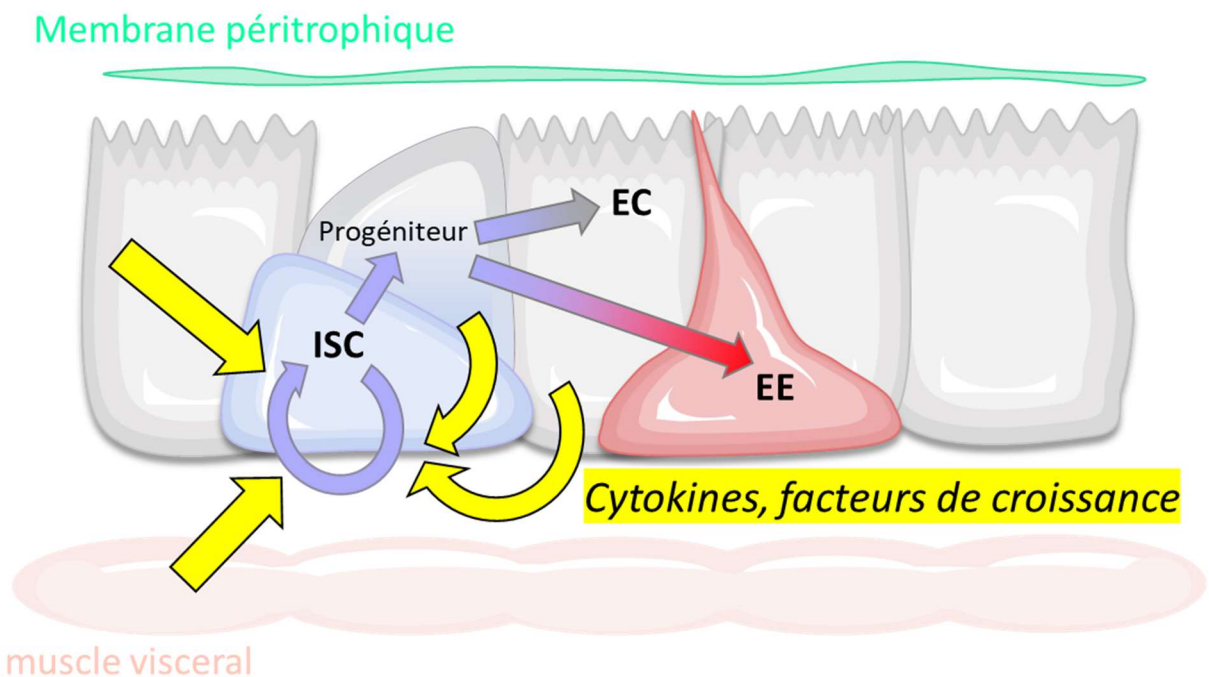


Figure 4: Maintien de l'homéostasie intestinale.

Les cellules souches intestinales reçoivent des signaux (cytokines, facteurs de croissance) de leur niche, environnement et cellules avoisinantes afin de s'adapter aux besoins du tissu pour maintenir l'homéostasie.

I-2-2 Les cellules souches, socle de l'intégrité tissulaire

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées permettant de générer des cellules spécialisées (différenciées) et de se maintenir en s'auto-renouvelant. Elles sont classifiées selon leur potentiel :

- Les cellules souches totipotentes ayant la capacité de donner tous les types cellulaires d'un organisme entier.
- Les cellules souches pluripotentes générant tous les types cellulaires à l'exception des annexes embryonnaires.
- Les cellules souches multipotentes générant différents types de cellulaires mais spécifiques d'un lignage donné.
- Les cellules souches unipotentes ayant la capacité de ne générer qu'un seul type de cellules.

De façon générale, les cellules souches résidant au sein d'un tissu sont reconnues comme cellules précieuses, relativement quiescentes (au stade G₀) afin de préserver l'intégrité de leur génome. Cependant, l'intestin est un tissu se renouvelant particulièrement rapidement et devant faire face à divers challenges, où cette notion s'avère désuète. Même si elles ont la capacité de retourner à l'état de quiescence, les ISC sont des cellules à longue durée de vie souvent sollicitées capable de se diviser rapidement (Simons & Clevers, 2011). Les ISC sont des cellules multipotentes répondant aux signaux qu'elles reçoivent de leur « niche » (environnement et cellules avoisinantes (**Fig. 4**), afin de générer de nouvelles cellules différenciées et de s'autorenouveler. Elles ont le choix de se diviser de façon symétrique (deux cellules filles identiques : soit deux progéniteurs de cellules différenciés soit deux nouvelles ISC), ou asymétrique (une de chaque) afin de s'adapter au mieux aux besoins. De façon général il a été décrit qu'en condition d'homéostasie, les ISC ont recours à 70-80% à une division asymétrique et 20-30% à une division symétrique (O'Brien et al., 2011). Cependant, dans des conditions particulières par exemple lors d'une phase de croissance du tissu au cours du développement, les ISC interprètent un signal nutritif de façon à stimuler la croissance lorsque la nourriture est abondante. Activées en partie par la production d'insuline par la niche, les ISC activent un programme de croissance à travers deux modes de comportement modifiés : l'accélération du taux de division et la prédominance du mode de division symétrique (Choi et al., 2011; O'Brien et al., 2011). De plus, il est intéressant de noter que les ISC localisées dans les régions R4 et R5 de l'intestin de la drosophile se divisent plus rapidement (environ 1 fois par jour) que dans le

reste des régions de l'intestin (Marianes & Spradling, 2013). Il convient de garder en mémoire que les ISC possèdent donc une capacité d'adaptabilité remarquable aux besoins du tissu en fonction des régions et des conditions (développement, régénération des cellules âgées ou lésées après agressions) en modulant leur **taux de prolifération** et leur **mode de division**. Ces deux processus sont donc des mécanismes phares de la régulation des ISC permettant de maintenir l'homéostasie et l'intégrité tissulaire.

I-2-3 Régulations du processus de différenciation des ISC

Pour les ISC, le contrôle du choix entre division symétrique ou asymétrique, ainsi que le type de progéniteurs à générer, est assuré par différents processus faisant intervenir des voies de signalisation et des facteurs d'adhésions tels que les intégrines. Ces mécanismes permettant de choisir entre les deux types de division, et le type de lignage à générer par les ISC ont fait l'objet d'une revue publiée en 2020 dans « International Journal of Molecular Science » (Joly & Rousset, 2020) fournie en **ANNEXE I** et que je résume brièvement dans cette partie.

1- Division asymétrique *versus* symétrique à l'homéostasie

Chez la drosophile, environ 80% des ISC se divisent de façon asymétrique (ISC-EB) et 20% de façon symétrique ISC-ISC ou EB-EB. La voie de signalisation Notch est conservée au cours de l'évolution et contrôle le maintien des cellules souches (Koch et al., 2013). Une cellule exprime un des ligands transmembranaire Delta (Dl) ou Serrate (Ser) active le récepteur Notch à la surface de la cellule voisine, permettant son internalisation et la transcription de gènes cibles comme *Su(H)*. Dans les ISC en division, le choix de s'autorenouveler ou de générer un EB est dicté par l'activation de la voie Notch par Dl dont un niveau élevé d'activation dirige vers un destin cellulaire en faveur de la différenciation (Ohlstein & Spradling, 2007; Perdigoto et al., 2011; Sallé et al., 2017). De façon intéressante, la signalisation Notch agit de manière bidirectionnelle et est importante non seulement pour la différenciation des EB, mais également pour la lignée entéroendocrine (Z. Guo & Ohlstein, 2015). En générant un EB, les ISC (« high Dl ») restent attachés à la membrane basale, alors que les EB (« high Notch signaling ») sont localisés de façon plus apicale (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007). A contrario, les cellules filles EEp sont localisées à la base et expriment de faibles niveaux de Dl, induisant une faible signalisation Notch dans l'ISC (Z. Guo & Ohlstein, 2015).

Le voie BMP (« Bone Morphogenetic Pathway ») est un autre régulateur du choix de type de division chez les ISC (Aiguo Tian & Jiang, 2014). Chez la drosophile, il existe deux homologues du ligand BMP : Decapentaplegic (Dpp) et Glass bottom boat (Gbb). Bien que différents niveaux d'inhibition de la signalisation Dpp/BMP déclenchent divers phénotypes, la perte complète modifie le résultat des divisions ISC, de EB-ISC (principalement asymétrique) à EB-EB (symétrique). A l'inverse, une suractivation de la voie favorise la duplication ISC-ISC. Ainsi, Dpp/BMP favorise l'identité ISC, et il a été démontré que cette action est réalisée en régulant à la baisse l'activité Notch (Zheng Guo et al., 2013).

De la drosophile aux mammifères, le choix entre division symétrique ou asymétrique des ISC est déterminé par l'orientation du fuseau mitotique (Morrison & Kimble, 2006; Venkei & Yamashita, 2018). Les polarités cellulaires apico-basales et planaires sont des processus actifs qui alignent le fuseau le long d'un axe particulier pour influencer le mode de division dans de nombreux types de cellules et organismes différents (Lu & Johnston, 2013). Chez la drosophile, la localisation asymétrique du complexe Par (composé de Bazooka, Par-6, « atypical Protein Kinase C » (aPKC)) dans les ISC corrèle avec le choix de division symétrique ISC-EB (Goulas et al., 2012; Z. Guo & Ohlstein, 2015), et influence également la localisation de Prospero dans la cellule fille basale lors de la différenciation ISC-EEp (Z. Guo & Ohlstein, 2015; Sallé et al., 2017). Ainsi, la localisation apicale du complexe Par lors de la division oriente le fuseau mitotique en position oblique afin de déclencher la division asymétrique.

2- Modes de division au cours de la croissance adaptative de l'intestin

La croissance adaptative de l'intestin dépend de la disponibilité en nutriments. L'alimentation et la privation de nutriments ont un impact sur le ratio des divisions symétriques et asymétriques. Chez la drosophile, la croissance induite par l'alimentation est causée par une forte augmentation du taux de division des ISC, à la fois asymétriques et symétriques, mais aussi en favorisant un mode de division symétrique. Ainsi, le rapport 80/20 (80% pour la division asymétrique et 20% pour la division symétrique) lors de l'homéostasie s'inverse lors de la croissance (30/70) (O'Brien et al., 2011). Ce phénomène est dirigé par l'activation de la voie « insulín/insulín-like signaling » (IIS) dont les ligands sont transportés par la circulation systémique et dépendent de l'alimentation.

Récemment, une analyse détaillée a révélé que le passage entre division symétrique et asymétrique des ISC nécessite un changement dans l'alignement du fuseau mitotique (Hu & Jasper, 2019). Cette étude a montré que la division symétrique est pilotée par un fuseau planaire

($\leq 15^\circ$), dont l'orientation est contrôlée par la signalisation « c-Jun-N-terminal kinase » (JNK) agissant à deux niveaux : le recrutement de la protéine Wdr62 associée au centrosome et la répression transcriptionnelle de la kinésine Kif1A.

3- Stress et vieillissement impactent la division des ISC

Plusieurs études indiquent que la réponse au stress ne déclenche pas systématiquement « l'interrupteur » de division majoritairement asymétriques en faveur de divisions symétriques. Certaines études sont en contradictions sur ce sujet, notamment dans le cas d'un stress bactérien induit par *Erwinia carotovora carotovora 15* (Hu & Jasper, 2019; Zhai et al., 2017). Cependant, la bléomycine (dommages à l'ADN) ou une infection par une autre bactérie gram-négative, *Pseudomonas entomophila*, entraîne l'expansion du pool d'ISC en favorisant leur division symétrique. En revanche, ce n'est pas le cas du « sodium dextran sulfate », qui n'augmente que le taux de prolifération des ISC (Aiguo Tian et al., 2017). Une augmentation du taux de divisions symétriques contribue au vieillissement de l'intestin. Le vieillissement s'accompagne d'une perte d'acidité du lumen et d'une immuno-sénescence épithéliale, conduisant à une dysbiose (le vieillissement est abordé en I-3-2). Une élévation du taux des espèces réactives à l'oxygène, ainsi que la disparition progressive des jonctions cellulaires et des intégrines, déclenchent l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont JNK. La voie JNK participe à l'hyper-prolifération de l'ISC et favorise le mode de division symétrique en orientant le fuseau mitotique parallèlement à la membrane basale.

4- En conclusion

Chez la drosophile, le mode de division des ISC est un élément clé dans l'adaptation des ISC aux besoins de l'intestin. Le processus conduisant à la division asymétrique est médié par des intégrines et des complexes de polarité, qui favorisent une orientation oblique du fuseau mitotique par rapport à la membrane basale. Les voies de signalisation D1/Notch et Dpp/BMP spécifient un destin cellulaire dans chacune des cellules filles. En réponse aux signaux environnementaux, les ISC augmentent leur taux de divisions symétriques. Ceci est conduit par les voies IIS et JNK pendant la croissance induite par les nutriments de l'intestin, et les voies JNK et Dpp/BMP après des dommages induits par des bactéries ou des produits chimiques. Au cours du vieillissement, JNK contribue à la dysplasie en forçant les ISC à procéder à un mode de division symétrique. Toutes ces données indiquent que la signalisation JNK est un déterminant moléculaire central de l'adaptation de l'intestin de drosophile par son effet direct sur l'orientation du fuseau.

I-2-4 Régulations de la prolifération des ISC

Dans la partie précédente, j'ai décrit comment des voies de signalisations moléculaires contrôlent le choix entre division symétrique et asymétrique chez les ISC et la spécification du lignage. Comme dit en amont, les ISC s'adaptent aux besoins du tissu en ajustant ce type de division, mais également en modulant leur taux de prolifération. Dans cette partie, je décris l'ensemble des voies impliquées dans le contrôle de la prolifération des ISC dans le cadre de l'homéostasie et de la régénération de l'épithélium intestinal. Il faut cependant garder en mémoire que certaines voies et processus sont à la fois impliqués d'une part dans le choix du mode de division et la spécification du lignage, et d'autres part dans le contrôle de la prolifération. Pour permettre une meilleure appréhension de l'ensemble de la régulation de ces processus, j'ai préféré traiter ces deux aspects en deux parties distinctes.

Il existe plusieurs sources de ligands au sein de la niche permettant l'activation de voies de signalisation variées, favorisant à la fois le renouvellement naturel et la régénération de l'épithélium par les ISC (**Fig. 5**). Les relations et les ponts entre les différentes voies sont nombreux et les interactions existantes entre plusieurs de leurs gènes restent mal connus, rendant compliqué une hiérarchisation entre les voies. Cependant, elles peuvent tout de même être regroupées afin de mieux appréhender la régulation du processus de prolifération des ISC :

- Les voies **EGFR, IIS, Wnt/Wg** et moins fortement **JAK/STAT** peuvent être considérées comme des voies majoritairement impliquées dans le maintien de l'homéostasie en conditions physiologiques.
- Les voies **JNK, Hpo/Yki** et **JAK/STAT** peuvent être regroupées dans une catégorie relative aux stress nécessitant une régénération du tissu. A la suite d'un stress, JNK et Hpo/Yki sont respectivement sollicitées/inactivées, afin de produire les ligands nécessaires à l'activation des voies prolifératives « de base » EGFR et plus fortement JAK/STAT dans les ISC.
- Enfin, les voies **Hpo/Yki** et **BMP/TGFβ** représentent des régulateurs négatifs de la prolifération des ISC, permettant de réguler finement la prolifération des ISC en contrôlant la force d'activation du processus.

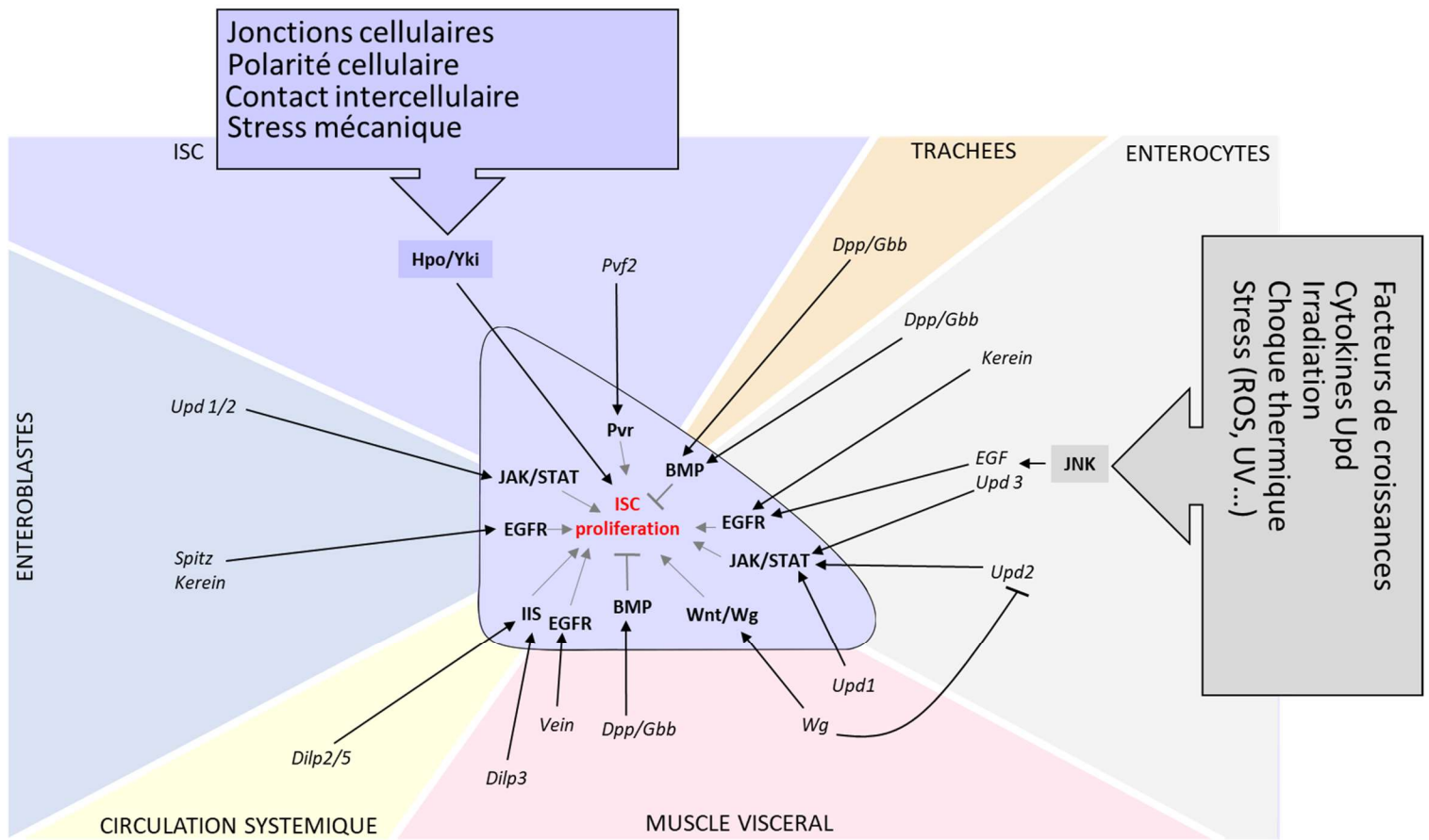


Figure 5: Principaux signaux du contrôle de la prolifération des ISC.

Sont représentés les ligands activant une signalisation chez les ISC dans un but prolifératif ainsi que leur source.

Voie EGFR : « Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR) est l'une des voies majoritaires de la stimulation de la prolifération des ISC. Trois ligands Vein, Spitz et Keren sont sécrétés par les cellules avoisinantes (cellules du muscle viscéral (VM), EB et EC) afin d'activer la voie via leur récepteur à la surface des ISC (Benoît Biteau & Jasper, 2011; Buchon et al., 2010; N. Xu et al., 2011). D'autres facteurs de croissances tels que PVF2 est également impliqué dans le contrôle de la prolifération des ISC *via* le récepteur Pvr (PDGF- and « VEGF-receptor related ») (Bond & Foley, 2012; Choi et al., 2008; Pasco et al., 2015) (**Fig. 5**).

Voie IIS : Cette voie régule des processus très vastes tels que le vieillissement, la reproduction, l'alimentation, le métabolisme, la résistance au stress et la croissance. Le ligand dILP3 (« *Drosophila* insulin-like peptide 3 »), provenant localement du VM, ainsi que les dILP2/5 systémiques, activent la signalisation IIS dans l'ISC en se liant au récepteur InR (« Insulin receptor »), ce qui induit leurs divisions (O'Brien et al., 2011). L'IIS permet également aux ISC d'adapter leur mode de division afin de favoriser un mode symétrique favorable à la croissance du tissu, comme vu dans la partie précédente (Joly & Rousset, 2020; O'Brien et al., 2011).

Voie Wnt/Wg : La voie Wnt/Wg est activée dans de nombreux processus au cours du développement et est impliquée dans la prolifération des ISC. Il existe plusieurs voies non canoniques. La voie canonique étant la mieux caractérisée et majoritairement utilisée dans la biologie des ISC sera donc la seule abordée ici. La β -caténine (β -cat) est le médiateur clé de la voie. La β -cat inactive est localisée à la fois dans les jonctions adhérentes et dans le cytoplasme, puisqu'elles possèdent deux rôles : un dans la fonction d'adhésion entre les cellules et un second comme médiateur de la voie Wnt lorsqu'elle est activée. La voie s'active lorsque le ligand Wg (Wnt chez les mammifères), une glycoprotéine agissant comme molécule de signalisation, est sécrétée par le VM et se lie à un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) de la famille « Frizzled » (Fz) et un corécepteur LRP (« LDL-Related Protein ») à la surface des ISC. Cette liaison va permettre le recrutement de la protéine Dishevelled (Dsh). La voie canonique implique que Dsh à son tour recrute la protéine GSK3 (« Glycogen synthase kinase ») qui forme un complexe avec les protéines APC (« Adenomatosis Polyposis Coli ») et Axin. Ce complexe a pour rôle de séquestrer la β -caténine cytoplasmique lorsque la voie est inactive, afin de l'ubiquitiner et l'envoyer à dégrader par le protéasome. Le recrutement de GSK3 par Dsh lors de l'activation de la voie permet de libérer la β -cat et ainsi cesser sa dégradation. L'activation

de la voie aboutit ainsi à la translocation de la β -cat cytoplasmique dans le noyau afin d'agir comme coactivateur de facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef (« T-cell factor/lymphoid enhancer factor ») et activer la transcription de gènes tel que *myc* dans les ISC (Barker, 2008; Cordero & Sansom, 2012; MacDonald et al., 2009). Cependant, une étude récente a mis en lumière qu'une activation de la voie Wnt dans les EC empêche la surprolifération des ISC voisines de façon non autonome, en empêchant l'activation de la voie JAK/STAT chez les ISC et permettant une régulation de la prolifération des ISC (Ai Tian et al., 2016).

Voie JAK/STAT : La voie JAK/STAT est peu sollicitée en condition physiologique. Elle est principalement activée dans les ISC en réponse à divers défis tels que l'infection, l'apoptose et le stress pour favoriser la prolifération rapide des ISC (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009a; H. Jiang et al., 2009). Il existe trois cytokines activant la voie JAK/STAT, nommées Unpaired (Upd, Upd2 et Upd3). Upd (sécrétés par le VM et les EB) et Upd2 et 3 (sécrétés par les EC) se lient à leur récepteur Domeless (Dome), un récepteur de cytokine à la surface des ISC (Agaisse et al., 2003; Harrison et al., 1998). Cela lui permet de dimériser afin de phosphoryler des facteurs de transcription STAT. Ces facteurs STAT phosphorylés transloquent ensuite dans le noyau (Darnell, 1997; Herrera & Bach, 2019) et contrôlent l'expression des gènes cibles de la voie, notamment impliqués dans la prolifération des ISC.

Voie JNK : La voie JNK (« c-Jun N-terminal Kinase ») est activée en condition de stress en réponse à des stimuli comme la présence de ROS (« Reactive oxygen species »), UV, irradiation, chocs thermiques etc.... Son activation découle également de l'activation d'autres voies en amont (voies de l'immunité par exemple). La voie JNK possède plusieurs ligands identifiés à ce jour, comme Eiger Grindelwald et Wengen (Andersen et al., 2015; Igaki et al., 2002; Kanda et al., 2002; Moreno et al., 2002). Elle est composée d'une cascade de 4 kinases appartenant à la famille des MAPK (« Mitogen-activated protein kinase »), dont Basket (Bsk) est la protéine kinase finale. Une fois phosphorylée, Bsk permet la phosphorylation de facteurs de transcription (tels que « Jun-related antigen » (Jra) et Kayak (Kay)) (Tafesh-Edwards & Eleftherianos, 2020). L'activation de la voie dans l'intestin est nécessaire à la transcription de gènes permettant de répondre aux stress et de réparer des dommages induits aux cellules. Elle déclenche ainsi la production de cytokines Upd/Upd3 par les EC et d'EGF par le VM permettant ensuite d'activer la prolifération des ISC *via* les voies JAK/STAT et EGFR (Andriatsilavo et

al., 2013; Benoît Biteau et al., 2008; Benoît Biteau & Jasper, 2011; H. Jiang et al., 2009) (**Fig. 5**). La voie JNK est une voie très étudiée et particulièrement complexe. En fonction du contexte, cette voie peut jouer un rôle pro-tumorigène ou anti-tumorigène (La Marca & Richardson, 2020). En tant que suppresseur de tumeur, la voie est généralement activée par le facteur de nécrose tumorale (TNF) favorisant la mort des cellules tumorales via l'activation de caspases, mais parfois également par des altérations du cytosquelette d'actine, ou des dommages infligés par les ROS. En tant qu'acteur pro-tumoral, la signalisation est induite chez des cellules activant la signalisation Ras-MAPK, et utilisée pour induire des modifications morphologiques cellulaires, des comportements invasifs, ainsi que de bloquer la différenciation et permettre une prolifération cellulaire persistante. Ces différents aspects opposés de la voie ont fait l'objet d'une revue bien expliquée (La Marca & Richardson, 2020).

Voie Hippo (Hpo)/Yorki (Yki) : La voie Hpo et ses effecteurs, YAP (« Yes-associated protein ») chez les mammifères et Yki chez la drosophile ont été décrits plus récemment et constitue un mécanisme atypique. La voie ne possède pas de récepteur et de ligand extracellulaire peptidique classique connus comme mode de transduction, mais repose sur un réseau de composants et de mécanismes en amont, tels que les contraintes mécaniques, le contact entre les cellules, les complexes de polarité cellulaire et les jonctions cellulaires (Yang et al., 2015). De ce fait, il a été proposé qu'elle constitue une sorte de « senseur » de l'architecture cellulaires et des tensions mécaniques de l'environnement, et ainsi contrôler la prolifération de cellules en fonctions de ces facteurs (Bardet, 2009; Dupont et al., 2011; Piccolo et al., 2014; Schroeder & Halder, 2012; B. Zhao et al., 2007). La voie Hpo/Yki est un régulateur négatif de la prolifération des ISC. Lorsque la voie est inactive, Yki transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles parmi lesquels des gènes impliqués dans l'activation de la prolifération des ISC (*myc*, *cycE*, *bantam*) et de la survie cellulaire (*diap1*) (Dong et al., 2007). L'activation de la voie implique l'activation de la kinase Hpo et permet une cascade de phosphorylation permettant de bloquer l'activité de Yki. Yki ainsi phosphorylé est maintenu dans le cytoplasme et ne peut plus participer à l'activation de la prolifération des ISC. Il a également été décrit que dans ces conditions, Yki est capable d'interagir avec la β -cat et bloque la signalisation Wnt canonique (Imajo et al., 2012; Ward et al., 2020). L'activation de la voie Hpo permet ainsi de limiter l'activation de gènes prolifératif par Yki (tout en inhibant la voie Wnt canonique), afin de jouer un rôle « tampon » pour que le système prolifératif ne s'emballe pas. Plusieurs études ont décrit l'importance de YAP/Yki dans la prolifération des

ISC et la régénération de l'intestin après diverses agressions (Karpowicz et al., 2010; Loudhaief et al., 2017; Ren et al., 2010; Saladi et al., 2019; Shaw et al., 2010).

Voie BMP/TGF β : La voie BMP constitue le régulateur négatif de la prolifération des ISC principal. Il existe plusieurs sources de Dpp et Gbb dont l'importance de chacune dans la restriction de la prolifération des ISC est débattue. Ces ligands sont produits à la fois par les cellules de la trachée, du VM et par les EC et permettent de restreindre la prolifération des ISC (Ayyaz et al., 2015; Zheng Guo et al., 2013; Zhouhua Li et al., 2013; Aiguo Tian & Jiang, 2014). Dpp et Gbb se fixent à la surface des ISC sur leur récepteur à deux composantes, comprenant une des deux sérine/thréonine kinase Thickveins (Tkv) ou Saxophone (Sax), et de la protéine Punt (Put). Cette liaison entraîne la phosphorylation de facteurs de transcription Mad (SMADs chez les mammifères) qui permettent ensuite une régulation transcriptionnelle restreignant la prolifération des ISC (**Fig. 5**). Il a été montré qu'après réparation du tissu, la production des ligands BMP dans les EC est inhibée par la signalisation BMP elle-même (Aiguo Tian et al., 2017). Les auteurs ont également montré que l'auto-inhibition de la voie était nécessaire pour réinitialiser la taille de la population d'ISC et retourner à un niveau homéostatique. Plus récemment, (Tracy Cai et al., 2019) ont décrit dans les ISC un mécanisme apportant des précisions sur le fonctionnement de la voie alors induite après un épisode de régénération du tissu. Ils ont montré qu'en condition physiologique, la protéine Tkv est ubiquitinée par l'E3 ubiquitine ligase Highwire et envoyée à dégrader pour maintenir une faible expression de la protéine. Après activation de la prolifération des ISC à la suite d'un stress, la protéine Tkv est stabilisée et subit une endocytose nécessaire à l'activation de Mad pour réprimer la prolifération des ISC, permettant un retour à la quiescence après un épisode de régénération (Tracy Cai et al., 2019).

I-3 Dérégulations et dysfonctionnements

Les processus de signalisation moléculaire vus dans la partie précédente sont étroitement liés et impactés par d'autres variables comme le microbiote, le métabolisme, le système immunitaire et des composantes génétiques. Au cours de la vie, les nombreuses interactions entre ces mécanismes et les changements qui peuvent survenir fournissent plusieurs sources majeures de dérégulations potentielles (**Fig. 6**). Au même titre qu'un grain de sable dans un système d'engrenages, des dérégulations au sein de ces processus entraînent des dysfonctions qui peuvent provoquer le développement de maladies, voire de cancers. Dans cette partie, je développe d'une part les pathologies dont l'intestin peut être atteint, d'autre part l'implication du microbiote, de l'immunité et de la régulation génique dans l'homéostasie. Je décris comment le microbiote, l'immunité et, au niveau moléculaire, l'intégrité du génome et l'épigénétique peuvent participer au développement de ces pathologies intestinales. Enfin, j'aborderai le phénomène du vieillissement, qui fait intervenir l'ensemble de ces processus et qui favorise l'apparition de pathologies inflammatoires et de cancers au cours du temps.

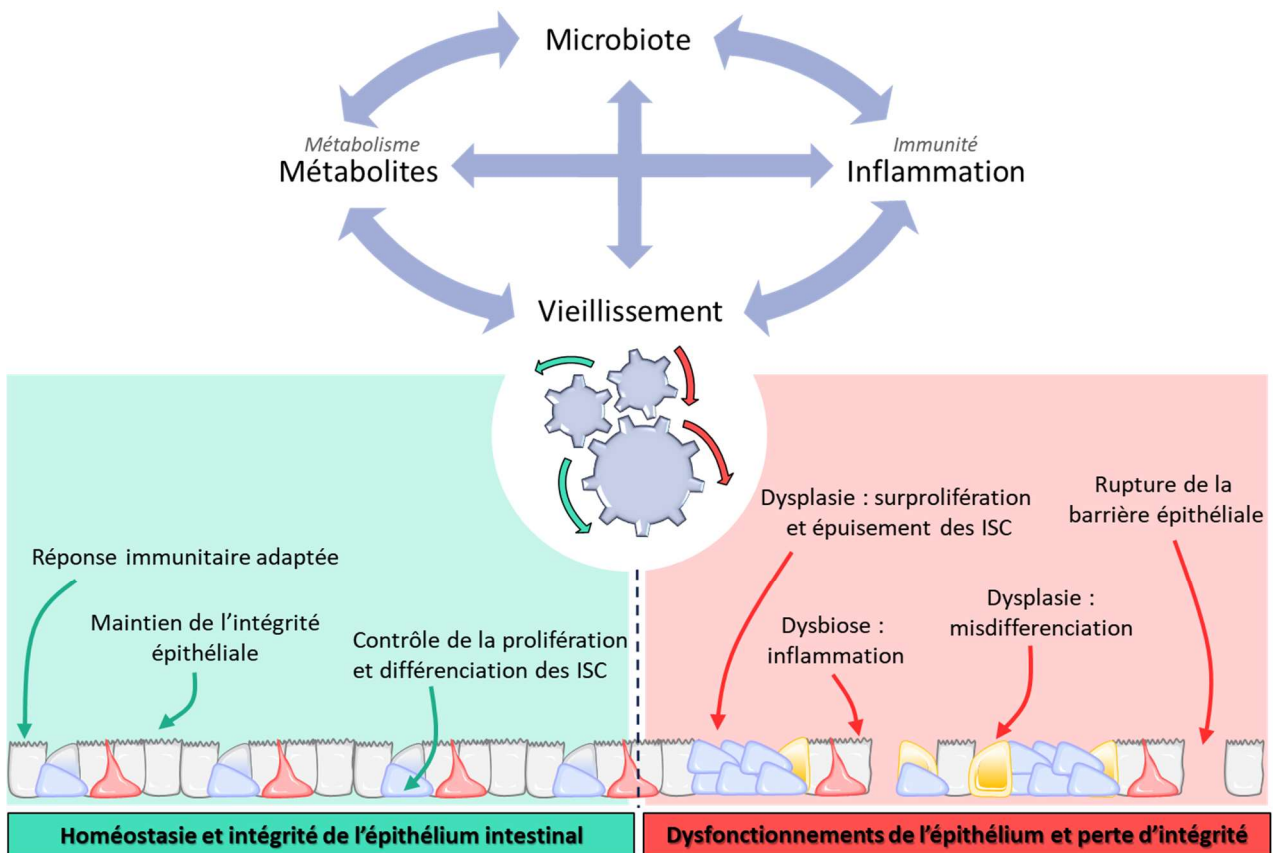


Figure 6: Variables impactant l'homéostasie intestinale

Le microbiote, l'immunité, le métabolisme et le vieillissement ont des rôles importants dans l'homéostasie intestinale. Des dérégulations peuvent engendrer des dysfonctionnements.

I-3-1 Les pathologies de l'intestin

Comme chaque organe, le système digestif peut être sujet à des pathologies résultant de dysfonctionnements, telles que des dysplasies, des maladies inflammatoires chroniques et des cancers. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Elles sont caractérisées par une inflammation incontrôlée et chronique du tube digestif. Une dérégulation du système immunitaire de l'intestin est à l'origine de cette inflammation excessive. Plus de 170 gènes sont impliqués dans la prédisposition à ces maladies. Cependant, malgré l'implication potentielle de facteurs génétiques, les facteurs environnementaux liés au mode de vie seraient ceux ayant le plus de poids dans le développement de ces maladies (alimentation, pollution etc...). Il est intéressant de relever que l'incidence de ces pathologies augmente avec le niveau d'industrialisation et de développement d'un pays. Souvent diagnostiquées chez les jeunes adultes (20-30 ans), elles peuvent cependant être déclarées à tout âge, même durant l'enfance. A ce jour, il n'existe à aucun traitement curatif. D'après la FRM et l'INSERM, ces pathologies concerneraient 200 000 personnes en France.

Le système digestif est également sujet au développement de cancers. Les cancers du système digestif se caractérisent par le développement de tumeurs malignes dans l'ensemble du tube digestif (œsophage, estomac, intestin, rectum, anus) et aux glandes associées (foie et pancréas). Cependant, les cancers les plus fréquents sont les cancers colorectaux et du pancréas. Avec près de 44 000 nouveaux cas par an en France, les cancers colorectaux représentent le 3^e cancer le plus fréquent chez les hommes (après la prostate et les poumons) et le 2nd chez la femme (après celui du sein) (Institut National contre le Cancer, 2017). Les cancers sont des pathologies multifactorielles. Des facteurs génétiques comme des mutations, des antécédents de MICI chez un individu ou dans sa famille, et des facteurs liés au mode de vie et à l'environnement qui affectent le microbiote et l'immunité sont autant de sources potentielles au développement de cancers intestinaux. Parmi les facteurs liés au mode de vie se trouvent notamment l'alimentation riche en sels/charcuteries/viandes, le tabac, la consommation d'alcool, le poids et l'inactivité physique comme facteurs aggravants. Il est intéressant de savoir que, de manière générale, 40% de la totalité des cancers sont imputables au mode de vie d'un individu. Il est très intéressant de noter également que les MICI sont des facteurs à risque accru de développement de cancers colorectaux (CCR), renforçant le lien pro-tumoral déjà bien établie entre un contexte inflammatoire et le développement de cancers (Grivennikov et al.,

2010). Environ 20% des personnes atteintes de MICI finissent par développer un cancer colorectal dans les 30 ans (Lakatos & Lakatos, 2008). Les mécanismes permettant l'apparition d'un cancer colorectal dans un contexte de MICI déjà établi impliquerait la présence d'une inflammation chronique qui promeut les mécanismes de cancérogénèse. En effet, de plus en plus de preuves soutiennent l'importance des cytokines pro-inflammatoires dans la progression des CCR (Dubois, 2014; Y. Li et al., 2012; Qi et al., 2015; Waldner & Neurath, 2008). L'interleukine-6 (IL-6, équivalent des cytokines Upd chez la drosophile) est une cytokine pro-inflammatoire clé dans le développement de CCR (Waldner et al., 2012). Une étude a montré que l'IL-6 était surexprimée dans des CCR développés dans un contexte de MICI (Y. Li et al., 2010). Cependant, malgré les preuves impliquant l'importance de l'IL-6 dans la progression des CCR, les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette association restent mal caractérisés et incompris.

I-3-2 Des variables aux rôles cruciaux...

1-3-2-1 Le microbiote intestinal

Le terme microbiote désigne une communauté de micro-organismes (bactéries, archaea, virus, mycètes et protozoaires) ayant établie une relation symbiotique chez un hôte lui apportant un avantage immunitaire et métabolique (Kamada & Núñez, 2014; Round & Mazmanian, 2009; Thursby & Juge, 2017). Récemment, le nombre de micro-organismes hébergés par un individu adulte moyen (20-30 ans, 170cm, 70kg) a été estimé à environ 10^{13} micro-organismes, soit autant que de cellules humaines (Sender et al., 2016). Le microbiote intestinal représente une part majoritaire de l'ensemble du microbiote porté par le corps humain. 90 % du microbiote intestinal est représenté par des bactéries (Gomaa, 2020). Le nombre d'espèces bactériennes hébergées par l'Humain est supérieur à 1000 (majoritairement des groupes Firmicutes et Bactéroïdètes, plus minoritairement des groupes Proteobacter et Actinobacter) (Gomaa, 2020). La composition du microbiote reste relativement stable chez chacun au cours de la vie d'adulte, mais varie considérablement entre chaque individu (Kamada & Núñez, 2014; Rodríguez et al., 2015). Le nombre de gènes porté par le microbiote (métagénome) est 150 fois plus élevé que celui du génome humain. Parmi ces gènes, le microbiote dispose d'une réelle artillerie enzymatique afin de fournir à son hôte une activité métabolique considérable prenant ainsi part entière à la physiologie de l'intestin (fermentation de sucres, protéines, fibres, métabolisme des

acides biliaires, xénobiotiques, synthèse de vitamines...) (Boulangé et al., 2016; D. Kim et al., 2017; Landman & Quévrain, 2016; LeBlanc et al., 2013). Le microbiote intestinal joue également un rôle central dans le développement et le bon fonctionnement du système immunitaire inné (D. Kim et al., 2017). Enfin, par compétition il empêche la colonisation du système digestif par des bactéries pathogènes (Kamada, Chen, et al., 2013; D. Kim et al., 2017). Étant donné les fonctions primordiales exercées par le microbiote intestinal, sa composition et sa diversité sont cruciales pour l'homéostasie de l'intestin. L'utilisation d'antibiotiques, des infections, une grossesse, le vieillissement, des changements de mode de vie sur le long terme peuvent altérer la composition et la diversité du microbiote (Dethlefsen et al., 2008; Koren et al., 2012; Rodríguez et al., 2015). Ce déséquilibre du microbiote nommé « dysbiose » a un impact négatif sur le système immunitaire et constitue une source d'inflammation chronique souvent impliquée dans le développement de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) et de cancers (Buttó & Haller, 2016; Xiaoyan Fan et al., 2021; Kamada, Seo, et al., 2013; Schwabe & Jobin, 2013; Sobhani et al., 2011; Tilg et al., 2018; M. Y. Zeng et al., 2017).

La composition et la diversité du microbiote intestinal changent selon les espèces. La phylogénie, ainsi que le régime alimentaire d'un hôte, semblent déterminer la composition de celui-ci (Groussin & Mazel, 2017). Chez la drosophile, le microbiote intestinal est composé d'une vingtaine d'espèces de micro-organismes (majoritairement du genre *Lactobacillus* et *Acétobacter*) (Broderick & Lemaitre, 2012; Douglas, 2015, 2019; C. N. A. Wong et al., 2011). La drosophile présente donc un microbiote plus simple par rapport aux mammifères, et plus facilement manipulable permettant de mieux comprendre son impact sur la physiologie de son hôte (Douglas, 2019). La drosophile a ainsi servi de modèle dans de nombreuses études permettant d'identifier des effets du microbiote sur l'immunité innée, l'homéostasie intestinale, le métabolisme, la nutrition, la reproduction... (Broderick et al., 2014; Buchon et al., 2010; Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009; Clark et al., 2015; Fast et al., 2018; Iatsenko et al., 2018; J. H. Lee et al., 2020; Leitão-Gonçalves et al., 2017; Lesperance & Broderick, 2020; Xi Liu et al., 2017; Ryu et al., 2008; Sharon et al., 2010; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). Toutes ces études démontrent l'importance cruciale du bon équilibre du microbiote intestinal, notamment dans l'immunité et l'homéostasie intestinal (**Fig. 7**).

1-3-2-2- Immunité et inflammation

Le système immunitaire permet de lutter contre les pathogènes en provoquant une réponse immunitaire et inflammatoire bénéfique pour permettre un retour à l'homéostasie. Elle doit être finement régulée afin d'éliminer les bactéries pathogènes tout en restant permissive aux bactéries autochtones bénéfiques du microbiote. La réponse immunitaire innée est un mécanisme de défense mis en place par les insectes très efficace et conservé chez les mammifères (Lemaitre, 1999; Thaiss et al., 2016). Chez la drosophile, la membrane péritrophique et la couche de cellules épithéliales fournissent une barrière physique, tandis que des enzymes et un pH acide de la région des « *copper cells* » permet de limiter la survie des micro-organismes (Kuraishi et al., 2011). Le système immunitaire innée de l'intestin de drosophile se compose de deux mécanismes moléculaires (Bonfini et al., 2016). Dans le midgut, les deux principaux effecteurs antimicrobiens de la réponse immunitaire innée sont les ROS et les AMPs (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009b; Ryu et al., 2006). Produits par les enzymes Duox et Nox (NADPH oxydases), les ROS possèdent un effet antimicrobien et induisent la production de cytokines permettant la régénération du tissu via les voies JAK/STAT et JNK. Les AMPs sont produits par l'activation de la voie Imd (« Immune deficiency pathway »), équivalente de la voie NF- κ B conservée chez les mammifères (Bonfini et al., 2016; Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009; Hetru & Hoffmann, 2009; T. Liu et al., 2017). La voie NF- κ B est un médiateur essentiel des réponses inflammatoires, induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires comme des cytokines. Par conséquent, l'activation dérégulée de la signalisation NF- κ B contribue à un contexte pathologique d'inflammation favorisant diverses maladies inflammatoires (T. Liu et al., 2017; Rathinam & Chan, 2018).

Le microbiote et la réponse immunitaire sont en étroite collaboration. Le microbiote stimule le niveau basal d'activation de la voie NF- κ B, produisant ainsi des AMPs permettant de limiter la croissance bactérienne. Cette boucle de rétro-contrôle permet de moduler et contrôler la population bactérienne hébergée (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009b; Lhocine et al., 2008; Morris et al., 2016; Salzman et al., 2010). Par ces liens étroits, il est reconnu qu'une dysbiose met en place un niveau d'inflammation plus fort favorisant le développement de pathologies (Arthur & Jobin, 2011; Gagnière et al., 2016; Weiss & Hennet, 2017). La présence répétée ou persistante d'un pathogène est également reconnue comme déclencheur d'une réponse inflammatoire chronique favorisant le développement de maladies. L'exemple le plus illustré dans la littérature concerne la bactérie *Helicobacter Pylori* dans le cadre de cancers digestifs (Sobhani, 2004).

1-3-2-3 Instabilité génomique, mutations et altérations épigénétiques.

L'intégrité du génome est cruciale pour une expression et une régulation adéquate de bons nombres de signaux. Des dommages à l'ADN, des mutations somatiques et des altérations épigénétiques peuvent modifier l'expression génique et ainsi modifier l'équilibre lors des interactions entre cellules nécessaire à l'homéostasie (**Fig. 7**). Ces altérations peuvent être une source de dysfonctionnement menant au développement de pathologies et de cancers.

Instabilité génomique

Chez les cellules eucaryotes, le maintien de la stabilité génomique lors de la réplication cellulaire repose sur l'action coordonnée de la réplication et la réparation de l'ADN avec la progression du cycle cellulaire. La réplication cellulaire implique que des contraintes mécaniques soient exercées sur l'ADN, pouvant l'endommager en provoquant des cassures double brins (DSB « double-strand break »). Activées par les dommages causés à l'ADN, les kinases ATM et ATR permettent de déclencher des processus de réparations (Maréchal & Zou, 2013). L'instabilité chromosomique est causée principalement par des défaillances des processus mitotiques et de réparation. Dans l'intestin de la drosophile, il a été montré qu'une augmentation du nombre de mutations spontanées apparaissait au cours de l'âge (Garcia et al., 2010). Il a également été montré que des évènements rares de « crossing-over » mènent à la perte d'hétérozygotie de certains gènes, pouvant favoriser l'apparition de tumeurs néoplasiques (Siudeja et al., 2015). L'intestin étant un organe dont la capacité de renouvellement est particulièrement sollicitée, les ISC qui maintiennent l'homéostasie souffrent ainsi d'un stress réplicatif supérieur à la moyenne. La répétition des cycles de prolifération au cours du temps entraîne l'accumulation de dommages cellulaires et ADN (L. Liu & Rando, 2011). Ces dommages favorisent l'apparition de mutations dans des gènes pouvant altérer le bon fonctionnement des ISC et ainsi menacer l'homéostasie ou procurer un avantage pro-tumoral. En effet, des études cytogénétiques de cancers du côlon chez l'homme ont montré un degré élevé d'instabilité génomique et d'aneuploïdie dans ces cellules (Rao & Yamada, 2013).

Mutations

Des mutations dans certaines voies de signalisation sont fréquemment retrouvées dans des pathologies inflammatoires de l'intestin (Vanuytsel et al., 2013). Certaines d'entre elles peuvent également conduire à l'initiation de tumeurs néoplasiques. Ces néoplasies constituent un premier pas vers le développement de cancers. Le séquençage en masse des tumeurs a révélé que les cancers du côlon humain possèdent plusieurs ensembles de gènes et de voies fréquemment mutés (Chittenden et al., 2008; Wood et al., 2007). On peut notamment citer l'exemple de la voie Wnt où la protéine APC lorsqu'elle est mutée provoque non seulement des pathologies inflammatoires, mais également des néoplasies. Des mutations germinales d'APC favorisent considérablement certaines pathologies inflammatoires héréditaires comme les polypes adénomateuses familiales (Malki et al., 2020). Pour les cancers intestinaux, c'est 70 à 80% des cancers du côlon sporadiques qui sont concernés par la présence d'une mutation somatique de APC (Malki et al., 2020). Parmi les mutations fréquemment retrouvées dans les cancers du côlon, on retrouve également la PI3K (« Phosphatidylinositol 3-kinase »), le suppresseur de tumeur TP53, un composant du complexe ubiquitine ligase SCF-E3/ FBXW7 (« F-box and WD repeat domain containing 7 » ; également connu sous le nom de hCDC4), le facteur de croissance TGF- β , des gènes impliqués dans la cohésion chromosomique, et le proto-oncogène K-RAS (Barber et al., 2008; Chittenden et al., 2008; Rao & Yamada, 2013; Wood et al., 2007).

Altérations épigénétiques

L'épigénétique implique des facteurs permettant de contrôler l'activité des gènes sans en changer la séquence d'ADN. Ces facteurs sont transmissibles lors de la division cellulaire et réversibles. Des modifications épigénétiques sont impliquées dans le développement de nombreux cancers, comme les cancers intestinaux. Parmi les mécanismes épigénétiques on distingue les méthylations de l'ADN, les modifications des histones ainsi que des régulateurs comme les ARN non codants (miARN, lncARN) (Grady & Carethers, 2008; Jung et al., 2020).

La méthylation de l'ADN est un processus effectué par des enzymes (DNA méthyltransférases) qui vont ajouter un groupement méthyl à certaines bases de l'ADN. Ce processus est réversible mais les mécanismes exacts sont encore incompris. La méthylation de l'ADN joue plusieurs rôles biologiques importants, notamment sur le niveau d'expression des gènes. La relation entre niveau de méthylation et expression est complexe, même s'il est

généralement admis qu'un promoteur fortement méthylé empêchera la transcription du gène en aval. Il a été reporté que des sites hypo-méthylés pouvaient impliquer la surexpression d'oncogènes comme *Myc* et *Ras* dans les cancers intestinaux (Grady & Carethers, 2008). Enfin, de manière intéressante la méthylation de l'ADN est un processus grandement impacté par de nombreux facteurs environnementaux.

Les histones sont des protéines autour desquelles vient s'enrouler l'ADN formant ainsi des nucléosomes. Le degré de compaction de l'ADN autour de ces nucléosomes rend les gènes plus ou moins accessibles à la machinerie de transcription, affectant ainsi l'expression des gènes. Grâce à diverses enzymes spécifiques, les histones peuvent être modifiées post-traductionnellement de nombreuses façons (méthylation, acétylation, sumoylation, phosphorylation, propionylation, butyrylation, succinylation, crotonylation etc...) (Stillman, 2018; Yadav et al., 2018). Ces modifications post-traductionnelles (MPT) influencent non seulement le degré de compaction des gènes, mais également le recrutement de diverses protéines (facteurs de transcription, régulateurs divers...). Ces MPT sont réversibles et leurs mécanismes d'apposition dynamiques. Ils sont impliqués dans de nombreux processus comme la différenciation cellulaire et le développement (Yadav et al., 2018). Des altérations des profils de ces MPT d'histones sont étroitement liés à des pathologies tels que des cancers, notamment lorsqu'ils sont liés à l'altérations d'expression de proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (Audia & Campbell, 2016; Baylin & Jones, 2016; Gargalionis et al., 2012; Grady & Carethers, 2008). Par exemple, plusieurs études ont montrés dans des lignées cellulaires et des échantillon de patients de cancers colorectaux des dérégulation de profils d'acétylation d'histones (Ashktorab et al., 2009; Fraga et al., 2005; Hashimoto et al., 2013; Karczmarski et al., 2014; Tamagawa et al., 2012). Des défauts de méthylation et de phosphorylation des histones ont également été décrits dans le cas de cancers colorectaux (Okugawa et al., 2015; Qin et al., 2020). Il serait ainsi peu surprenant de ne pas découvrir d'autres modification d'histones impliqués dans la dérégulation de processus menant à des cancers gastro-intestinaux.

Les ncARN (ARN non codants) représentent une part conséquente du transcriptome et leurs rôles de régulateurs dans l'expression géniques émergent au fur et à mesure qu'ils sont étudiés (Esteller, 2011). Parmi les différents types de ncARN, les petits ncARN (miARN) agissent comme régulateurs post-transcriptionnels d'ARNm. A contrario, les longs ncARN (lncARN) sont connus pour leur rôle de répression dans des mécanismes comme l'empreinte parentale et l'inactivation du chromosome X. Plus récemment, des rôles activateurs ont également été trouvés (Derrien & Guigó, 2011; Ørom et al., 2010). Des altérations de

l'expression de ces ncARN peuvent avoir des effets boules de neiges, et peuvent être impliquées dans des processus pathologiques. De ce fait, il a été montré qu'ils peuvent l'être dans le développement de néoplasies et des cancers intestinaux. Les ncARN peuvent ainsi jouer un rôle oncogénique, suppresseur de tumeur ou bien dépendant du contexte (Slack & Chinnaiyan, 2019). Dans le cas des cancers gastriques, le lncRNA PVT1 a été décrit pour favoriser l'angiogenèse et la progression tumorale en participant à la régulation épigénétique de P15 et P16 afin de promouvoir la prolifération cellulaire (Kong et al., 2015; J. Zhao et al., 2018).

La stabilité du génome, une mutation d'une protéine importante, les mécanismes dynamiques d'épigénétiques sont autant de processus jouant un rôle central dans l'expression génique. Des altérations du génome et de ces mécanismes peuvent impliquer la surexpression de proto-oncogène ou la répression de suppresseurs de tumeurs permettant l'initiation et la progression de processus tumoraux et cancéreux. Ces altérations ont été décrites pour être impliquées dans les cancers gastro-intestinaux, et encore beaucoup de travail reste à accomplir afin de relier ces altérations aux dysfonctionnement spécifique qu'ils engendrent (gène particulier, voie touchées etc...).

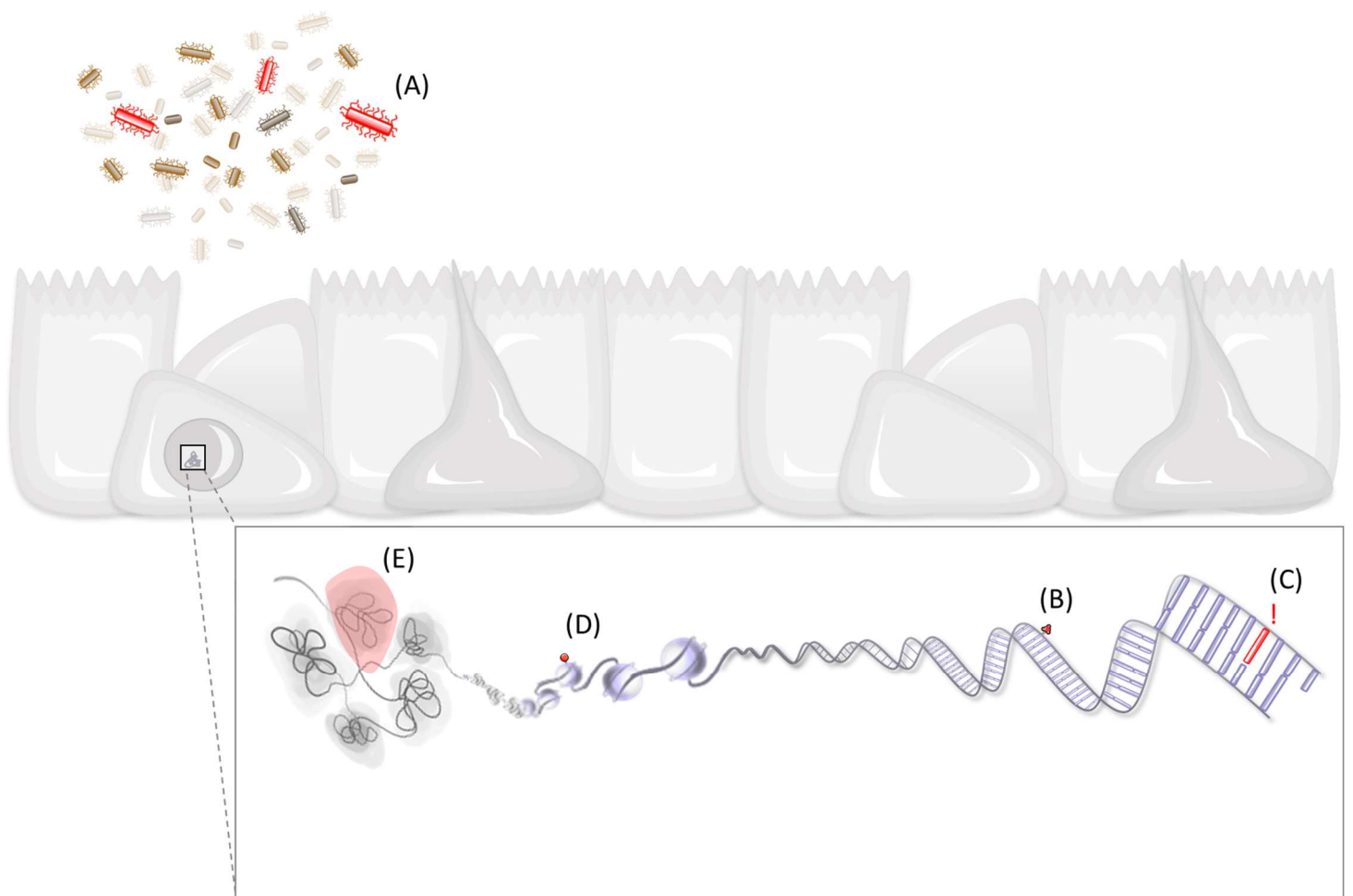


Figure 7: Variables importantes pouvant favoriser l'apparition/progression de pathologies inflammatoires et de cancers.

A. Dérégulation du microbiote en faveur d'une population pro-inflammatoire (dysbiose) **B.** Méthylations de l'ADN pouvant déréguler l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes **C.** Mutation ponctuelle d'un gène codant pour une protéine possédant un rôle suppresseur de tumeur ou oncogénique **D.** Modifications post-traductionnelles des histones pouvant affecter l'activité de gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes **E.** Mauvaise organisation 3D du génome altérant la répression/activation génique

I-3-3 Le vieillissement de l'intestin (ou le concert désaccordé du microbiote, de l'immunité et des gènes)

Tout organisme ne peut échapper au vieillissement, phénomène naturel et progressif d'altération biologique. Ce processus inéluctable des cellules se caractérise par des défauts qui affectent leur morphologie, leur physiologie ainsi que leur capacité à fonctionner correctement. Cela se traduit à plus grande échelle par un mauvais fonctionnement du tissu ou de l'organe et affecte le confort et la santé de l'individu.

L'ensemble des paramètres décrits dans les parties précédentes (**I-3-2**) est affecté au cours du temps. Leurs dérégulations affectent particulièrement le fonctionnement des ISC mettant à mal la capacité à maintenir l'homéostasie. Les pathologies intestinales liées à l'âge impliquent de façon importante des défauts de capacité de régénération des ISC (Behrens et al., 2014). Dans l'intestin de la drosophile, le vieillissement se caractérise par plusieurs changements, dont certains relatifs aux différentes dysfonctions abordées précédemment (Jasper, 2020; López-Otín et al., 2013) (**Fig. 8**) :

- Une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale due à des défauts au niveau des jonctions laissant ainsi pénétrer plus largement les petites molécules ainsi que les antigènes microbiens (Rera et al., 2012; Resnik-Docampo et al., 2017).
- Une perte d'acidité de la région des « *copper cells* » due à leur transdifférenciation en EC (métaplasie) (H. Li et al., 2016).
- Une croissance et un changement de la composition des populations microbiennes (dysbiose commensale) directement provoquée par la perte d'acidité de la région des « *copper cells* » (L. Guo et al., 2014; H. Li et al., 2016).
- Une hyperprolifération des ISC et une mauvaise différenciation des progéniteurs générés (dysplasie) directement provoquée par la dysbiose commensale (Benoît Biteau et al., 2008, 2010; Hu & Jasper, 2019)
- L'accumulation de mutations dans les ISC et un stress répliatif favorisant l'instabilité génomique menaçant l'homéostasie en favorisant la tumorigénèse (Siudeja et al., 2015).

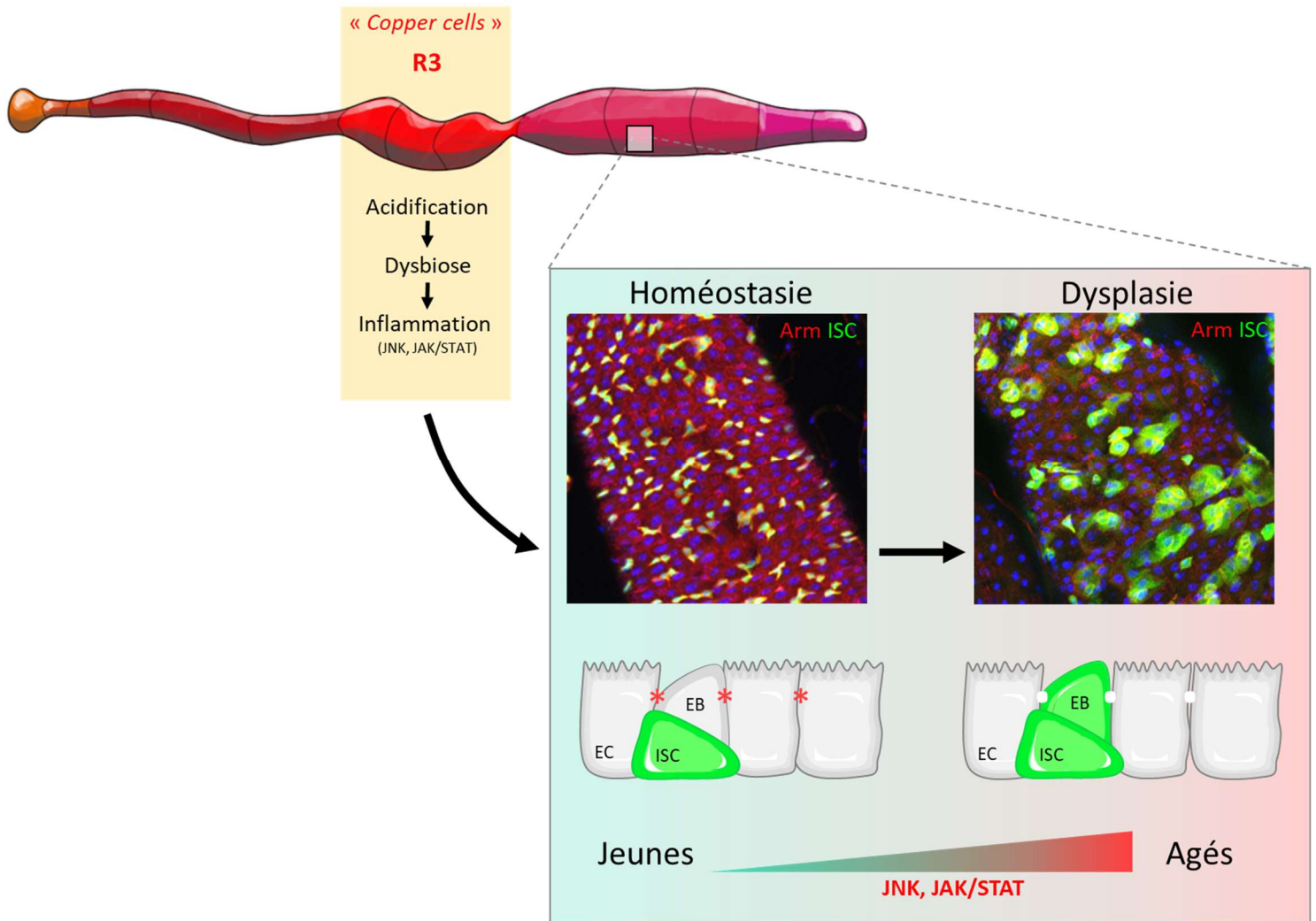


Figure 8: Dysbiose intestinale chez la drosophile au cours du vieillissement.

L'acidification de la région R3 (« copper cells ») provoque une dysbiose qui va induire une augmentation de l'activité de la voie JNK et JAK/STAT et induire de ce fait une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire dans tout l'intestin. On observe donc dans l'encadré une hyperprolifération et une mauvaise différenciation des progéniteurs en vert. Les jonctions entre les cellules sont altérées (asterix rouges), menant à une perte d'imperméabilité de l'épithélium.

La dysbiose commensale provoquée par le vieillissement augmente l'activation de la voie inflammatoire JNK dans les ISC (**Fig. 8**). Or, la suractivation de JNK induit d'une part l'hyperprolifération des ISC, d'autre part un mode de division symétrique excessifs des ISC contribuant ainsi à la dysplasie (Hu & Jasper, 2019). En encourageant une orientation du fuseau mitotique en faveur d'un mode de division asymétrique, les auteurs ont réussi à contrer les effets du vieillissement chez les drosophiles âgées et augmenter ainsi leur espérance de vie (Hu & Jasper, 2019). Il a également été montré qu'en réponse aux signaux de régénération, une activation transitoire et nécessaire de la signalisation TOR a lieu dans les ISC pour permettre une prolifération rapide (Haller et al., 2017). Cependant, une activation répétée de ces signaux

par des agressions constantes mènent à la perte des ISC, conséquences d'une différenciation précoce (Haller et al., 2017). Cette étude du laboratoire de Jasper a permis d'identifier que l'activation répétée de la signalisation mTORC1 à la suite d'une surprolifération constitue un moteur du déclin des ISC au cours du vieillissement. L'ensemble des résultats du laboratoire de Jasper montrent qu'à la suite d'une dysplasie, les ISC ayant subies des divisions à répétitions peuvent finir par se différencier précocement provoquant leur épuisement et compromettant la régénération du tissu ainsi privé de cellules souches. L'installation de pathologies graves et l'épuisement du pool d'ISC sont deux scénarios non exclusifs témoignant de l'importance du bon fonctionnement et d'une régulation adéquate des ISC, et de l'implication du vieillissement dans le développement de pathologies intestinales. De façon très intéressante, il a également été montré que des facteurs tels que la restriction calorique et certaines molécules comme la rapamycine permettent de rallonger l'espérance de vie en améliorant l'homéostasie intestinale (Xiaolan Fan et al., 2015; Regan et al., 2016). Quoiqu'il en soit, il est reconnu que la capacité de régénération de l'intestin a un profond impact sur la durée de vie d'un individu (López-Otín et al., 2013). Chez les mammifères, il est également reconnu que le vieillissement est associé à une dysbiose qui est source d'une inflammation persistante favorisant le développement de pathologies inflammatoires (Haran & McCormick, 2021).

Les ISC prolifèrent activement et sont hautement contrôlées par les signaux qu'elles reçoivent de leur environnement. Il est donc évident que les changements de cet environnement liés au vieillissement aient un impact majeur sur leur fonctionnement. Ces changements progressifs sont une cause importante du déclin de la capacité de régénération du tissu et mènent progressivement au développement de dysplasies et métaplasies. Ces conditions contribuent à l'installation progressives de MICI, l'apparition de néoplasies (tumeurs) favorisant l'émergence de cancers, et le développement de carcinomes invasifs (Clemente et al., 2012; Gonda et al., 2009; Kaser et al., 2010; Ullman et al., 2009; Uronis & Jobin, 2009).

CHAPITRE II : Maestro épigénétiques :

les protéines Polycomb et Trithorax

II-1 Historique et présentation des gènes Polycomb et Trithorax

Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) sont d'importants régulateurs du développement et de la différenciation cellulaire chez l'ensemble des Métazoaires (Kassis et al., 2017; Schuettengruber et al., 2017). Ces deux groupes de gènes ont été découverts chez la drosophile pour leur effet antagoniste sur la régulation des gènes du développement (gènes homéotiques *Hox*) (Prix Nobel 1995). Les protéines PcG répriment la transcription des gènes *Hox* par compaction de la chromatine via des modifications d'histones, tandis que les protéines TrxG permettent l'activation de leur transcription. Les gènes *Hox* dirigent la détermination de l'identité cellulaire des segments morphologiques le long de l'axe antéro-postérieur chez la quasi-intégralité des bilatériens (majorité des métazoaires) (Grimaud et al., 2006; Schuettengruber et al., 2017; Schwartz & Pirrotta, 2008). La dérégulation de l'expression des gènes *Hox* conduit à la transformation morphologique d'un segment en un autre. Par exemple chez la drosophile, la mutation du gène *Antennapedia* conduit à la formation d'une paire de pattes à la place d'une paire d'antenne. Le contrôle temporel et spatial de l'expression de ces gènes *Hox* par les protéines des groupes PcG et TrxG est donc crucial au cours du développement.

Les protéines du groupe PcG ont été identifiées chez la drosophile sur la base du phénotype qu'engendre leur mutation. C'est en 1940 qu'est observé pour la première fois un phénotype lié à la mutation de l'un de ces gènes : *esc* (*extra sexcombs*). Chez la drosophile mâle, les « peignes sexuels » sont de petites touffes de soies uniquement présentes sur la paire de patte la plus antérieure. Eleanor H. Slifer observa qu'une mutation récessive du gène *esc* provoque l'apparition de peignes sexuels partiels supplémentaires sur les deux autres paires de pattes de drosophiles mâles (Slifer, 1942). Quelques années plus tard en 1947, Pamela Lewis observera le même phénotype dû à une mutation dominante du gène *Pc* (*Polycomb*) (P. H. Lewis, 1947). Lors des trois décennies qui suivirent, d'autres mutants provoquant le même

phénotype furent découverts, mais tous dans un contexte restreint au développement des pattes au sein du thorax ou de défaut de prolifération dans les disques imaginaux. Il faudra attendre 1978, soit presque 40 ans après la première observation de EH Slifer, pour observer un mutant du gène *Pc* affecter la partie postérieure (abdominale) de l'animal (E. B. Lewis, 1978). Cette découverte marqua un tournant dans l'histoire des PcG. C'est à la suite de cette observation de Edward B. Lewis que le concept de groupe de gènes régulant négativement l'expression du gène homéotique *Sexcombs reduced (Scr)* émerge sous le nom de « Polycomb group proteins » (E. B. Lewis, 1978). A partir de là, sur la base de ce phénotype, un crible génétique à partir de mutants a permis d'identifier d'autres protéines de ce groupe (Kassis et al., 2017). Alors que le phénotype causé par une expression ectopique du gène *Hox Scr* était le phénotype original pour définir les gènes appartenant à la famille PcG, des phénotypes mutants causés par l'expression ectopique d'autres gènes *Hox* ont également été utilisés pour inclure de nouveaux gènes dans la famille PcG. On peut citer par exemple les gènes *Scm-related gene containing four mbt domains (Sfmbt)* et *calypso* pour lesquels des clones de cellules mutantes dans les disques imaginaux montrent une expression ectopique de multiples gènes *Hox* (Klymenko et al., 2006). Par la suite, des protéines ayant l'effet inverse (perte d'expression des gènes *Hox* lorsqu'ils sont mutés) ont été découverts et regroupés dans le groupe TrxG (Kassis et al., 2017; J. A. Kennison & Tamkun, 1988; James A. Kennison, 1995).

Depuis, d'autres rôles que celui de régulateurs des gènes du développement *Hox* ont été découverts pour ces deux familles de protéines (voir II-3). Les protéines des groupes PcG et TrxG sont impliquées dans le phénomène d'inactivation du chromosome X (de Napoles et al., 2004; J. Wang et al., 2001), d'empreintes génétiques (Almeida et al., 2020a; Schertzer et al., 2019), de régulation du cycle cellulaire (Martinez & Cavalli, 2006; ME et al., 2004; Oktaba et al., 2008), dans la biologie des cellules souches (Pasini et al., 2007; Sparmann & Van Lohuizen, 2006) et même impliquées dans des cancers (Lessard & Sauvageau, 2003; Leung et al., 2004; Sparmann & Van Lohuizen, 2006). Aujourd'hui, la diversité des protéines des groupes PcG et TrxG et de leurs modes d'actions, ainsi que les mécanismes variés dans lesquels elles sont associées, font de ces protéines des acteurs clés complexes très étudiés pour lesquels beaucoup de processus restent encore à découvrir et à élucider (Kassis et al., 2017; Schuettengruber et al., 2017).

II-2 Mode d'action des PcG

Les protéines du groupe PcG s'associent entre-elles pour former des complexes multimériques. Initialement deux types de complexes ont été caractérisés. Le « **Polycomb repressive complex 1** » (**PRC1**) et le « **Polycomb repressive complex 2** » (**PRC2**). Chez la drosophile comme chez les mammifères, le mécanisme le plus décrit est un mécanisme séquentiel (**Fig. 9**). Le PRC2 est recruté à la chromatine afin de catalyser une triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette modification d'histone est reconnue par le PRC1 qui à son tour opère une ubiquitination de la lysine 118 (119 chez les mammifères) de l'histone H2A (H2AK118ub/ H2AK119ub). L'ensemble de ces modifications d'histones permettent la compaction de la chromatine et ainsi la répression de gènes cibles rendus alors inaccessible à la machinerie de transcription (**Fig. 9**). Il existe des variations de ces complexes PRC1 et PRC2. On distingue également aujourd'hui d'autres complexes tels que le « Pho-repressive complex » (PhoRC), ainsi que le « Polycomb repressive deubiquitinase complex » (PR-DUB) (Schuettengruber et al., 2017). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec des anticorps dirigées contre plusieurs protéines du groupe PcG montrent que les PcG ont des centaines de gènes cible chez la drosophile (Nègre et al., 2006; Schwartz et al., 2006, 2010; Tolhuis et al., 2006). Dans cette partie **II-2**, je vais détailler la composition protéique des complexes PcG chez la drosophile, et faire un parallèle avec les orthologues connus et les éventuels niveaux de complexité supérieure existants chez les mammifères. J'aborde également ce qui est connu de leur mode de recrutement à la chromatine et de leur régulation.

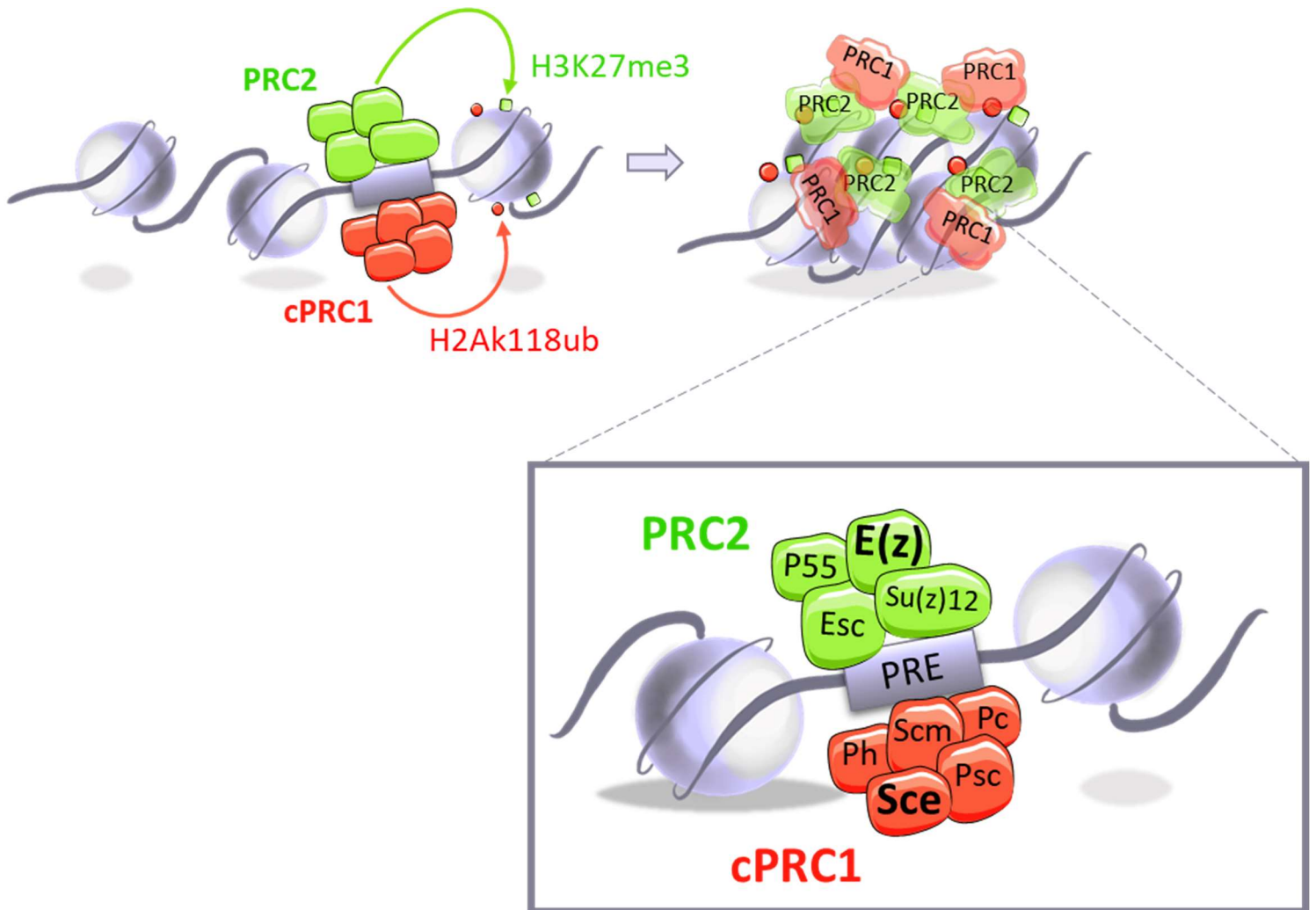


Figure 9: Mécanisme d'action canonique de PRC1 et PRC2 dans la répression de la transcription chez la drosophile.

Le recrutement consécutif de PRC2 et PRC1 permet de déposer des MPT d'histones (respectivement H3K27me3 et H2AK118ub) qui induit la compaction de la chromatine, et de ce fait empêche la transcription des gènes cibles en rendant la zone inaccessible à la machinerie de transcription. Les sous-unités portant l'activité catalytique de chaque complexe apparaissent en gras.

II-2-1 Le *Polycomb repressive complex 1* (PRC1)

PRC1 a récemment été sous-catégorisé en complexe canonique PRC1 (cPRC1) et non canonique (ou variant) PRC1 (ncPRC1 ou vPRC1). Le cœur de l'ensemble des PRC1 est composé de deux sous-unités, Psc/Su(z)2 (Posterior sex combs/Suppressor of zeste 2) et Sce (Sex combs extra, aussi connue sous le nom de dRing pour « drosophila really interesting new gene ») (Gao et al., 2012; Parreno et al., 2022; Piunti & Shilatifard, 2021; Schuettengruber et al., 2017). Le cœur du PRC1 s'associe alors avec différentes sous-unités afin de former les différents PRC1 (**Fig. 10**).

II-2-1-1 PRC1 Canonique

Afin de former le cPRC1, viennent s'ajouter au cœur du complexe les sous-unités : Pc (Polycomb), Ph (Polyhomeotic), et en quantité sous-stœchiométrique Scm (Sex comb on midleg) (Fritsch et al., 2003; Shao et al., 1999). Chaque sous-unité possède des domaines caractéristiques leur assignant des propriétés qui leur sont propres.

La sous-unité Sce constitue la sous-unité catalytique des complexes PRC1. Il s'agit d'une E3 ubiquitine ligase, c'est elle qui porte l'activité enzymatique d'ubiquitination. Elle possède un domaine RING, lui permettant des associations protéines-protéines, notamment avec Psc. Elle possède également un domaine RAWUL lui permettant d'interagir avec Pc afin de générer des hétérodimères stables (Bezsonova et al., 2009).

La sous-unité Psc possède un homologue fonctionnel (paralogue), Su(z)2 (Lo et al., 2009). Elles possèdent toutes deux un domaine RING leur permettant de s'associer à celui de Sce afin de former l'hétérodimère constituant le cœur du PRC1.

La sous-unité Pc possède un chromodomaine en N-terminal qui reconnaît spécifiquement H3K27me3 (Cao & Zhang, 2004). Basée sur ce fait, il avait été initialement proposé un mécanisme hiérarchique où H3K27me3 déposée en premier par le PRC2 permettait par la suite la liaison de Pc, et ainsi le recrutement de PRC1. Cependant, il s'avèrerait que ce mécanisme soit plus dynamique et complexe qu'initialement proposé (J. Müller & Kassis, 2006; O'Meara & Simon, 2012; Simon & Kingston, 2013)(voir section **II-2-6** Recrutement et régulation).

Le protéine Ph est codée par deux copies du gène dupliquées en tandem, *Ph-p* (proximal) et *Ph-d* (distal). Elles possèdent notamment un domaine SAM (« Sterile Alpha Motif ») (Peterson et al., 1997) lui permettant de former des homodimères Ph-Ph favorisant la répression des gènes

cibles (Robinson et al., 2012). Ce domaine peut également permettre à Ph de former des hétérodimères avec d'autres protéines de la même famille notamment Scm (C. A. Kim et al., 2002; Peterson et al., 1997). C'est le cas au sein du complexe Pho-RC (décrit plus bas en **II-2-5**). Ph est un important suppresseur de tumeur. Des clones mutants Ph dans les disques imaginaires conduisent à une hyperprolifération invasive dans le tissu, associés à l'activation ectopique des voies de signalisation Notch et JAK/STAT (Classen et al., 2009; Siqian Feng et al., 2011, 2012; González et al., 2009; Martinez et al., 2009).

Enfin, **la sous unité Scm** possède une propriété d'interaction avec Pc via un domaine SAM. Cependant, Scm est retrouvée en quantité sous-stœchiométrique par rapport aux autres membres du complexe PRC1 (Shao et al., 1999), suggérant qu'elle n'interagit qu'avec une partie du pool total de PRC1 (de façon non systématique). Plus récemment, il a été montré que Scm interagissait étroitement avec PRC1, PRC2 et PhoRC (Kang et al., 2015), suggérant qu'elle pourrait constituer un pont important entre ces complexes (Kassis et al., 2017).

Chez les mammifères, il existe deux homologues de Sce (RING1A/RING1B) et six de Psc (PCGF1-6) auxquels viennent s'ajouter l'un des cinq homologues de Pc, les « chromobox-domain proteins » CBX2, 4, 6, 7, 8 et l'un des trois homologues de Ph, PHC1-3 (Schuettengruber et al., 2017) (**Fig. 10**). La multiplication du nombre de protéines homologues au cours de l'évolution rend plus complexe l'étude de ces protéines chez les mammifères, d'autant qu'un plus grand nombre de complexes peuvent ainsi être formés (canoniques et non canoniques). En effet, la multiplicité des complexes PRC1 (canoniques et non canoniques) chez les mammifères témoigne du degré de complexité supérieur dans la régulation des processus associés. Cependant, ces processus étant très conservés, la drosophile nous fournit un modèle plus simple pour l'étude de ces protéines puisqu'elle ne possède pas/peu de paralogues pour chacune d'entre elles, facilitant les études génétiques.

II-2-1-2 PRC1 non canonique : le complexe dRAF chez la drosophile

Le complexe dRAF (« dRing associated factor ») est un complexe PRC1 non canonique. Dans ce complexe, les sous-unités Sce et Psc du PRC1 forment un complexe alternatif en s'associant à un nouveau membre des Polycombs identifié en 2008 chez la drosophile, Kdm2 (Lagarou et al., 2008). De la même façon que PRC1, dRAF est également capable de déposer la marque H2AK118ub. La protéine Kdm2 est une déméthylase permettant d'ôter spécifiquement la marque H3K36me2, une marque activatrice de la transcription déposée par

les protéines du groupe Trithorax. Comme il a déjà été expliqué plus haut, l'activité de Sce seule est très limitée et augmente lors de l'association avec Psc. Or, il s'avère que cette activité est largement plus élevée lorsque les deux protéines s'associent à Kdm2, suggérant qu'une majorité des H2AK118ub déposés par les Polycomb le soit par dRAF plutôt que par PRC1 (Lagarou et al., 2008). De plus, ce complexe est également conservé chez les mammifères car on y retrouve KDM2B, l'homologue de Kdm2 capable de former le même complexe nommé BCOR correspondant au PRC1 non canonique PRC1.1 (S. J. Wong et al., 2016). Cependant, il faut garder en mémoire que chez les mammifères, un plus grand nombre de complexes non canoniques existent, notés du ncPRC1.1 au ncPRC1.6 (Fig. 10).

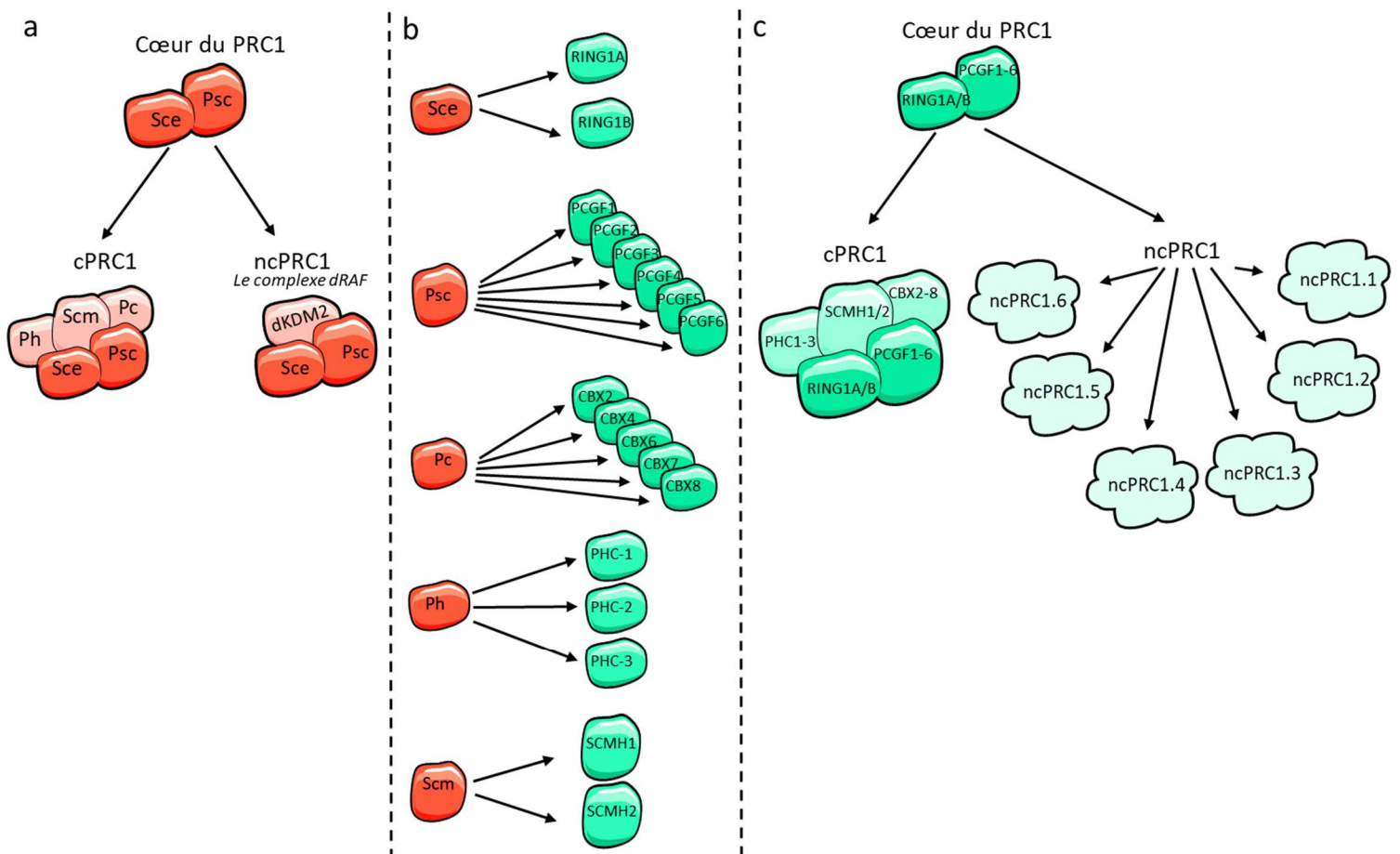


Figure 10: Composition des complexes PRC1 chez la drosophile et les mammifères.

Sont représentés en rouges (a, b) les principales protéines chez la drosophile et en vert (b, c) leur orthologues et leur association chez les mammifères.

II-2-2 Le Polycomb repressive complex 2 (PRC2)

II-2-2-1 Le cœur du complexe

Le complexe PRC2 permet la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Le cœur du complexe est composé des sous-unités E(z) (Enhancer of zeste), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12), Caf1-55 (Chromatin assembly factor 1, p55 subunit) et Esc (Extra sexcombs) (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; J. Müller et al., 2002; Piunti & Shilatifard, 2021) (**Fig. 11**).

E(z) est la sous-unité catalytique du complexe. Elle possède l'activité méthyltransférase et dépose la marque H3K27me3 grâce à son domaine SET (Cao & Zhang, 2004; Dillon et al., 2005; Rea et al., 2000). Cependant, il est important de noter que E(z) seule n'est pas capable de méthyler l'histone H3 (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Ketel et al., 2005; J. Müller et al., 2002; Nekrasov et al., 2005). L'activité histone méthyltransférase nécessite qu'elle s'associe avec Su(z)12 et Esc, faisant de l'intégrité du complexe une condition *sine qua non* à son fonctionnement.

La sous-unité Su(z)12 est primordiale pour stabiliser et permettre l'activité histone méthylase de E(z). Elle agit avec la sous-unité Caf1-55.

La protéine Esc possède un homologue fonctionnel Escl (Esc-like). Ces deux protéines possèdent un domaine WD40 leur permettant d'identifier la marque H3K27me3 et de la maintenir au cours de la réplication (Margueron et al., 2009).

Chez les mammifères, E(z) possède deux homologues (EZH1/2) mutuellement exclusifs (**Fig. 11**). EZH1 est exprimée dans les cellules quiescentes et EZH2 dans les cellules en prolifération (Margueron et al., 2009). Les paralogues Esc/Escl possèdent quatre homologues mammaliens (EED1-4, « Embryonic ectoderm development »). Su(z)12 en possède un seul nommé SUZ12 et pour finir, Caf1-55 est l'équivalent de la protéine RbAp46/48 de mammifère (**Fig. 11**).

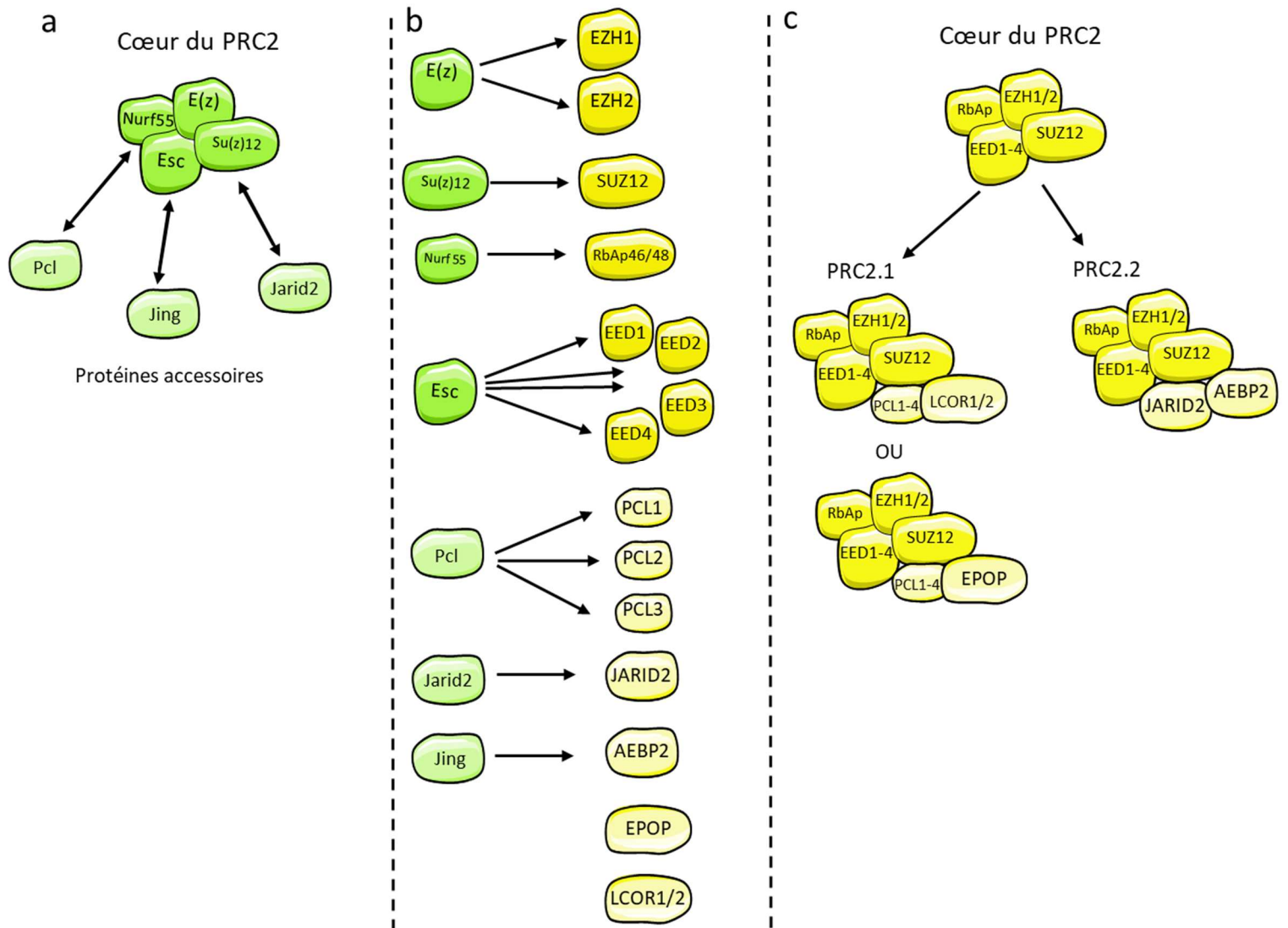


Figure 11: Composition des complexes PRC2 chez la drosophile et les mammifères.

Sont représentés en vert (a, b) les principales protéines chez la drosophile et en jaune (b, c) leur orthologues et leur association chez les mammifères. Les couleurs plus « claires » représentent les protéines additionnelles (accessoires) pouvant s'associer de façon sub-stœchiométrique.

II-2-2-2 Protéines additionnelles (ou accessoires)

Plusieurs autres protéines sont capables de s'associer de façon sub-stœchiométrique et d'interagir avec les composants du PRC2 afin de stimuler son activité enzymatique (Panning, 2010) (**Fig. 11**). Ces protéines ne sont pas indispensables mais constituent des facteurs auxiliaires permettant une régulation plus fine et plus complexe de l'activité du PRC2. Il est très intéressant d'observer que l'apparition de sous-unités accessoires de PRC2 est corrélée avec l'augmentation de la complexité cellulaire et tissulaire au sein des métazoaires (Piunti & Shilatifard, 2021; Schuettengruber et al., 2017). Ce fait suggère que la régulation supplémentaire de l'activité de PRC2 par ces sous-unités régulatrices pourrait être essentielle lors de la spécification de l'identité cellulaire au cours du développement et de la différenciation.

Chez la drosophile, trois protéines auxiliaires de PRC2 ont été identifiées (Schuettengruber et al., 2017) (**Fig. 11**). On distingue :

La protéine Pcl (« Polycomb like ») pour laquelle le complexe PRC2-Pcl (PRC2.1 chez les mammifères) a été rapporté pour augmenter l'activité H3K27me3 du complexe chez la drosophile, mais également chez les mammifères (Cao et al., 2008; Nekrasov et al., 2005; Sarma et al., 2008; Savla et al., 2008).

La protéine nucléaire Jarid2 (« Jumonji, AT rich interactive domain 2 ») qui se lie à l'ADN et recrute divers complexes tels que PRC2, permettant sa stabilisation à la chromatine afin de favoriser et potentialiser son action (Son et al., 2013). Chez les mammifères, il a été démontré que son homologue JARID2 pouvait interagir avec EZH (G. Li et al., 2010) et SUZ12 (Panning, 2010).

Enfin, **Jing** (AEBP2 pour « AE-1-Binding Proteins 2 » chez les mammifères), qui est une protéine à domaine zinc-finger pouvant se lier directement à l'ADN. Chez les mammifères, AEBP2 aide à l'activité H3K27me3 de PRC2 (Cao & Zhang, 2004).

D'autres protéines additionnelles de PRC2 ont été identifiées chez les mammifères telles que EPOP (« Elongin BC And Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein »)/C17orf96 et LCOR (« Ligand-dependent corepressor »)/C10orf12 pour lesquelles aucun homologue chez la drosophile n'a été identifié à ce jour (Schuettengruber et al., 2017).

De manière générale, les études fonctionnelles et biochimiques ont permis d'élucider la contribution et le rôle mécanistique des protéines les plus importantes de PRC1 et PRC2. Cependant, la contribution biochimique des protéines sub-stœchiométriques ou accessoires, ainsi que la contribution exacte de chaque paralogue, ne sont pas encore très claires, notamment chez les organismes les plus complexes comme les mammifères. Un résumé des fonctions biochimiques précises connues à ce jour chez les mammifères a été décrit récemment (S. Wang et al., 2021).

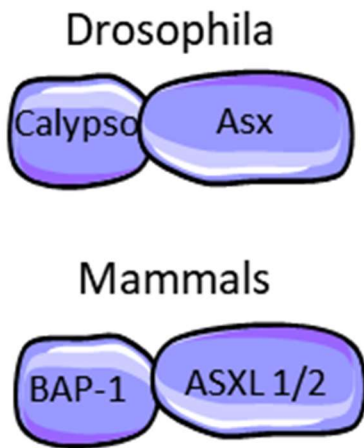
II-2-4 Le complexe PR-DUB

Le complexe PR-DUB (« Polycomb repressive de-ubiquitinase ») est composé de deux protéines essentielles : la sous-unité catalytique Calypso (BAP 1 chez les mammifères) capable d'hydrolyser et d'enlever le groupement ubiquitine porté spécifiquement par H2AK118ub, et Asx, une protéine de liaison à la chromatine (ASXL 1/2 chez les mammifères) (Scheuermann et al., 2010; Schuettengruber & Cavalli, 2010) (**Fig. 12**). Ce complexe appartenant aux PcG permet une dé-ubiquitination spécifique de H2A, ce qui peut paraître contre intuitif vu le rôle répresseur de la transcription par la compaction de la chromatine des PcG (Alonso et al., 2007). PR-DUB et PRC1 sont colocalisés sur la chromatine, témoignant de l'importance d'une régulation fine entre ubiquitination et dé-ubiquitination de l'H2A dans la répression de la transcription médiée par les PcG (Scheuermann et al., 2012; Schuettengruber & Cavalli, 2010).

II-2-5 Le complexe Pho-RC

Le complexe Pho-RC est composé des protéines Pho (Pleiohomeotic) et dSfmbt (Klymenko et al., 2006; Schuettengruber et al., 2017) (**Fig. 12**). Ce complexe ne possède pas d'activité enzymatique mais les deux protéines le composant sont très intéressantes. Pho possède quatre domaines « zinc-finger » lui permettant de se lier à l'ADN (Brown et al., 1998). dSfmbt possède quatre sites MBT (« Malignant Brain Tumor ») lui permettant d'interagir d'une part avec H3K9 et H4K20 mono et di-méthylées, et d'autre part avec Pho (Alfieri et al., 2013; Grimm et al., 2009), mais contient également un domaine SAM (que possèdent Ph et Scm) lui permettant d'interagir avec Ph. Il a été montré que Pho était lui aussi capable d'interagir avec des composants du PRC1, notamment Pc et Ph (Mohd-Sarip et al., 2002), mais également avec la sous-unité E(z) du PRC2 (Liangjun Wang et al., 2004). Ces interactions constituent un élément très intéressant car elles supposent que le complexe Pho-RC pourrait recruter le PRC1 via une interaction entre dSfmbt et Ph (Frey et al., 2016; Grimm et al., 2009) et/ou Pho et Pc/Ph (Mohd-Sarip et al., 2002). Ces résultats suggèrent que Pho-RC possède un rôle central dans le recrutement des complexes Polycomb PRC1 et PRC2 même s'il ne constitue pas le seul facteur à leur recrutement. Chez les mammifères, un complexe similaire composé des protéines SFMBT2 et CASZ1 a été décrit en 2013 (Lecona et al., 2013).

Pr-DUB



Pho-RC

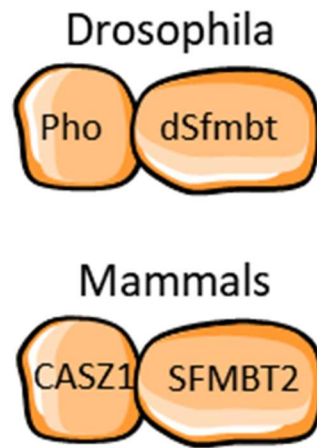


Figure 12: Composition des complexes PR-DUB et Pho-RC chez la drosophile et les mammifères

II-2-6 Recrutement et régulation des PcG

II-2-6-1 Mécanismes moléculaires de recrutement de PRC1 et PRC2

Une particularité importante des complexes PRC1 et PRC2 est qu'aucune de leurs sous-unités protéiques ne possède de domaine de liaison à l'ADN pour des séquences spécifiques. Leur action dépend donc d'autres composantes qui dirigent leur recrutement vers des sites chromatinien spécifiques. Chez la drosophile, les protéines PcG sont recrutées à la chromatine grâce à des éléments cis-régulateurs nommés PRE (« Polycomb Responsive Elements ») (Kassis & Brown, 2013; J. Müller & Kassis, 2006; Reinig et al., 2020; Ringrose & Paro, 2007). Ces séquences sont constituées de plusieurs sites de liaison pour de nombreux facteurs protéiques. Malgré les nombreuses recherches sur la nature des PRE chez la drosophile, la combinaison précise de ces sites de liaison à l'ADN et les interactions protéiques nécessaires à leur activité restent encore largement incompréhensibles (Kassis & Brown, 2013; J. Müller & Kassis, 2006). Au point de vue mécanistique, PRC2 serait le premier recruté sur ces séquences PRE. La sous-unité E(z) dépose l'H3K27me3 reconnue par la sous-unité Pc du cPRC1, permettant le recrutement du complexe, puis l'ajout de la marque H2AK118ub par la sous-unité catalytique Sce (Kassis & Brown, 2013; Parreno et al., 2022; Van Kruijsbergen et al., 2015) (**Fig. 9**). Ce mécanisme de recrutement séquentiel de PRC2 puis de PRC1 est très largement décrit dans la littérature. En effet en cas de perte d'activité enzymatique de PRC2, la liaison de PRC1 est également perdue (Boyer et al., 2006; Cao et al., 2002; Liangjun Wang et al., 2004). Cependant de plus en plus de données récentes ne corrélaient pas avec ce modèle, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs (Van Kruijsbergen et al., 2015). De plus, les ncPRC1 ne portent pas la sous-unité Pc permettant la reconnaissance de la marque déposée par PRC2, et très peu de ces ncPRC1 colocalisent avec celle-ci, supportant le fait qu'il existerait d'autres mécanismes (Flora et al., 2021; Gao et al., 2012). Chez les mammifères, il a été montré que la marque déposée par PRC1 participait au recrutement de PRC2.2 (reconnue par JARID2 et AEBP2) et à des ncPRC1 (reconnue par RING et RYBP) favorisant la communication entre PRC2 et les PRC1 (Blackledge & Klose, 2021; Cooper et al., 2014) (**Fig. 13A et 13B**). La marque déposée par PRC2 est non seulement reconnue par PRC1 comme décrit dans le mécanisme séquentiel, mais également par PRC2 lui-même (via EED) permettant de renforcer l'activité et propager le dépôt de H3K27me3 (Blackledge & Klose, 2021) (**Fig. 13C et 13D**). Les protéines PcG de mammifères sont plus diversifiées les mécanismes par lesquels les PRC sont recrutés sur leurs

gènes cibles sont multifactoriels et complexes. (Achour & Aguilo, 2018; Beisel & Paro, 2011; Kerppola, 2009; Morey & Helin, 2010; Powell et al., 2012) Chez les mammifères, l'existence de PRE a proprement parlé n'a pas été rapportée. (Parreno et al., 2022; Sing et al., 2009). Chez les mammifères, tous les gènes cibles des PcG chevauchent des îlots CpG non méthylés, ce qui laisse supposer que ces séquences agissent comme éléments régulateurs du recrutement des PcG (Ku et al., 2008; Owen & Davidovich, 2022). Cependant, alors qu'il a été démontré que des ARN sont impliqués dans le recrutement des PcG chez les mammifères, leur rôle dans le recrutement des PcG n'a pour le moment pas encore été démontré chez la drosophile (Almeida et al., 2020b; J. Zhao et al., 2010). Il a récemment été proposé que PRC1 et PRC2 étaient capables de se lier largement aux ARN, de façon assez non spécifique et avec un grand nombre d'entre eux (lncARN, mRNA etc) (Trotman et al., 2021).

Plus largement, le recrutement des PcG est modulé par le « paysage » chromatinien. En effet, les protéines du groupe TrxG jouent un rôle antagoniste à celui des PcG. Par le biais de la marque activatrice H3K4me1/2/3, elles empêchent les PcG d'agir et permettent ainsi une régulation précise et dynamique des processus d'activation/répression de la transcription (Cenik & Shilatifard, 2021; Schuettengruber et al., 2017).

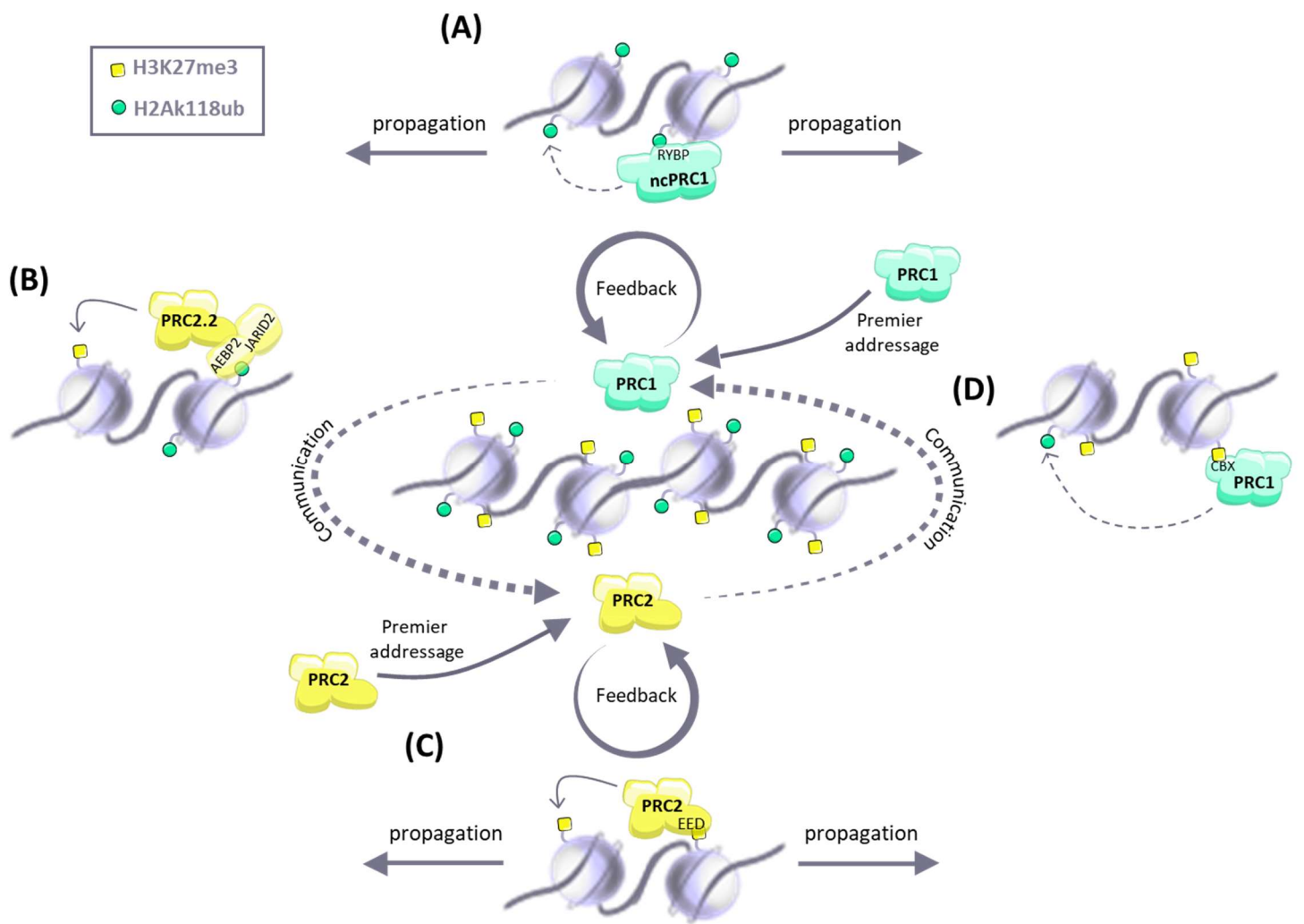


Figure 13: Mécanismes moléculaires additionnels de recrutement de PRC1 et PRC2 décrits chez les mammifères (Voir texte principal en II-2-6-1).

II-2-6-2 Régulations des protéines PcG

L'implication des PcG dans des processus dynamiques tels que le développement et les mécanismes de différenciation cellulaire nécessite également une certaine dynamique dans l'association des protéines PcG et leur régulation. Actuellement, comment ce dynamisme est régulé reste peu documenté. Les protéines PcG sont probablement contrôlées par des voies de signalisation, cependant peu de choses sont connues sur la manière dont les différentes voies pourraient réguler l'activité des PcG (Morey & Helin, 2010). Des modifications post-traductionnelles (MPT) de certaines sous-unités du PRC1 et du PRC2 influenceraient leur régulation. Une étude a montré qu'Akt était capable de phosphoryler la sérine 21 de EZH2, la sous unité catalytique de PRC2 chez les mammifères, affectant ainsi son affinité pour la chromatine et de ce fait réduisant le niveau globale d'H3K27me3 déposées (Cha et al., 2005). Il a également été montré que BMI1 du PRC1 de mammifère pouvait être phosphorylé et ainsi induire la dissociation du PRC1 de la chromatine (Voncken et al., 2005). De plus, la sous-unité catalytique RING1B du PRC1 serait capable d'auto-ubiquitination chez les mammifères et Ph de drosophile d'être glycosylé (Ben-Saadon et al., 2006; Gambetta et al., 2009). Ces éléments suggèrent que les protéines PcG pourraient être régulées par le biais de MPT.

II-3 Fonctions biologiques et pathologies associées

II-3-1 Mécanismes biologiques impliquant les PcG

Les MPT des histones sont des régulateurs clés des processus associés à la chromatine, notamment l'expression des gènes, la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN. En apposant des MPT sur les histones, les PcG participent activement et de façon dynamique à ces processus. Ils sont notamment très largement décrits pour leur rôle de maintien de la répression de la transcription génique à travers la compaction de la chromatine (Parreno et al., 2022). En compactant la chromatine, les PcG participent à la mise en place de domaines et structures 3D du génome tels que les « topological associated domains » (TADs) (Eagen et al., 2017; Loubiere et al., 2020; Rhodes et al., 2020). Ces structures spatiales permettent de séparer dans des compartiments différents les zones transcriptionnellement actives (euchromatine) des zones transcriptionnellement inactives (hétérochromatine compactée). De façon intéressante, les PcG majoritairement connus pour leur rôle répressif sur la transcription joueraient également un rôle

dans l'activation de la transcription dans des contextes aussi bien physiologiques que pathologiques (Cohen et al., 2020; Flora et al., 2021; Frangini et al., 2013; Gao et al., 2014; Giner-Laguada & Vidal, 2020; Kondo et al., 2014; Xicheng Liu et al., 2017; Maezawa et al., 2017). Par exemple, il a été montré dans les cellules souches embryonnaires que PCGF3/5 fonctionnent principalement comme des activateurs transcriptionnels de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation du mésoderme (W. Zhao et al., 2017). Les auteurs ont montré que PCGF3 et 5 agissaient de façon redondante, et interagissaient avec les protéines Text10 et p300 dans ce mécanisme.

II-3-1-1 Développement et cellules souches adultes

Comme je l'ai déjà évoqué, les PcG sont nécessaires à la répression des gènes Hox lors du développement. Alors que la fonction biologique de PRC1 et PRC2 a été largement étudiée au cours du développement et dans les cellules souches embryonnaires (humaines et murines), leur rôle fonctionnel dans les cellules souches adultes fait l'objet de recherches plus récentes. Ainsi, il a été montré que PRC1 et PRC2 jouent un rôle crucial dans la biologie des cellules souches adultes dans de nombreux tissus (Flora et al., 2021), régulant l'expression de gènes impliqués dans les processus de maintien de la pluripotence, du cycle cellulaire et de la différenciation. Ainsi, les PcG ont été décrits chez les mammifères pour réguler des processus importants dans les cellules souches adultes de l'intestin (abordés dans le paragraphe II-4), de l'épiderme, du cœur, dans l'épithélium olfactif et dans l'hématopoïèse (Flora et al., 2021). Chez la drosophile, Psc et Su(z)2 agissent de façon redondante dans les ovaires afin de limiter l'auto-renouvellement des cellules souches folliculaires en régulant la voie de signalisation Wnt (X. Li et al., 2010). Une autre étude a également identifié un rôle redondant de Psc et Su(z)2 dans les testicules de la drosophile (Morillo Prado et al., 2012a). Les auteurs ont montré que Psc et Su(z)2 permettaient de restreindre la prolifération et maintenir de l'identité des cellules souches du cyste. L'action de PRC1 et de PRC2 participe donc à la régulation très précise de processus permettant une régénération tissulaire appropriée tout au long de la vie d'un organisme.

II-3-1-2 Réponse aux dommages à l'ADN et leur réparation

Au-delà de son rôle dans la répression génique, l'ubiquitination de l'histone H2A est une MPT importante impliquée dans la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR pour « DNA damage response »). Son implication dans cette réponse a été beaucoup étudiée dans le contexte de cassures double brin de l'ADN (DSB pour « double-strand break »). Lors

de DSB de l'ADN, l'ubiquitination réalisée par PRC1 de l'H2A/H2AX permet de recruter les facteurs nécessaires à la réparation par les voies de recombinaison homologue (HR) et de « non-homologous end joining » (NHEJ) (Ismail et al., 2010; Pan et al., 2011). Cette action de PRC1 permettrait également de compacter la chromatine pour bloquer temporairement la transcription aux sites endommagés (Bergink et al., 2006; Fitieh et al., 2021; Uckelmann & Sixma, 2017). Une étude a également révélé un rôle très important de BMI1 (PCFG4) de façon indépendante du PRC1 dans cette fonction. Les auteurs ont montré que BMI1 et UBR5 (une E3 ubiquitine ligase) répriment l'élongation de l'ARN polymérase II (Pol-II) et la synthèse du brin complémentaire d'ARN au niveau des lésions d'ADN induites par les UV. Dans ce mécanisme, UBR5 s'associe à BMI1 et régule l'abondance du complexe chaperon d'histone FACT (composé des protéines SSRP1 and SPT16) au niveau de la chromatine endommagée, et régule l'allongement de la Pol-II au niveau des lésions. Les auteurs ont ainsi identifié une qui régule la répression transcriptionnelle induite par les dommages à l'ADN régie par un membre des PcG de façon indépendante de son complexe habituel (Sanchez et al., 2016).

II-3-1-4 Mémoire épigénétique : l'empreinte parentale

Chez les mammifères, la majorité des gènes s'expriment de façon bi-allélique. Chaque individu dispose d'une copie maternelle et paternelle d'un gène. Cependant, certains gènes ne s'expriment que par le biais d'une seule des deux copies, celle de la mère ou du père étant complètement éteinte. C'est ce qu'on appelle l'empreinte parentale. Elle est apposée lors de la gamétogénèse où les génomes parentaux subissent des modifications épigénétiques différentes. Le génome est marqué par une méthylation de l'ADN différente des îlots CpG qu'il s'agisse d'un mâle ou d'une femelle (Suhua Feng et al., 2010), et des modifications d'histones sont également impliquées afin de réprimer l'expression de gènes (Sanli et al., 2018). Le complexe PRC2 est impliqué dans l'empreinte génomique, notamment en s'associant à des lncRNA afin de réprimer l'expression de gènes cibles (Almeida et al., 2020b; Kelley & Kuroda, 2000; Khalil et al., 2009; Mager et al., 2003; Sanli et al., 2018; Schertzer et al., 2019; J. Zhao et al., 2010).

II-3-1-3 Processus d'inactivation du chromosome X

Chez le règne animal comme le règne végétal, le sexe est déterminé par les chromosomes sexuels qui varient en copies et en nombre. Il existe donc des différences chromosomiques entre mâles et femelles, impliquant un déséquilibre d'expression des gènes portés par les chromosomes sexuels. Au cours de l'évolution, des mécanismes de compensations ont été mis en place grâce à des subterfuges épigénétiques (Muyle et al., 2021).

Chez les mammifères et les plantes à fleurs, les femelles possèdent deux chromosomes X (XX), soit un de plus que les mâles (XY). De ce fait dans chaque cellule, l'un des deux X est « inactivé » (Lyon, 1961), c'est-à-dire que la quasi-totalité des gènes qu'il porte est réprimée transcriptionnellement. Le chromosome X à inactiver est choisi aléatoirement, générant ainsi un individu mosaïque dont l'ensemble des cellules n'exprime pas le même chromosome X (Augui & Heard, 2008). Cette répression est médiée par un lncRNA appelé *Xist*. Peu après l'expression de *Xist*, la chromatine du chromosome X à inactiver se retrouve « décorée » de marques catalysées par les PRC1/2 (H3K27ME3 H2AK119ub) (Almeida et al., 2017; de Napoles et al., 2004; Fursova et al., 2019; Marchese & Huarte, 2014; Okamoto et al., 2004; Żylicz et al., 2019).

La drosophile possède elle aussi un mécanisme de compensation de dose, qui implique également des lncRNA nommés roX1 et roX2. A l'inverse des mammifères, ces lncRNA ciblent le chromosome X des mâles afin d'opérer des changements épigénétiques lui permettant d'être plus fortement transcrit (Argyridou & Parsch, 2018). De ce fait, il produit autant de transcrits que les femelles possédant deux chromosomes X (Ferrari et al., 2014; Gelbart et al., 2009; Keller & Akhtar, 2015; Kelley & Kuroda, 2000; Lakhotia, 2021) Cependant, aucune implication des PcG dans ce mécanisme chez la drosophile n'a été montrée à ce jour.

II-3-2 PRC1 et PRC2 dans les cancers

Il est depuis longtemps admis que l'acquisition séquentielle de mutations dans l'ADN peut induire la tumorigénèse par l'activation d'oncogènes et la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs (Hanahan & Weinberg, 2011). Cependant, l'implication des altérations épigénétiques telles que les MPT d'histones dans le développement de cancers est aujourd'hui également très bien documentée (Baylin & Jones, 2016; Cavalli & Heard, 2019; Flavahan et al., 2017). En effet, ces MPT étant des facteurs clés dans l'organisation 3D du génome (par régulation des degrés de compaction de la chromatine), il n'est pas étonnant qu'une modification des profils de ces MPT ait été reliée au développement et la progression tumorale via l'altération de l'expression d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Les PcG étant des régulateurs majeurs de ces MPT d'histones, notamment dans le cadre de fonctions liées à la prolifération et l'identité cellulaire, des dérégulations des PcG sont ainsi associées aussi bien à des cancers solides (carcinomes et sarcomes) qu'hématopoïétiques (lymphomes et leucémies) (Parreno et al., 2022; Tamburri et al., 2022). Par le biais de la dérégulation des PcG, les cellules peuvent donc acquérir des compétences très intéressantes pour les cellules cancéreuses (M. C.

Wang et al., 2015; X. Zhao & Wu, 2021). Une suractivation des PcG est reconnue pour jouer essentiellement un rôle oncogénique. Cependant, celui de chaque sous-unité prise indépendamment peut varier considérablement. En effet, certaines sous-unités peuvent agir à la fois comme oncogène ou comme suppresseur de tumeurs (Xicheng Liu et al., 2017; Mochizuki-Kashio et al., 2015; Oguro et al., 2012; Piunti & Shilatifard, 2021).

C'est le cas de la sous-unité EZH2 du PRC2 impliquée dans de nombreux cancers, comme les cancers du sein, de la prostate ou encore les cancers hématopoïétiques. En fonction du contexte cellulaire, EZH2 peut jouer un rôle oncogène (Y. nan Chen et al., 2021; D'Angelo et al., 2015), ou suppresseur de tumeurs (Ernst et al., 2010; Mochizuki-Kashio et al., 2015; Nikoloski et al., 2010; Rinke et al., 2020). EZH2 peut également subir des MPT qui jouent un rôle supplémentaire dans certains cancers (Zhongwei Li et al., 2020; Yuan et al., 2020). En effet, ces modifications modifient la stabilité et l'activité d'EZH2 influant positivement ou négativement sur son activité catalytique. De ce fait, le paysage chromatinien peut se retrouver hyper-méthylé ou au contraire hypo-méthylé, favorisant la tumorigénèse en dérégulant l'expression de gènes.

Du côté du PRC1, PCGF4 (aussi appelé BMI1, homologue de Psc de drosophile) est largement décrite pour agir avec c-myc afin de favoriser la tumorigénèse (Facchino, 2010; Haupt et al., 1993; Xicheng Liu et al., 2017). BMI1 est un régulateur négatif de gènes contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose comme p16^{Ink4} et p19^{arf}. Une surexpression de BMI1 favorise la prolifération et empêche l'apoptose par le biais de la répression trop forte des gènes codant pour p16^{Ink4} et p19^{arf} (Fasano et al., 2007; Jacobs et al., 1999; Martínez-Romero et al., 2009; Molofsky et al., 2005). Ainsi BMI1 est impliqué dans de nombreux cancers, parmi ceux-ci des cancers intestinaux (gastrique, pancréatique) et hormonaux (ovaires, seins) (Althobiti et al., 2020; X. Wang et al., 2016). A l'inverse, PCGF2 (aussi appelé MEL-18) est décrit pour jouer un rôle suppresseur de tumeur (J. Y. Lee & Kong, 2015; Tetsu et al., 1998; Won et al., 2012). Très souvent BMI1 et MEL-18 ont des niveaux d'expression inversement corrélés dans de nombreux cancers (W. J. Guo et al., 2007; X. W. Zhang et al., 2010). De façon intéressante, des fonctions oncogéniques de BMI1 indépendantes de l'activité catalytique du complexe PRC1 (H2Aub) ont été suggérées (S. Zhu et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs ont montré que BMI1 pouvait se lier au récepteur des androgènes afin de prévenir sa dégradation, induisant une signalisation soutenue dans les cellules du cancer de la prostate (S. Zhu et al., 2018).

Ces exemples illustrent l'implication des PcG en tant qu'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs dans de nombreux cancers (Parreno et al., 2022; Pasini & Di Croce, 2016). De très nombreuses publications font état de l'implication de telle ou telle sous-unité dans le processus

de tumorigénèse. Même si leur rôle dans la prolifération et la survie de tumeurs est largement décrit, le rôle et les mécanismes exactes de chaque sous-unité dans les différents cancers demandent encore à être élucidés.

II-4 PRC1 et PRC2 dans l'intestin

Dans l'intestin, une étude sur la souris a montré que PRC1 régule l'auto-renouvellement et la prolifération des ISC (Chiacchiera, Rossi, Jammula, Piunti, et al., 2016). Ils ont montré que PRC1 réprimait l'expression des ZIC, une famille de facteurs de transcription inactivant le complexe β -caténine/TCF, afin de maintenir la signalisation Wnt dans les ISC. Ils ont également montré que l'activité de PRC1 était essentielle à l'activité oncogénique de la β -caténine chez la souris : l'activation de la β -caténine associée à la perte de l'activité PRC1 dans les ISC inhibe complètement la capacité de la β -caténine à induire une hyperplasie épithéliale et la formation de tumeurs. A l'inverse, cette même équipe a montré que PRC2 n'était pas essentiel dans cette fonction pour les ISC. En effet, la perte d'EED (homologue de E(z), sous-unité catalytique du PRC2) entraîne une perte de H3K27me3 mais n'altère pas le profil H2AK119ub déposé par le PRC1 dans les cellules intestinales (remettre la référence). Ces résultats suggèrent que la perte de PRC2 n'affecte pas l'activité catalytique de PRC1 dans les ISC, et que le rôle de PRC1 est indépendant de l'activité de PRC2. Cependant, PRC2 possède tout de même un rôle dans d'autres cellules de l'intestin de mammifères. Les mêmes auteurs ont montré que PRC2 jouait un rôle crucial dans le processus de différenciation des progéniteurs (TA) (Chiacchiera, Rossi, Jammula, Zanotti, et al., 2016). Ils ont observé qu'en l'absence de PRC2, le nombre de cellules en goblet et entéroendocrines de la lignée sécrétrice doublait, indiquant que PRC2 restreint le programme de différenciation des TA afin de limiter la production de ces cellules. Ils ont montré que l'activité PRC2 était nécessaire pour maintenir la plasticité des cellules résidant au fond de la crypte après de graves dommages en réprimant Cdkn2a (« Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A ») et ainsi agir sur le cycle cellulaire. En revanche, dans une autre étude chez la souris de Koppens et al., PRC2 serait nécessaire au maintien des ISC Lgr5+ en favorisant le programme de prolifération. Cette divergence est notamment discutée dans une autre publication où il est montré que la perte de la marque H3K27me3 déposée par PRC2 se ferait par dilution au cours de la réplication (Jadhav et al., 2020). Malgré cette divergence, ils montrent également que PRC2 restreint la différenciation de la lignée sécrétrice (Koppens et al., 2016). Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces études

montrent que PRC1 et PRC2 sont importants dans la biologie des ISC par leur implication dans l'auto-renouvellement et la différenciation (Chiacchiera & Pasini, 2017; Koppens et al., 2016; Lèveillé & Vermeulen, 2016). En 2021, une étude du laboratoire de H. Jasper a montré chez la drosophile que des changements dans la détermination du lignage cellulaire qui se produisait avec le vieillissement impliquait les PcG (Tauc et al., 2021). En effet, dans les ISC de drosophiles âgées, les promoteurs des gènes cibles de Pc deviennent différentiellement accessibles, ce qui entraîne une expression accrue des gènes de spécification des cellules entéroendocrines (EE) au cours du vieillissement. En adéquation avec ces résultats, les auteurs ont observé des changements dans la composition cellulaire du tissu. Chez les drosophiles âgées, ils ont observé une augmentation du nombre de progéniteurs EEp et de cellules EE, ainsi qu'une accumulation de marque d'histone H3K27 méthylé, déposé par le PRC2. Les auteurs ont montré que la perte de fonction de Pc menait à la répression de l'expression des gènes nécessaire à la spécification de la lignée EE, et qu'une perte de fonction partielle permettait de contrer l'augmentation du nombre de cellules de la lignée EE ainsi que le développement de dysplasie au cours du vieillissement. Ils ont également montré que l'augmentation de la voie JNK favorisait la production de cellules de la lignée EE, également connue pour être impliqué dans la modulation de l'activité de Pc (N. Lee et al., 2005; Roumengous et al., 2017).

Cependant, le fonctionnement et les mécanismes exactes des PRC dans les cellules souches adultes comme les ISC sont encore mal compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes et de leur rôle dans le maintien de l'identité des ISC et le processus de différenciation permettra de mieux appréhender les processus pathologiques et de tumorigénèse dans lesquels ils sont impliqués. En effet, j'ai abordé l'implication des PcG dans le processus de tumorigénèse dans la partie précédente. L'intestin ne fait ainsi pas exception. Pour ne prendre qu'un exemple pour chaque complexe : la sous-unité EZH2 du PRC2 est surexprimée dans les cancers du côlon et est corrélée avec une baisse d'expression du suppresseur de tumeur p16, un atout majeur en faveur de la tumorigénèse (Ohuchi et al., 2018). Au sein du PRC1, BMI1 et MEL-18 contribuent chez la souris au développement de cancers associés à la colite hémorragique. Dans cet article, BMI1 et MEL-18 favorisent la prolifération et empêchent l'apoptose via la répression du gène *Reg3b*, un régulateur négatif de la voie JAK/STAT dans les cellules épithéliales du côlon (Xicheng Liu et al., 2017).

CHAPITRE III : Les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis*

III-1 Les pesticides

La famille des pesticides regroupe tous les agents à caractère biocide tels que les insecticides, les fongicides, les herbicides et les parasitocides (tuant respectivement les insectes, les champignons, les végétaux et les vers parasites). Face aux besoins alimentaires mondiaux croissants et à la demande de rentabilité des cultures, l'utilisation des pesticides a explosé au milieu du XXe siècle. La lutte contre les insectes ravageurs de ces cultures a toujours été un combat pour l'humanité dès lors qu'elle s'est mise à cultiver. En effet, même si l'usage du soufre et de l'arsenic comme insecticides remontent à mille ans avant notre ère, c'est en bénéficiant de la recherche sur les armes chimiques lors de la première guerre mondiale et des gaz de combat au cours de la seconde que les premiers pesticides de synthèses des familles des organochlorés et organophosphorés voient le jour. Parmi les plus utilisés, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) est un organochloré synthétisé dès 1874 dont les propriétés insecticides découvertes en 1939 ont permis sa commercialisation à partir de 1943. Le DDT deviendra l'insecticide le plus utilisé jusqu'à dans les années '70. Par la suite, apparaissent les insecticides de la famille des pyréthriinoïdes (tuant par choc neurotoxique sur simple contacte les insectes) et des néonicotinoïdes (agissant sur le système nerveux central) qui seront largement utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs. L'utilisation massive de ces substances durant plusieurs décennies a dramatiquement impacté l'écologie selon leur efficacité et le spectre d'action de leur toxicité plus ou moins étendu. Il s'est également avéré que ces produits persistaient dans les sols et dans l'environnement, soulevant le fait que leur impact négatif sur l'écologie persiste également parfois 50 ans après leur utilisation sur une parcelle. Plus largement, les pesticides chimiques ont fait l'objet de nombreuses études pour leurs impacts négatifs suspectés sur la santé humaine. En 2021, l'INSERM publie les résultats d'une expertise concluant d'une présomption forte du lien entre exposition professionnelle aux pesticides chimiques et maladies graves telles que des lymphomes non hodgkiniens, le myélome multiple, le cancer de la prostate, la maladie de Parkinson, les troubles cognitifs et la bronchopneumopathie chronique obstructive. Cette expertise conclura également d'une

présomption forte d'un lien entre l'exposition domestique de ces produits lors de la grossesse ou l'enfance et le développement de tumeurs du système nerveux central (<https://presse.inserm.fr/publication-de-lexpertise-collective-inserm-pesticides-et-effets-sur-la-sante-nouvelles-donnees/43303/>). Après avoir identifié des effets sur l'environnement et la santé, leur utilisation est donc remise en question. En France, le plan « Ecophyto II » vise à réduire leur utilisation de moitié d'ici 2025 (<https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>) (directive 2009/128/CE). Pour parvenir à cet objectif, des méthodes alternatives de protection des végétaux utilisant des mécanismes naturels ont vu le jour : c'est le biocontrôle. Parmi ces agents de biocontrôle, on distingue 4 catégories : les macro-organismes (tels que les coccinelles), les médiateurs chimiques (tels que les phéromones), les substances naturelles d'origines animales, végétales ou minérales (telles que le soufre), et les micro-organismes (tels que des bactéries).

Parmi la catégorie des micro-organismes, les spores de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) sont très largement utilisées comme bioinsecticide pour lutter contre les larves d'insectes qui ravagent les cultures (tomates, choux, salades, maïs...), les forêts (pins), mais également les nuisibles comme les moustiques (De Maagd et al., 2003). Sur l'année 2015, *Bt* représentait 32 000 tonnes de produit vendu le plaçant de ce fait en seconde position des produits insecticides les plus utilisés (chimiques et biologiques confondus) (Casida & Bryant, 2017). Le premier insecticide utilisé est le Chlorpyrifos, une molécule de la famille des organophosphorés (46 500 tonnes). Malgré l'absence de chiffres mondiaux plus récents, on peut imaginer que face aux incitations à réduire l'utilisation des pesticides chimiques en faveur des solutions de biocontrôle, l'utilisation de *Bt* ne cesse d'augmenter (*Bt* représentant 75% des bioinsecticides utilisés) (Sanchis, 2011).

III-2 Le genre *Bacillus* et ses nombreuses facettes

Bt appartient au genre *Bacillus*, une large population de bactéries en forme de bacille, Gram positif et aéro-anaérobie facultatives. Le genre *Bacillus* est composé d'espèces bactériennes mésophiles (condition moyenne de gradient sécheresse-humidité) avec une température optimale de croissance comprise entre 28°C et 35°C. Au sein du genre *Bacillus*, certaines souches sont utilisées comme **probiotique** (*B. coagulans* et *B. subtilis subtilis*), **biofongicide** (*B. pumilus*), **bionématicide** (*B. firmus*), et, nous venons de le voir, comme **bioinsecticide** pour la souche *B. thuringiensis* (**Fig. 14**) (Ehling-Schulz, Lereclus, et al., 2019; Owusu-Darko et al., 2020). En conditions défavorables (pH, nutriments...), le genre *Bacillus* a la particularité d'être capable de former des spores. Ces spores sont une forme très résistante de la bactérie lui permettant de patienter dans un état de dormance jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables. La bactérie peut ainsi attendre dans cet état latent plusieurs années, voire plusieurs décennies, avant de germer et de retourner à un état végétatif. Parmi le genre *Bacillus*, il existe un groupe d'espèces extrêmement proches les unes des autres connues pour être des pathogènes stricts ou opportunistes. Il s'agit du « groupe *cereus* » constitué de 8 espèces de *Bacillus* : *B. cereus* (*Bc*), *B. anthracis* (*Ba*), *B. thuringiensis* (*Bt*), *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* et plus récemment *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis* (Y. Liu et al., 2015). Ces espèces sont tellement proches génétiquement qu'il est parfois très difficile de les discriminer. Avec les nouvelles approches génomiques, la classification tend à évoluer si bien qu'il est mis sur la table que ces espèces seraient une seule et même espèce bactérienne. Ainsi, on fait référence aux bactéries de ces 8 espèces en utilisant le terme *B. cereus sensu lato* (Carroll et al., 2021; Ehling-Schulz, Lereclus, et al., 2019; Vilas-Bôas et al., 2007).

Sous forme végétative, certains *Bacillus* du groupe *cereus* peuvent produire et sécréter :

- Des **entérotoxines** : hémolytiques (Hbl), non hémolytiques (Nhe) et des cytotoxines (CytK), responsables de diarrhées, produites par *Bc* dont la plupart sont également retrouvées chez *Bt* (Gaviria Rivera et al., 2000).
- La toxine **cérealide**, responsable de nausées/vomissements, produites par *Bc*.
- Des toxines **Vip** (« vegetative insecticidal proteins ») et **Sip** (« secreted insecticidal proteins »), produites par *Bt* ayant des propriétés insecticides (Syed et al., 2020).
- Des **β-exotoxines** produites par *Bt* dont le mécanisme d'action est mal connu mais aurait une action sur les mammifères et les invertébrés (Palma et al., 2014)
- Les toxines de l'**Anthrax** produites par *Ba* et responsables de la « maladie du charbon ».

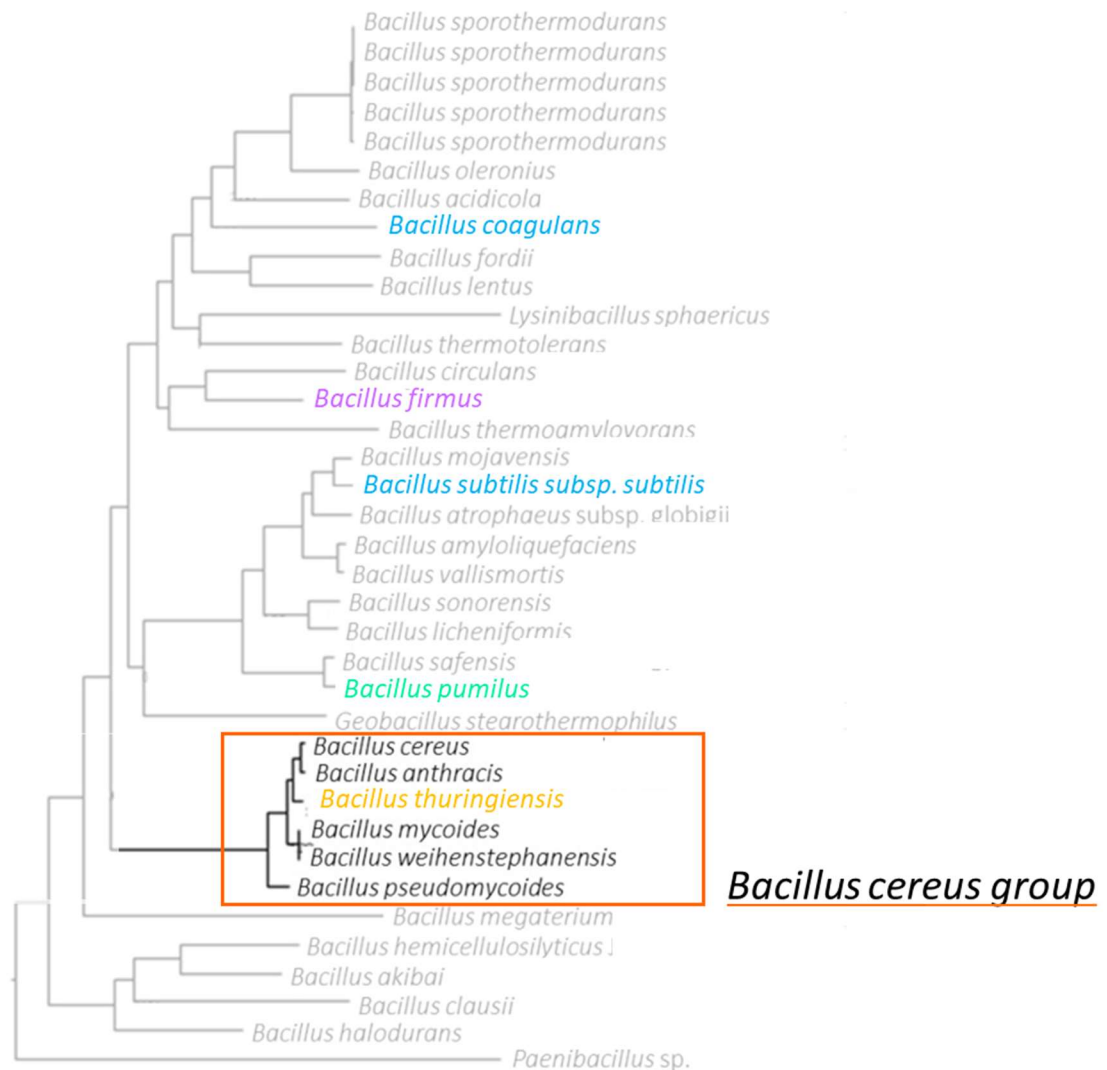


Figure 14: Phylogénie du genre *Bacillus*, adaptée de Owusu-Darko et al., 2020.

III-3 L'espèce *Bacillus thuringiensis*

Bt est comme la majorité des *Bacillus* une espèce saprophyte du sol (Martin & Travers, 1989; Vilas-Bôas et al., 2007). On la retrouve également sur les cadavres/excréments de certains insectes et parmi les feuillages des végétaux (Kaelin et al., 1994). Initialement isolé en 1901 chez une chenille du ver à soie (*Bombyx mori*) par Shigetane Ishiwata, c'est en 1911 que les propriétés entomopathogènes de *Bt* ont été découvertes par le biologiste allemand Ernst Berliner. *Bt* se distingue des autres membres du groupe *B. cereus sensu lato* par le fait qu'elle produise lors de la sporulation des δ -endotoxines, les protéines Cry (« Crystal toxins ») et les protéines Cyt (« Cytolytic toxins ») (Vilas-Bôas et al., 2007). Ces toxines protéiques s'accumulent et s'agrègent sous forme de cristaux dans des « inclusions parasporales » (Bel et al., 2020; Vilas-Bôas et al., 2007) (**Fig. 15**). Cette capacité particulière lui est attribuée grâce à un plasmide portant les gènes codant pour ces protéines Cry et Cyt (Ehling-Schulz, Lereclus, et al., 2019). Les toxines Cry sont les protéines conférant à *Bt* son pouvoir entomopathogène (Palma et al., 2014).

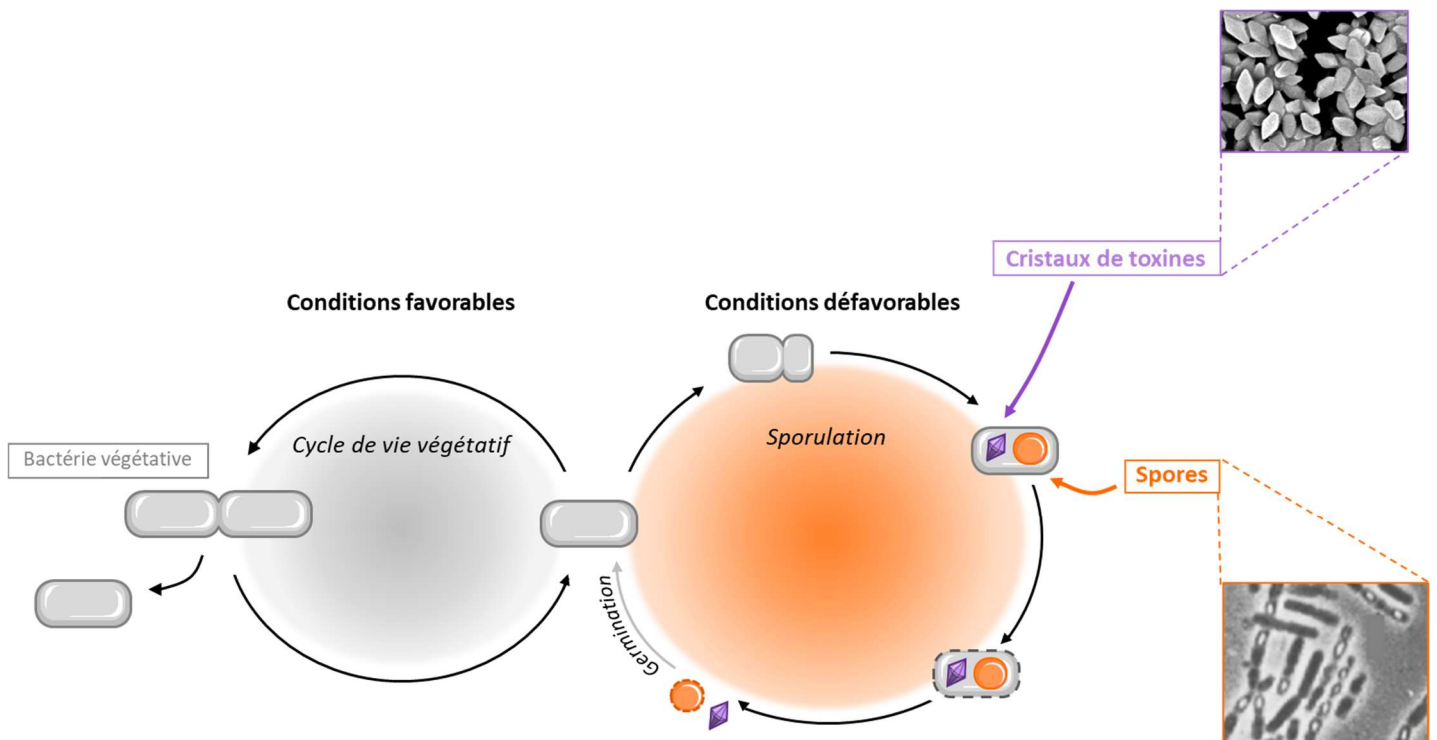


Figure 15: Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*.

En condition défavorable, la bactérie a recours au processus de sporulation durant lequel elle va produire des cristaux de toxines. Lorsque les conditions redeviennent favorables, la spore germe (c'est la germination) afin de revenir à une forme végétative lui permettant de proliférer.

Environ 700 protéines Cry ont été classifiées en 4 niveaux en fonction de leur similarité de séquence (Crickmore et al., 2021; Palma et al., 2014). Les protéines partageant au minimum 45% d'identité de séquence sont placées dans le même groupe (Cry1, Cry2 [...] Cry67). Au sein de ces groupes, des sous-groupes sont constitués avec les protéines partageant plus de 78% d'identité de séquences (Cry1A, Cry1B ...). Au sein de ce second niveau, les protéines partageant moins de 95% d'identité de séquence ont été séparées en un troisième niveau (Cry1Aa, Cry1Ab, ...) et un quatrième niveau a été imaginé regroupant les protéines avec des séquences partagées à plus de 95% d'identité (Cry1Aa1, Cry1Aa2, ...). Les toxines Cry sont produites sous forme de pro-toxines inactives (70 à 130 kDa selon les familles) qui doivent être clivées afin de former la toxine active (~60 kDa). La structure 3D la plus commune à la toxine activée implique 3 domaines (Grochulski et al., 1995; C. Xu et al., 2014) (**Fig. 16**).

- Le **domaine I** est constitué d'un « paquet » de 7 hélices α qui joue un rôle crucial pour la pénétration dans la membrane cellulaire et la formation de pores.
- Le **domaine II** est celui présentant le plus de diversité, certains proposant de ce fait qu'il soit impliqué dans la spécificité d'action des toxines Cry. Ce second domaine est arrangé en 3 feuillets β antiparallèles et 2 petites hélices α .
- Le **domaine III** est également constitué de feuillets β antiparallèles organisés tridimensionnellement en une sorte de « gâteau roulé » qui joue un rôle important dans la reconnaissance de composants spécifiques de certaines protéines, participant également à la reconnaissance et la spécificité d'action.

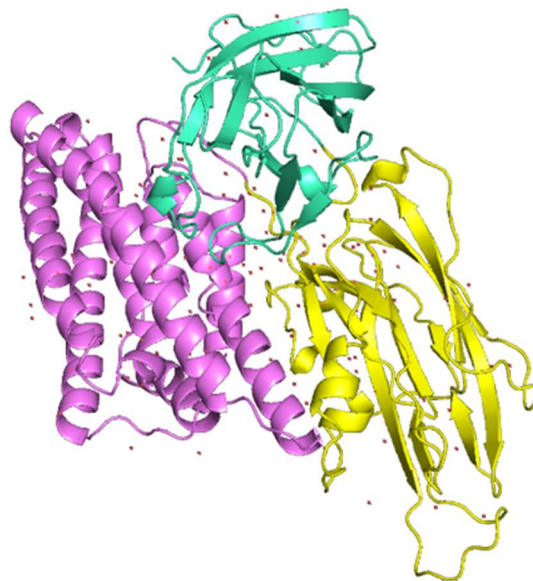


Figure 16: Structure 3D Cry1Aa (PDB 1CIY)

Les domaines I, II et III sont respectivement représentés en rose, en jaune et en vert.

Les vastes propriétés insecticides de *Bt* lui sont conférées par les différentes toxines Cry qu'elle est capable de produire (Palma et al., 2014). En effet, en fonction des toxines Cry codées et produites, les différentes sous-espèces de *Bt* auront une action insecticide ciblée de certaines espèces d'insectes (**Fig. 17**). Il existe une vingtaine de souches de *Bt* commercialisées. Enfin, les toxines Cry peuvent être produites directement par des plantes OGM, non commercialisées en France, mais autorisée dans l'alimentation en cas de denrées importées (www.isaaa.org).

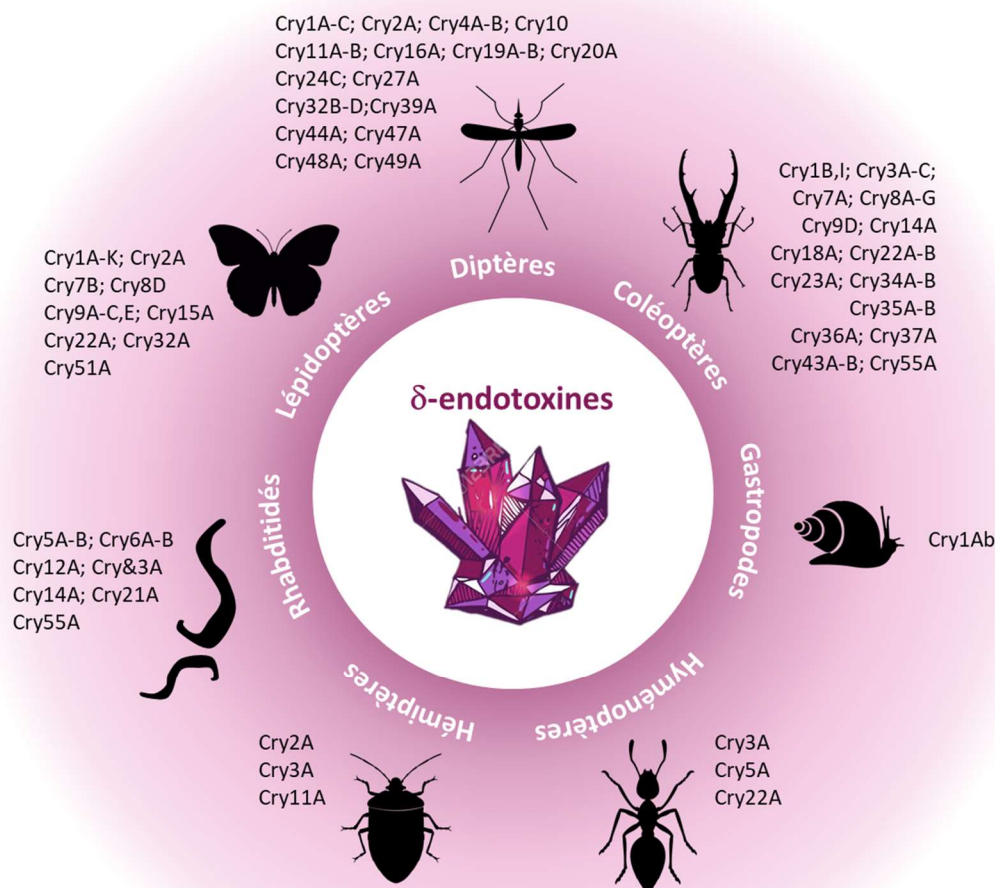


Figure 17: Diversité des toxines Cry et leurs cibles.

Vue résumée montrant le spectre d'hôte connu des δ -endotoxines Cry de *Bt*. Cry1A-C (séparés par un trait d'union) indique un groupe de toxines Cry1A, Cry1B et Cry1C. Cry1B, I (séparés par une virgule) indique différentes toxines Cry1B et Cry1I. Les points-virgules séparent les groupes ou les toxines individuelles.

III-3-1 Bioinsecticides *Bt* : mode d'action sur les insectes cibles

Les produits commerciaux de *Bt* sont commercialisés sous différentes marques telles que « DiPel[®] » (utilisé ici dans le cadre de ces travaux de doctorat) ou « Delfin[®] ». La composition exacte de ces produits commerciaux est difficile à déterminer, mais ils seraient principalement composés d'un mélange de spores et de cristaux (50% à 85% du produit), ainsi que d'adjuvants (tel que l'acide naphthalène-1-sulfonique, afin de favoriser la résistance, la dispersion et l'adhérence des spores et des toxines). Le produit dispersé est ingéré par la larve de lépidoptère et se retrouve ainsi dans le tube digestif (**Fig. 18**). La première étape est **(1)** la dissolution des cristaux de toxines grâce au pH alcalin de l'intestin de la larve. Les protéines Cry sous forme de pro-toxines sont ensuite clivées par les protéases de l'intestin pour libérer le domaine N-terminal (toxine active) du domaine C-terminal **(2)** avant de se lier sous leur forme active à des récepteurs spécifiques à la surface de l'épithélium intestinal **(3)**. Ces liaisons vont déstabiliser la monocouche cellulaire et former des pores dans l'épithélium **(4)**. En parallèle, grâce au pH adapté de l'intestin et les conditions nutritives favorables, les spores de *Bt* germent **(A)** et pénètrent, avec les bactéries du microbiote intestinal, dans la circulation systémique de la larve par le biais des trous formés par les toxines Cry **(B)**. Ainsi, les larves d'insectes cibles meurent par septicémie en 48h à 72h (Raymond et al., 2010; Soberón et al., 2009). Par leur capacité à former des pores dans l'épithélium, les toxines Cry sont qualifiées de « *pore forming toxins* ».

Malgré la recherche intensive sur le mode d'action des toxines de la famille Cry1A, le mode d'action et les cibles moléculaires précises des toxines Cry sur l'épithélium intestinal des insectes cibles est aujourd'hui encore débattu. De nombreuses zones d'ombres persistent face à la complexité et la diversité des modèles et des mécanismes que la communauté scientifique tente d'établir. Le modèle le plus largement documenté dans la littérature scientifique est celui de la formation de pore grâce à la « liaison séquentielle » des toxines Cry sur plusieurs récepteurs (Bravo et al., 2007, 2011). Dans ce modèle, les Cry1A sont reconnues chez les lépidoptères par au minimum deux récepteurs à la surface de l'épithélium. Il a été proposé que ces récepteurs interagissent séquentiellement avec les toxines Cry (Pacheco et al., 2009) par le biais d'interactions protéine-protéine et protéine-glycidique. Les toxines Cry se lieraient sous forme de monomères à un récepteur primaire, soit une aminopeptidase N (APN), soit une alcaline phosphatase (ALP), ancré à la membrane par des glyco-phosphatidylinositol (Bravo et

al., 2011). Cette première liaison permettrait une interaction avec le récepteur secondaire, des protéines de type cadhérines, induisant un clivage de l'hélice alpha-1 du domaine I de la toxine ayant pour but de favoriser une oligomérisation des toxines Cry (Gómez et al., 2002). C'est cette oligomérisation qui permettra à la toxine de s'insérer dans la membrane plasmique des cellules et provoquer leur lyse (Bravo et al., 2011; Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017; C. Xu et al., 2014) (**Fig. 18**).

Il existe un second modèle où l'activité cytotoxique des toxines Cry serait médiée par l'intermédiaire de signalisations intracellulaires. Dans ce modèle, les toxines se lient uniquement aux récepteurs de type cadhérine entraînant une signalisation Mg^{2+} et adénylate cyclase (*via* la protéine kinase A) dépendante (X. Zhang et al., 2005; Xuebin Zhang et al., 2006) afin d'induire la mort de la cellule par nécrose. Ainsi, les deux modèles ne sont pas exclusifs et il est envisageable que les deux mécanismes coexistent et participent à la toxicité des toxines Cry. Ainsi, les mécanismes de signalisation décrits dans le second modèle pourraient être déclenchés par des étapes de liaison séquentielles des toxines Cry telles que caractérisées dans le premier modèle agissant de pair dans la destruction de la cellule.

Quoiqu'il en soit, chaque modèle s'accorde sur le fait que la liaison des toxines Cry implique des récepteurs à la surface de l'épithélium intestinal, compromettant l'intégrité de l'épithélium avant qu'il soit rompu par la mort d'une cellule : c'est la formation d'un trou dans le tissu. Alors que les cadhérines, les ALP et les APN apparaissent fréquemment comme récepteurs candidats à la liaison des toxines Cry (Pigott & Ellar, 2007), d'autres récepteurs potentiels ont été proposés tels que les α -amylases et les α -glycosidases (Fernandez-Luna et al., 2010; Q. Zhang et al., 2013), la prohibitine (Kuadkitkan et al., 2012). Récemment une implication indéniable des transporteurs ABCC a été identifiée dans le mécanisme des toxines Cry. En effet, des mutations spontanées de ces transporteurs ont entraîné une résistance chez certains lépidoptères (Heckel, 2020). Cependant, il subsiste des zones d'ombres et/ou des désaccords sur le rôle et l'implication précise des multiples récepteurs putatifs identifiés pour chaque toxine Cry, ainsi que sur les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le mode d'action et la spécificité de ces toxines Cry.

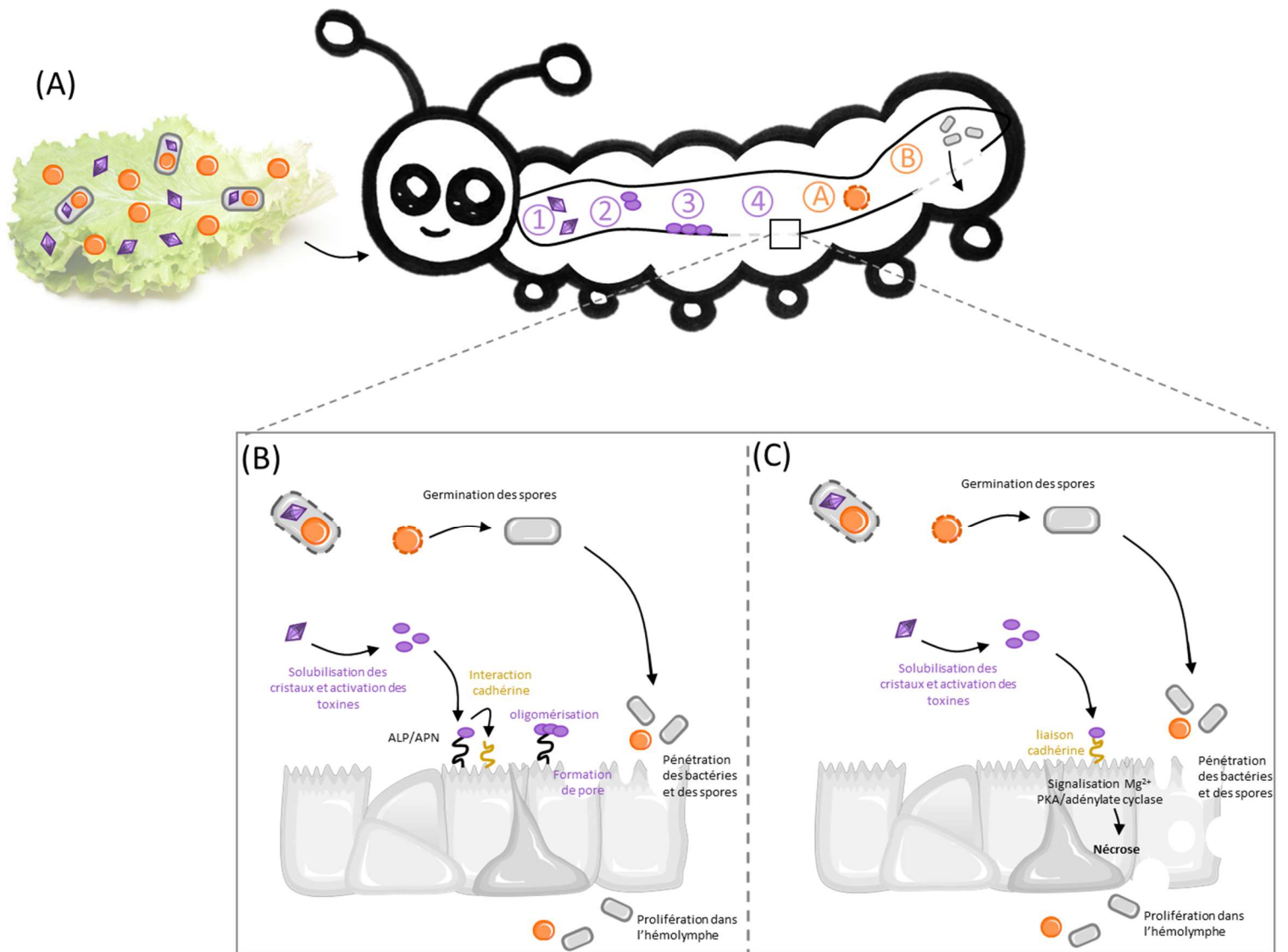


Figure 18: Modes d'actions des toxines Cry selon les modèles décrits dans la littérature.

En (A), mécanisme d'action dans l'intestin des larves d'insectes cibles. En (B) mécanisme moléculaire de la formation de pore selon le modèle Bravo. En (C) mécanisme moléculaire de la formation de pores selon le second modèle dit de « la signalisation intracellulaire ».

III-3-2 Conséquences de l'utilisation croissante de *Bt* comme bioinsecticide

III-3-2-1 Impact sur l'environnement

Parmi les bioinsecticides *Bt*, la souche *Btk* (*Bt* sous-espèce *kurstaki*) et la souche *Bti* (*Bt* sous-espèce *israelensis*) sont les deux plus commercialisées en France. Chacune produit un cocktail de toxines leur permettant de cibler respectivement les larves de lépidoptères et les larves d'insectes vecteurs de pathogènes (comme les moustiques).

- *Btk* est la souche la plus utilisée et produit les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab et Cry2Ac (Palma et al., 2014). Elle est utilisée en agriculture biologique pour lutter contre la destruction de culture par les larves de lépidoptères telles que les tomates, les choux, les laitues, le maïs etc... En 2020 en France, 12% des exploitations sont labellisées bio, représentant 2.550.000 ha (<https://agriculture.gouv.fr/infographie-agriculture-biologique><https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQO/Agriculture-Biologique>). Les spores de *Btk* sont également utilisées pour lutter contre les chenilles processionnaires du pin, un fléau du sud de la France. Les spores et cristaux de *Btk* sont ainsi répandus sur plus de 40.000 ha/an depuis le sol mais également par voie aérienne afin de recouvrir efficacement les épines de pins consommées par ces ravageurs.
- *Bti* produit les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa et Cry11Aa et est majoritairement utilisée en démoustication (Brühl et al., 2020). Il permet de lutter contre le moustique Tigre *Aedes albopictus* qui transmet la dengue et le chikungunya, mais également depuis 2006 contre le moustique du genre *Aedes* (non vecteur de maladies) pour lutter contre les nuisances dans certaines régions comme la Camargue (<https://www.senat.fr/questions/base/2013/qSEQ130405831.html>). Il est donc répandu dans les points d'eau et les larges étendues de ces régions.

Les cristaux de toxines Cry ont une demi-vie d'approximativement 1 semaine dans les champs, impliquant des traitements récurrents (T. P. Hung et al., 2016). En effet, espacés d'une semaine, c'est jusqu'à 8 traitements qui sont autorisées par l'Union Européenne (SANCO/1541/08 – rev. 4). A chaque traitement, c'est $1,17 \times 10^{13}$ UFC (spores capables de germer) qui sont dispersées par

hectares de terrain. L'augmentation année après année de la quantité et des usages de *Bt* dans la lutte insecticide mènent à une croissance de sa présence dans tous les compartiments que sont l'eau, l'air et les sols, exposant bon nombre de biotes initialement non exposés/peu exposés à *Bt*. En ce qui concerne la persistance de *Bt* dans l'environnement, il faut distinguer deux choses : la persistance des cristaux de toxines protéiques et la persistance des bactéries sous forme de spores.

La persistance des **protéines Cry** dépend fortement des conditions d'ensoleillement, de température, du pH et de la composition des sols en matière minérales et organiques, mais aussi de l'effet protecteur de certains adjuvants (T. P. Hung et al., 2016). La demi-vie de persistance des protéines Cry1A dans des conditions se rapprochant au plus de celles des champs est estimée à 9-10 jours. Concrètement moins de 20% des toxines sont ainsi retrouvées après 30 jours (T. P. Hung et al., 2016).

La persistance des **spores de *Bt*** dépend elle aussi grandement de l'environnement dans lequel elles se trouvent (Duchet et al., 2014). A l'état naturel, *Bt* se trouve majoritairement sous forme de spores. La forme végétative étant principalement retrouvée dans l'intestin des organismes cibles où elle prolifère. Une étude a montré que les spores de *Bti* étaient retrouvées aux doses d'épandages 10 semaines après traitement (Tilquin et al., 2008). En 2014, une étude a montré que les spores de *Btk* persistaient dans les forêts et que leur quantité diminuait à partir de 6 mois après le traitement pour disparaître après 1 an et demi (Konecka et al., 2014). Il a également été montré que des spores de *Btk* pouvaient être retrouvées plus de 4 ans après traitements dans certains environnements urbains (Van Cuyk et al., 2011). Alors que les spores de *Bt* paraissent sensibles aux UV (Griego & Spence, 1978), des études développent des méthodes pour protéger les spores de *Bt* de leur inactivation par les UV (Jalali et al., 2020). Ces méthodes, si elles sont utilisées à l'avenir favoriseront d'autant plus la persistance des spores de *Bt* dans l'environnement.

Il faut s'interroger sur le fait que malgré la nuisance de certains organismes sur la santé et le confort de l'homme ainsi que les cultures, ces mêmes organismes possèdent un rôle bien défini dans une chaîne alimentaire et une biodiversité à l'équilibre déjà bien fragile. Des impacts sur les larves d'amphibiens et des organismes non-cibles ont aussi été documentés (daphnies, odonates, araignées et hirondelles à travers leurs proies : moustiques et chironomes) (Lajmanovich et al., 2015). Il est donc important d'évaluer l'impact des produits commerciaux *Bt* sur la biodiversité afin de prendre les précautions adéquates pour éviter des catastrophes écologiques.

III-3-2-2 Effets non intentionnels sur les organismes non-cibles

Dans un premier temps, il faut garder à l'esprit que *Bt* est un pathogène opportuniste appartenant au *B. cereus group sensu lato* et donc extrêmement proche de *B. cereus (Bc)* et *B. anthracis (Ba)*, deux pathogènes notables pour les mammifères dont l'espèce humaine. Actuellement il n'existe pas de consensus dans la communauté scientifique qui permettrait de dire si ces espèces devraient être considérées séparément ou bien comme variants d'une même espèce (Carroll et al., 2020; Vilas-Bôas et al., 2007). En effet, malgré leur proximité génomique (la séquence du chromosome bactérien ne permettant pas de les discriminer (Ash et al., 1991; Helgason et al., 2000; Ivanova et al., 2003), les quelques différences phénotypiques permettant de les discriminer sont codées par leurs plasmides et sont les suivantes pour chaque espèce:

- **Ba** est l'agent responsable de la maladie infectieuse du « charbon » (ou anthrax). Il se distingue par sa capacité à former une capsule (enveloppe supplémentaire composée de glucides prodiguant une protection contre le système immunitaire et les antibiotiques).
- **Bt**, comme nous l'avons vu précédemment, se distingue par la production de cristaux de toxines Cry et Cyt lors de la sporulation.
- **Bc** ne possède aucune de ces deux caractéristiques et est le deuxième agent suspecté ou confirmé responsable de toxi-infections alimentaires en France après *Staphylococcus aureus* (ANSES - Saisine n°2016-SA-0075) (Santé Publique France – Novembre 2021), et le troisième en Europe (EFSA – 2018). Il peut provoquer des symptômes diarrhéiques à partir de 10⁵ UFC/g d'aliments (Kramer et al., 1982).

Compte tenu du fait que les bactéries puissent échanger du matériel génétique lors d'évènements de conjugaison, il a été montré que *Bt* était capable de transmettre à *Bc* ces propriétés phénotypiques par le biais de l'échange du plasmide codant pour ces spécificités (Gonzalez et al., 1982). On peut ainsi légitimement s'interroger sur l'éventuelle possibilité de transfert de matériel génétique entre *Ba* et *Bt/Bc*.

Il a également été montré que *Bt* était capable de produire les entérotoxines majeures associées aux intoxications alimentaires de type diarrhéique (Cyt2, NHE et HBL) (Damgaard et al., 1996; Gaviria Rivera et al., 2000; Jöhler et al., 2018a). Le caractère pathogène opportuniste de *Bt* n'est plus à démontrer. En effet, il s'avère que 8 à 20% des intoxications imputées à *Bc* se révélerait être en réalité causé par *Bt*, non identifié lors des tests qui ne recherchent pas la présence du plasmide ni de cristaux permettant de les discriminer (Biggel,

Etter, et al., 2022; Bonis et al., 2021). Une étude canadienne et une étude danoise ont détecté la présence de *Bt* dans des intoxications alimentaires et des aliments prêts pour la consommation (McIntyre et al., 2008; Rosenquist et al., 2005). Au vu des déclarations répétées de cas suspects, l'EFSA (« European Food Safety Authority ») a recommandé en 2016 de mener des recherches sur le risque potentiel que peut représenter l'utilisation des produits *Bt* pour la santé humaine (Allende et al., 2016).

Aucune toxicité aigüe de *Bt* semble avoir été rapportée sur différents mammifères (Raymond & Federici, 2017a). L'ANSES rapporte que la DL₅₀ (dose létale nécessaire pour tuer 50% de l'échantillon) par voie orale et cutanée chez le rat est supérieur à 5 000 mg/kg de poids du corps (ANSES - Saisine n° 2013-SA-0041), ce qui correspond à 5.10¹⁰ UFC/kg. Cependant la toxicité des toxines n'est pas nulle. Une étude a montré que l'inhalation des toxines purifiées présentait une toxicité pulmonaire chez le rat (Tsai et al., 2003). En ce qui concerne la bactérie : en utilisant la drosophile qui est un organisme non-cible, l'équipe dans laquelle je réalise mon doctorat a montré que l'ingestion de faibles doses de *Btk* (sous forme de bactéries végétatives) était suffisante pour lancer un programme de renouvellement cellulaire accéléré. En effet, la présence de faibles doses de la bactérie opportuniste permet l'induction modérée de la voie JNK, qui stimule la prolifération des cellules souches. Ils ont également montré que cela induisait une surpopulation d'EC dans l'intestin, et que l'homéostasie était restaurée grâce à une vague d'apoptose déclenché par le signalisation Hippo/Yki (Loudhaief et al., 2017). Plus récemment, l'équipe a observé des retards de développement chez les larves à des doses de *Btk* pouvant être rapidement atteintes dans les champs traités. Ils ont montré que ces défauts de développement sont provoqués par la mort des entérocytes altérant de ce fait la digestion des protéines (Nawrot-Esposito et al., 2020). Dans d'autres travaux en collaboration, ils ont montré en utilisant *Btk* et *Bti* que ces impacts n'étaient pas limités à *D. melanogaster*, en ayant obtenu des résultats similaires sur 8 espèces de drosophiles différentes (Babin et al., 2020). Par le biais de l'ensemble de ces travaux, mon équipe participe à montrer un effet de *Bt* sur les organismes non-cibles de type diptère. Il est intéressant de noter que le comportement de l'intestin et la réponse immunitaire vis-à-vis de spores de bactéries n'ont jusque-là jamais été étudiés et constituent également une thématique de l'équipe. De façon tout aussi intéressante, des quantités de *Bti* allant de 10² à 10³ UFC/g ont été retrouvées dans les excréments d'ouvriers travaillant dans des serres traitées au *Bti* (Jensen et al., 2002). Enfin, il a également été montré que les spores de *Btk* et *Bti* étaient capables de germer et de persister dans l'intestin chez le rat (Wilcks et al., 2006a).

Il est bien connu que la présence d'un pathogène dans l'intestin entraîne une réponse immunitaire inflammatoire, qui est bénéfique et qui permet de se débarrasser rapidement de l'intrus. Cependant il est également bien documenté qu'un contexte inflammatoire persistant représente un environnement favorable au développement de pathologies inflammatoires de l'intestin telles que les dysplasies, les MICI et les cancers. L'exemple le plus connu est celui de *Helicobacter pylori* et les cancers de l'estomac (Sobhani, 2004). *Bt* est un organisme pathogène opportuniste pour l'homme. Il est donc légitime de s'interroger sur le fait que sa présence répétée dans le tube digestif par le biais de l'alimentation pourrait potentiellement induire un tel contexte d'inflammation chronique, et de ce fait favoriser le développement de pathologies de l'intestin. Il devient donc crucial d'étudier les effets d'une ingestion chronique de *Bt* sur les individus non-cibles aux doses retrouvées sur les denrées alimentaires. La drosophile n'étant pas cible de la toxicité de *Bt*, elle est utilisée dans l'équipe comme modèle d'étude. Cette problématique a fait l'objet d'une revue en 2020 dans le journal Médecine/sciences ([ANNEXE III](#)).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux que j'ai réalisés se divisent en deux parties. Une première qui a été d'étudier le rôle des protéines PcG dans l'homéostasie intestinale, et une seconde partie qui a été d'évaluer l'impact des bioinsecticides *Bt* sur le développement de physiopathologies de l'intestin.

Rôle des protéines PcG dans l'homéostasie intestinale

L'intestin est un organe fabuleux chargé des fonctions de digestion et d'absorption. Ainsi, il doit faire face aux aliments, au microbiote, aux métabolites, aux agents pathogènes et aux produits chimiques, qui remettent quotidiennement en cause l'intégrité du tissu. Parce que l'épithélium intestinal est une monocouche, il doit lutter en permanence pour garder son intégrité et ses fonctions. Le meilleur atout permettant à l'épithélium intestinal de se maintenir est le support des cellules souches. Les cellules souches intestinales (ISC) sont des cellules précieuses permettant à l'épithélium intestinal de régénérer de nouvelles cellules différenciées pour remplacer celles qui sont endommagées, âgées ou mortes. Elles reçoivent des signaux de leur environnement et des cellules voisines pour adapter leur taux de prolifération et leur choix de différenciation. Ainsi, le comportement des ISC s'adapte aux besoins tissulaires en condition d'homéostasie ou de régénération. Afin de bien orchestrer tous ces signaux, une régulation fine et adaptée de l'expression des gènes est cruciale. Parmi les mécanismes régulateurs, les modifications post-traductionnelles des histones sont des processus clés pour former des domaines euchromatinien et hétérochromatinien, et ainsi contrôler respectivement l'activation ou la répression des gènes. En agissant ainsi, les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont des régulateurs épigénétiques bien connus qui assurent la compaction de la chromatine et l'organisation tridimensionnelle du génome. Les PcG et leurs mécanismes d'actions sont conservés des plantes aux mammifères et ont été identifiés pour la première fois dans le processus de développement. Plus tard, les PcG ont été décrits comme étant impliqués dans la régulation génique de divers processus, notamment dans la régulation des cellules souches adultes. Chez la drosophile, il a été montré dans les testicules et les ovaires que *Psc* et son

redondant fonctionnel *Su(z)2* du PRC1 agissent comme suppresseurs de tumeur dans les cellules souches somatiques (voir Introduction **I-3-1-1**)

L'objectif de ma thèse pour cette première partie est d'étudier le rôle des protéines PcG (en commençant par Psc et *Su(z)2*) dans la régulation d'autres cellules souches adultes somatiques, les ISC.

Impact de *Bt* sur le développement de physiopathologies de l'intestin

Face aux besoins alimentaires mondiaux croissants et à la demande de rentabilité des cultures, l'utilisation des pesticides a explosé au milieu du XXe siècle. L'utilisation massive de ces substances chimiques depuis plusieurs décennies a dramatiquement impacté l'écologie et la santé animale et humaine. Parmi les méthodes alternatives de lutte biologique, les spores de *Bt* sont largement utilisées comme bioinsecticide pour lutter contre les larves d'insectes ravageurs, et représentent les seconds produits insecticides (chimiques et biologiques combinés) les plus utilisés dans le monde (32 000 tonnes/an ; Casida and Bryant, 2017). Face aux incitations à réduire l'utilisation des pesticides chimiques, l'utilisation de spores de *Bt* continue de croître d'année en année, constituant une méthode de choix comme alternative aux insecticides chimiques, représentant 75% des bioinsecticides utilisés (Sanchis et al 2011). Les spores sont une forme très résistante de la bactérie leur permettant d'attendre, dans un état de dormance, que les conditions redeviennent favorables. Les produits commerciaux utilisés pour lutter contre les lépidoptères ravageurs de cultures comme le « Dipel ® », que nous utilisons au laboratoire, contiennent des bactéries sous formes de spores de la souche *Bt kurstaki* (*Btk*). Il faut garder à l'esprit que *Bt* est un pathogène opportuniste appartenant au *B. cereus group sensu lato* et est donc extrêmement proche de *Bc* et *Ba*, deux pathogènes notables en particulier pour l'espèce humaine. Le caractère pathogène opportuniste de *Bt* est controversé, mais de plus en plus d'études récentes suggèrent l'implication de *Bt* d'origine agricole dans les intoxications alimentaires collectives de type diarrhéique. En effet, il s'avère que 8 à 20% des intoxications alimentaires imputées à *Bc* se révélerait être en réalité causé par *Bt* (voir Introduction **III-3-2-2**). Aucune toxicité aigüe de *Bt* ne semble avoir été rapportée sur différents mammifères. Cependant, il est bien connu que la présence d'un pathogène dans l'intestin entraîne une réponse immunitaire inflammatoire et bénéfique dans le but d'éliminer rapidement l'intrus. Il est également bien documenté qu'un contexte inflammatoire persistant représente un

environnement favorable au développement de pathologies intestinales inflammatoires telles que la dysplasie, les MICI et les cancers. L'exemple le plus connu est celui d'*Helicobacter pylori* et des cancers de l'estomac. Avec toutes ces données, il apparait donc légitime de se demander si la présence répétée des spores de *Bt* dans le tube digestif *via* l'alimentation pourrait potentiellement induire un contexte inflammatoire délétère, et ainsi favoriser le développement de ce type de pathologies chroniques intestinales. Il devient donc crucial d'étudier les effets de l'ingestion chronique de spores de *Bt* sur des individus non-cibles de son action biocide, aux doses d'épandages.

L'objectif de ma thèse pour cette seconde partie est d'étudier l'impact des bioinsecticides *Btk* (commercialisés sous le produit « Dipel ® ») sur le développement de pathologies de l'intestin. La drosophile est un organisme non-cible de la toxicité de *Bt* et est utilisée dans le laboratoire pour étudier les effets de *Bt* et ses toxines sur l'intestin. Le premier point sera d'étudier cet impact sur des individus matures en « bonne santé ». Le second point sera d'étudier l'impact sur le développement de pathologies chez des individus prédisposés à développer des pathologies inflammatoires et des cancers de l'intestin.

PARTIE II : RESULTATS

CHAPITRE I : Rôle des protéines Polycomb dans l'homéostasie de l'intestin

I-1 Résumé

Socle de l'homéostasie, les ISC se divisent majoritairement de façon asymétrique afin de s'auto-renouveler et générer des cellules progénitrices, à un rythme qui s'adapte aux besoins de l'épithélium intestinal. L'intégration et le contrôle des signaux sont essentiels pour permettre aux ISC d'adapter leur taux de prolifération et leur mode de division, tout en conservant leur identité. Les protéines du groupe Polycomb (PcG) et leurs mécanismes sont très conservés du règne végétal jusqu'aux mammifères. Initialement décrites pour leur fonction de répresseurs transcriptionnels au cours des processus du développement, elles ont par la suite été révélées pour posséder des fonctions importantes dans d'autres processus, notamment récemment dans la régulation des cellules souches adultes. Cependant, leur rôle dans les ISC est peu relaté dans la littérature. Au cours de ma thèse, le travail effectué fourni la preuve que les PcG sont essentiels pour maintenir l'identité des ISC et qu'ils agissent comme suppresseurs de tumeurs dans ces cellules. L'absence de la régulation médiée par ces protéines dans les ISC induit des tumeurs néoplasiques qui perdent l'identité « cellules souches » et qui continuent de proliférer activement. Dans ce processus, j'ai investigué l'implication de chacune des sous-unités composant les complexes PcG principaux. J'ai également recherché quelles voies de signalisation pouvaient être dérégulées afin de mener à un tel phénotype inédit. Ainsi, ce travail révèle une implication cruciale des PcG dans la régulation des cellules souches adultes de l'intestin, et de ce fait dans l'homéostasie du tissu, par le contrôle et le maintien des cellules souches.

Polycomb group proteins maintain intestinal stem cell identity and act as tumor suppressor in the *Drosophila* gut

Aurélia Joly, Julie Soltys, Armel Gallet, Raphaël Rousset*

Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, France

* Correspondence: raphael.rousset@univ-cotedazur.fr

ABSTRACT

Intestinal stem cells (ISC) self-renew and generate progenitor cells at a rate that adapts to the needs of the gut. Integration and control of niche signals are key for ISC to choose their rate and mode of division, while maintaining their identity. Polycomb group proteins (PcG) have important functions in adult stem cells, but their role in ISC is only poorly understood. Here, we provide evidence that PcG are crucial to maintain ISC identity and their ability to generate cell lineages. Loss of function of core subunits of the Polycomb Repressive Complex (PRC) 1 (Psc/Su(z)2, Sce and Ph) and the catalytic subunit of PRC2 (E(z)) induce neoplastic cells that have lost stem cell identity and their cell junctions. No mitogenic signal usually found to stimulate ISC proliferation was detected in these cells, except for a strong activation of the JAK/STAT pathway. Our results demonstrate that PcG complexes act as tumor suppressor in ISC, highlighting a crucial implication in gut homeostasis through stem cell maintenance.

INTRODUCTION

Adult stem cells are undifferentiated cells of variable lifetime, more or less quiescent or proliferative, whose primary function is to replace tissue loss through cell division (Kalderon, 2022; Post & Clevers, 2019). They must therefore maintain the production of at least one differentiated cell type during the whole adult life, while conserving a minimal pool of stem cells. One of the most regenerative organs is the gut: most differentiated cells live only a few days in vertebrates, although turnover of the *Drosophila melanogaster* midgut may take three weeks (Antonello et al., 2015; Beumer & Clevers, 2021). This high turnover rate is indispensable to maintain its integrity and its various functions (digestive, absorptive, immune, endocrine), which are daily challenged by food, metabolites, microbiota, pathogens or chemicals. The major way by which the gut maintains homeostasis relies on the use of stem cells localized basally in the pseudo-stratified epithelium. Intestinal stem cells (ISC) allow the epithelium to generate new cells to replace those that are dead, damaged or aged, maintaining gut homeostasis while limiting the risk of developing bowel diseases.

In the *Drosophila* midgut, ISC mostly divide asymmetrically to self-renew and give rise to two types of progenitors: the enteroblasts (EB) and the enteroendocrine precursors (EEp) (Benoît Biteau & Jasper, 2014; Jun Chen et al., 2018; Z. Guo & Ohlstein, 2015; X. Zeng & Hou, 2015). EB differentiate into absorptive cells called enterocytes (EC) representing 80-90% of the epithelium composition, whereas EEp generate the secretory lineage with enteroendocrine cells (EE) (Beehler-Evans & Micchelli, 2015; Ji Chen et al., 2016; Tang et al., 2018). Under certain conditions, ISC can divide symmetrically to generate two ISC or two progenitors to adapt to the tissue needs (Joly and Rousset 2020). ISC proliferation and differentiation adjust to conditions of growth, homeostasis or regeneration through numerous signaling pathways (EGFR, Notch, JAK/STAT, JNK, Wg/Wnt, Dpp, Hippo) and molecules like integrins (Pasco et al., 2015; Vanuytsel et al., 2013). These mechanisms need to be finely regulated, as ISC deregulation is known to be at the origin of many intestinal dysfunctions and pathologies like cancers (van der Heijden & Vermeulen, 2019).

Polycomb group proteins (PcG) are epigenetic regulators controlling gene expression through chromatin compaction and three-dimensional genome organization (Schwartz & Cavalli, 2017). PcG and their mechanisms are conserved from plants to mammals and were first identified as regulators of gene expression in developmental processes (Schuettengruber et al., 2017). Thereafter, PcG were described to be implicated in various processes, notably stem cell regulation (Flora et al., 2021; Pasini et al., 2007; Sparmann & Van Lohuizen, 2006). PcG are

organized in multi-protein complexes, the main ones being the Polycomb Repressive Complexes (PRC) 1 and 2 which are in charge of post-transcriptional modifications of histones (Schuettengruber et al., 2017). PRC1 possesses an E3 ubiquitin ligase activity responsible for mono-ubiquitination of H2AK118 (K117 in mammals), whereas PRC2 trimethylates H3K27. In the canonical mechanism, sequential binding of the two complexes leads to propagation and maintenance of the Polycomb marks, PRC1-mediated chromatin compaction and transcriptional repression (Blackledge & Klose, 2021; S. Wang et al., 2021). *Drosophila* PRC2 is composed of four core proteins: the catalytic subunit Enhancer of zeste (E(z)), Suppressor of zeste 12 (Su(z)12), Extra sexcombs (Esc) and Chromatin assembly factor 1, p55 subunit (Caf1-55). Several other proteins can associate in a sub-stoichiometric way and interact with the components of PRC2 in order to stimulate its enzymatic activity. The core of *Drosophila* PRC1 complex is composed of the E3 ubiquitin ligase Sex combs extra (Sce/dRING) and Posterior sex combs (Psc) (Schuettengruber et al., 2017). From this core, various complexes can be formed: the canonical PRC1 composed of Sce, Psc, Polycomb (Pc), Polyhomeotic and Sex comb on midleg (Scm), and the non-canonical PRC1 (also called dRAF) composed of the core complex associated with Kdm2 protein (Barbour et al., 2020). Combinatorial interactions of the Polycomb complexes allow gene repression mechanisms to be adapted to specific cell fate decisions.

In adult *Drosophila*, Psc plays a redundant role with its functional paralog Suppressor of zeste 2 (Su(z)2), acting as tumor suppressors in somatic stem cells. Psc and Su(z)2 are necessary for maintenance of the cyst stem cells in the testis and follicular stem cells in the ovary, by preventing their proliferation in PRC1-independent manner (Xinghua Li et al., 2010; Morillo Prado et al., 2012b). Here we study the implication of PcG in ISC regulation. We show that Psc/Su(z)2 act through the activities of PRC1 and PRC2 to maintain ISC identity and their ability to generate differentiated cells. The tumor clones generated by PcG loss of function lack many of the signaling activities usually found in ISC, with the exception of JAK/STAT signaling. By maintaining ISC identity and proper ISC behavior (proliferation and differentiation), our results show that PcG are key players of *Drosophila* gut homeostasis

RESULTS

***Psc* and *Su(z)2* loss of function induces tumor clones from intestinal stem cells**

In order to assess the role of *Psc* and *Su(z)2* in ISC of the *Drosophila* midgut, we first tested RNAi-induced loss of function of both genes in progenitor, *esg*-positive, cells. Using the

esgGAL4^{ts}, *UAS-GFP* line and several *UAS-RNAi* lines, we observed a disorganization of the epithelium nuclei and clearly distinguished small nuclei clusters, mainly located in the posterior midgut and looking like tumor clones (Fig. 1A; Fig. S1A). We obtained the same phenotype using dominant negative forms of the two proteins (*Psc/Su(z)2* DDN “double dominant negative”) (Fig. S1A). Interestingly, larger clusters no longer express GFP, suggesting a progressive loss of *esgGAL4^{ts}* driver activity. To clearly follow the cells in which we induced *Psc/Su(z)2* loss of function, we used the flip/out system with the *esgF/O* line allowing the constitutive expression of GFP through the *actin* promoter after initial expression the flipase in *esg*-positive cells. This enabled us to observe large GFP tumors that are derived from progenitor cells and contain small nuclei (Fig. 1A; Fig. S1A). These observations show that *Psc/Su(z)2* loss of function in intestinal progenitor cells generates tumor clones.

Progenitors include several cell types: ISC, EB and EEp. To identify in which cell population *Psc/Su(z)2* act as tumor suppressor, we used specific drivers allowing the expression of *Psc/Su(z)2* RNAi in each cell type: *DiGAL4^{ts}* in ISC, *Su(H)GAL4^{ts}* in EB and *PiezoGAL4^{ts}* in EEp. With the *DiGAL4^{ts}*, *UAS-GFP* line, we observed the formation of tumors with small nuclei in the posterior midgut and a disappearance of *Di>GFP* cells, again suggesting a loss of driver activity (Fig. 1B). In contrast, loss of function in EB (*Su(H) GAL4^{ts}*, *UAS-GFP*) or EEp (*PiezoGAL4^{ts}*, *UAS-GFP*) does not exhibit this phenotype (Fig. 1B). Together, these results indicate that *Psc/Su(z)2* loss of function in ISC generates tumor clones.

In order to confirm these results, we used the MARCM system to generate homozygous mutant clones for both *Psc* and *Su(z)2* from the major dividing cells in the midgut, the ISCs. The two different double mutants for *Psc/Su(z)2* that we tested (*Psc/Su(z)2^{XL26}* and *Psc/Su(z)2^{1b8}*) generate tumors similar to those previously seen with RNAi experiments (Fig. 1C; Fig. S1A). Overall, our results suggest that *Psc/Su(z)2* act as tumor suppressor in ISC.

***Psc* and *Su(z)2* maintain stem cell identity and adherens junctions in ISC**

In order to characterize further the small nuclei-containing clones, we sought to determine the identity of the cells that are generated. In MARCM control clones, we observed the two typical absorptive and enteroendocrine lineages of ISC with large nucleus cells (DAPI and nuclear GFP labeled) corresponding to EC, and small nucleus cells (DAPI and anti-Pros stained) corresponding to EE (Fig. 1C; Fig. 2A). This testifies to the ISC ability to generate as expected all the differentiated cells composing the intestinal tissue. In *Psc/Su(z)2* MARCM mutant clones, we did not detect large nuclei or Pros-positive cells, indicating an absence of EC and

EE (Fig. 1C; Fig. 2A, B; Fig. S2B, F) Similarly, we did not observe Pros-positive cells using Psc/Su(z)2 DDN or RNAi-induced loss of function (Fig. S2B). Thus, *Psc/Su(z)2* loss of function induces the formation of tumor clones that are unable to generate differentiated cells (absorptive EC and secretory EE).

We have previously observed that *Psc/Su(z)2* loss of function results in loss of expression of the ISC drivers *esgGAL4* and *DIGAL4* (Fig. 1A, B; Fig. S1A), suggesting that the clones lose the ISC markers Esg and Dl and thus do not correspond to ISC-like tumors. Indeed, we did not observe anti-Dl staining in MARCM mutant clones or clones expressing the DDN forms (Fig. 2C, D; Fig. S2A, E). We confirmed this result using the *Delta.LacZ* reporter gene (Fig. S2A). Occasionally (in 2.2% of cases), we observed a cluster of two or three cells expressing *delta*, likely reflecting emerging clones that have not yet lost its expression (Fig. 2D). Together, these results support the fact that Dl expression is rapidly lost after clone formation. We also performed anti-PH3 staining to quantify the mitotic activity of mutant cells (using the DDN forms of Psc/Su(z)2 to obtain large clones), and detected an increase in division that reached a plateau at day 10 after clone induction (Fig. 2E, F; Fig. S2C). Our results show that *Psc/Su(z)2* loss of function generates mitotically active tumors that are derived from ISC but that subsequently lose stem cell identity.

Since tumorous features usually involve loss of adhesion with surrounding cells, we examined adherens junctions using anti-Armadillo/ β -Catenin immunostaining. In the *Drosophila* midgut, adherens junctions are localized on the basolateral side of the epithelium, and strong anti-Armadillo staining surrounds the ISC (Chen et al., 2018). In MARCM mutant clones, we systematically observed the absence of Armadillo staining (Fig. 2G, H). This means that, in addition to losing their identity, they also lose their adherence towards the surrounding epithelium, forming neoplastic tumors. Of note, using the Psc/Su(z)2 DDN or RNAi, the Armadillo staining loss is not systematic and is not related to the size of the tumor cluster, which may reflect an incomplete inhibition of Psc/Su(z)2 function (Fig. S2D).

Psc and Su(z)2 act redundantly through the core PRC1 and the catalytic activity of PRC2

First, we sought to determine whether or not *Psc* and *Su(z)2* act redundantly in ISC to maintain stem cell identity. Using both RNAi and the MARCM system, loss of function of only one of the two genes does not lead to the formation of tumor clusters (Fig. S1B-E). Indeed, *Psc* or *Su(z)2* RNAi shows no phenotype, as the single MARCM clones harbor Dl-positive ISC and

generate differentiated cells (large nucleus EC and Pros-expressing EE) (Fig. S1C-E). These results thus reveal a redundancy in the function of *Psc* and *Su(z)2* in ISC.

As *Psc* and *Su(z)2* are part of the PRC1 complex, we tested whether the other subunits *Sc*, *Ph*, *Pc*, *Scm* might be implicated in this tumor suppressor function in ISC. Using RNAi with *esgGAL4^{ts}, UAS-GFP*, we observed that loss of function of the catalytic subunit *Sc* induces the same tumorous phenotype, accompanied by a loss of GFP expression (Fig. 3A). This means that the core of the PRC1 complex, composed of *Psc/Su(z)2* and *Sc*, is implicated in this function. *ph* loss of function led to the same phenotype, in contrast to *Pc* or *Scm* loss of function (Fig. 3A). *Pc* is a crucial member of canonical PRC1, and *Scm* is a sub-stoichiometric subunit of this complex, ruling out a role of canonical PRC1. To test known subunits of non-canonical variants of PRC1, we analyzed loss of function of *RYBP* and *Kdm2*. We did not observe any phenotype, indicating that the PRC1 variants containing these proteins are not involved in the PcG-mediated tumor suppressor function in ISC (Fig. 3B). Thus, our results indicate that the core PRC1 made of the *Psc/Su(z)2*, *Sc* and *Ph* subunits is responsible for ISC maintenance.

Finally, we tested if PRC2 might be implicated. Whereas *Su(z)12* loss of function did not have an effect, loss of function of the catalytic subunit *E(z)* induced neoplastic tumors (Fig. 3C). All Together, our results demonstrate that the subunits *Psc/Su(z)2*, *Sc* and *Ph* of PRC1 and the catalytic subunit *E(z)* of PRC2 act in coordination as tumor suppressor in ISC.

Tumor clones exhibit strong JAK/STAT activity

We next wanted to identify the signals that are deregulated in the neoplastic tumors. We tested several signaling pathways that are known to be active in the midgut during homeostasis or regeneration: ERK, Notch, JNK, JAK/STAT, BMP/Dpp, Wg/Wnt and Hippo (Fig. 4; Fig. S4). To do this, we generated *Psc/Su(z)2* mutant clones with the MARCM system and used different specific markers (antibodies or reporter genes). Using pERK42/44 antibody, we were not able to detect any ERK signaling in tumor clones (Fig. S4A). This result means that EGFR and insulin-like signaling passing through ERK signaling are not mitogenic signal involved in tumor clone formation. Using the transcriptional reporter of Notch activity, *Su(H)GBE.LacZ* (*Suppressor of Hairless and Grainyhead Binding Elements*), we did not observe any Notch activity in tumor clones (Fig. S4A). Thus, in addition to not expressing the Delta ligand (Fig. 2C, D; Fig. S2A, E), tumor cells do not exhibit Notch signaling. Using the pMad antibody, we investigated if the transcription factors of Dpp/BMP signaling were activated. We detected pMad staining in the large nucleus cells (EC) surrounding the clones, reflecting that BMP

signaling is active in differentiated cells as described previously (Aiguo Tian & Jiang, 2014). We also observed pMad activity in tumor clones, but noticed that the staining was not consistent in all tumor clones. To investigate if this signal is important for tumor clone formation, we down-regulated the Dpp/BMP pathway by expressing the repressor Brinker in MARCM clones, and observed no impact (Fig. S4B). This result means that although activated in tumor clones, Dpp/BMP signaling has no role in their formation and progression. In absence of Hippo signaling, the transcription factor Yki enters the nucleus to activate the transcription of target genes, including genes involved in ISC proliferation (*myc*, *cycE*, *bantam*) and cell survival (*diap1*). We used the *diap1.LacZ* reporter gene to evaluate Hippo signaling and we did not observe activity in tumor clones, testifying of the absence of Yki-dependent transcription (Fig. S4A). We then used the *naked (nkd).LacZ* reporter gene to investigate if the Wg/Wnt pathway is activated in tumor cells as a mitogenic signal. We did not observe any specific *nkd.LacZ* expression, indicating that tumor proliferation is not due to Wg/Wnt activity (Fig. S4A). To investigate the implication of JNK signaling, we used the *puc^{E69}.LacZ* reporter gene and detected staining in the *Psc/Su(z)2* tumor clones (Fig. S4A). Interestingly, we did not observe any JNK activity in wild-type small nuclei surrounding the clones (Fig. S4A). This observation means that JNK is activated in MARCM clones, but not in wild-type ISC. However, we observed no impact on clone formation when we over-activated (*UAS-hep^{4E}*) or down-regulated (*UAS-puc^{2A}*) the pathway (Fig. S4B). These results indicate that JNK activity in tumor clones has no role in their formation and progression. Finally, we tested JAK/STAT activation with the *10XSTAT92E>GFP* reporter gene (Fig. 4). We could not use the MARCM system, as clones are already marked by GFP. Instead, we used the *esgGAL4^{ts}* driver (without GFP) to express the DDN forms of Psc/Su(z)2 proteins or the *Psc/Su(z)2* RNAi. Interestingly, we detected a consistent and strong activation of the JAK/STAT pathway in the tumor clusters (Fig. 4). Therefore, our results show that JAK/STAT signaling could be the mitogenic signal that triggers Psc/Su(z)2 tumor formation. To validate these results, it will be necessary to inhibit JAK/STAT signaling in the tumor clones and evaluate their formation. To do so, we are in the process of expressing in the MARCM system a dominant negative form of the Dome receptor or RNAi against the STAT transcription factor STAT92E.

Discussion: see the discussion part in the thesis manuscript (PARTIE III : DISCUSSION page 154)

MATERIELS AND METHODS

Reagents and resources

Antibodies

Armadillo (DSHB #N2 7A1-s) 1:25; Phospho-Histone 3 (Cell signaling 9701S) 1:500; Prospero (DSHB #MR1A-c) 1:200; Delta (DSHB #C594.9B-c) 1:2000; pMad is pSmad3 S423/425 [EP823Y] (abcam ab52903) 1:300; β Galactosidase (Gentex GTX77365) 1:1000; pERK42/44 (Cell signaling #9101) 1:200 ; Alexa-546 anti-mouse 1:400; Alexa-647 anti-Rabbit 1:400; Alexa-546 anti-chicken 1:1000.

Chemical and consumables

PBS-10X (Euromedex #ET330)

Triton- X-100 (Sigma #T9284)

16% Formaldehyde solution Methanol-free (ThermoScientific #28900)

Fluoroshield™ DAPI medium (SIGMA #F6057-20mL)

Elastase from porcine pancreas (SIGMA # E7885-5MG)

PluriStrainer Mini 40 μ m (PluriSelect #43-100040-40)

Glycérol (SIGMA #G5516)

Drosophila Strains

WT Canton S (Bloomington #64349)

w; esg-GAL4^{NP5130} UAS-GFP; tubGAL80ts (Apidianakis et al., 2009)

esg-Gal4, tub-Gal80ts, UAS-GFP; UAS-Flp, Act > CD2 > Gal4 (esgF/O) (gift of Bruno Lemaitre's laboratory)

w; tub-GAL80ts; D1-GAL4 UAS-GFP/TM6b (Jneid et al.)

w; Su(H)GBE-GAL4/SM6 β ; tub-GAL80ts UAS-GFP/TM6b (Jneid et al.)

w; UAS-GFP, Piezo-GAL4[KI]; tubP-GAL80ts (Bloomington #78337)

w; UAS-Psc.N1.Myc, UAS-Su(z)2.N1.Myc/CyO (UAS-PscDN&Su(z)2DN/CyO) (Bloomington #68225)

UAS-RNAi Ph (VDRC #50028 & #10679)

UAS-RNAi Pc (Bloomington #33622)

UAS-RNAi Sce (Bloomington #31612 & #35446)

UAS-RNAi Scm (Bloomington #55278)

UAS-RNAi Kdm2 (Bloomington #33699)

UAS-RNAi RYBP (Bloomington #33974)

UAS-RNAi E(z) (Bloomington #33659)
UAS-RNAi Su(z)12 (Bloomington #33402)
UAS-RNAi Psc/Su(z)2 #44 & 78 (*Psc* RNAi from Bloomington #38261 and *Su(z)2* RNAi from VDRC #100096; gift of Giacomo Cavalli's laboratory)
UAS-RNAi STAT92E (VDRC #106980)
UAS Dome Δcyt3-2 (Loudhaief et al., 2017)
hs-FLP, tub-GAL4, UAS-GFP/FM; FRT42D, tub-GAL80/CyO (MARCM FRT42D) (Yin and Xi, 2018)
w; FRT42D, Psc-Su(z)2 XL26 / Cyo (Li et al., 2010)
FRT42D Psc-Su(z)2 1.b8/CyO (gift from Giacomo Cavalli's laboratory)
w; FRT42D Psc e24/CyO (gift from Giacomo Cavalli's laboratory)
y w FRT42D Su(z)2[1.b7]/T(23)TSTL14, SM5: TM6B, Tb[1] (Bloomington #24156)
UAS hep^{4E} (Rousset et al., 2010)
UAS-puc^{2A} (Rousset et al., 2010)
UAS-brk (gift from Stephane Vincent)
10XStat92E-GFP (Bloomington #26198)
nkd.LacZ (Bloomington #25111)
Delta.LacZ (Bloomington #11651)
Su(H)GBE.LacZ (gift from Julien Colombani)
diap.LacZ (Loudhaief et al., 2017)

Software and algorithms

FIJI/ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>) (J. Schindelin et al. 2012); R (The R project <https://www.r-project.org>); Krita (<https://krita.org/fr>).

Experimental methods

Drosophila genetics

All *Drosophila* stocks are raised at 25°C on standard medium (0.8% Agar, 2.5% sugar, 8% corn flour, 2% yeast) with a 12h light/12h dark cycle. For transgene expression using the Gal4/Gal80^{ts} system, mating experiments were maintained at the permissive temperature for Gal80 protein (18°C). Flies with the desired genotype were collected within 4 days after hatching and aged for 3-7 days before the temperature shift to 29°C to induce transgene expression. Adult midguts were dissected after different times indicated for each experiment.

For the MARCM system, young flies of 3-7 days were heat-shocked at 37°C during 45 min three times within a period of 1,5 day and maintained at 25°C during 14 days before midgut dissections.

Dissection, immunohistochemistry and microscopy

Dissections and immunostainings were performed as described by Micchelli (2014) using mouse anti-Prospero at 1:200, rabbit anti-PH3 at 1:500, mouse anti-Arm at 1:200, Alexa-546 anti-mouse at 1:500 and Alexa-647 anti-Rabbit at 1:500. For Delta staining, we used the protocol previously described (ref Allison J. Bardin (2010)) using the mouse anti-Delta at 1:2500 with Alexa-546 anti-mouse at 1:500. Samples were mounted with DAPI-containing Fluoroshield™ medium.

Quantifications and statistics

Image Capture and Processing

All the pictures and data presented were always performed from R4-R5 posterior midgut (see Buchon et al. 2013) with the Zeiss Axioplan Z1 microscope (with Apotome 2 module) at 20x objective. FIJI/ImageJ and Krita software were used for image analysis.

Measurement of Cell Number

Mitotic indices were determined by manually counting PH3 positive cells in the whole gut. Statistical analysis of all the “PH3 positive cells” counts was performed using Kruskal and Wallis with Wolcoxon post-hoc test.

The presence of differentiated cells in clones was evaluated by counting the number of clones containing at least one Prospero-positive cell (from enteroendocrine lineage) and/or one big nuclei specific from polyploid enterocytes (from absorptive lineage). Statistical analysis of all the “differentiated cells containing clone” counts was performed using Chi² test.

The same way, the presence of stem cells in clones was evaluated by counting the number of clones containing at least one Delta-positive cell. Statistical analysis of all the “Delta positive cells containing clones” counts was performed using Chi² test.

Measurement of Fluorescent Signals

Armadillo staining quantification was performed with FIJI/ImageJ. From 2 independent experiments, n=10 guts were analyzed. In each gut, 1 to 9 measures were made. Clones derived from mutant ISC were selected manually, and fluorescence mean intensity measured with FIJI/ImageJ. A wild-type zone in the same tissue was selected randomly to compare mean

intensity of fluorescence in the clones with non-mutant tissue in the same gut/image. A total of 30 measures for each condition (mutant MARCM clone and wild-type zone) was performed. In the boxplot presented in Fig. 2, each dot represents a fluorescent mean intensity for 1 quantified zone.

Statistics

For all experiments, flies were first selected by genotype and then randomly chosen for experimental analysis. All experiments were independently repeated at least 2-5 times. All statistical tests were performed with R software. The tests used for each experiment are described above in “Measurement of Cell Number” and “Measurement of Fluorescent Signals”. The total number of analyzed guts (“*n*”) and the exact P-value are indicated in the legend of each figure.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Bruno Lemaitre, Anne-Marie Martinez, Frédéric Bantignies, Stéphane Vincent, Julien Colombani, the Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC; NIH P40OD018537), the Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) and the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) for fly stocks and reagents. We acknowledge Olivier Pierre from the imagery platform of our institute Sophia Agrobiotech for his assistance. We thank all the members of our lab for insightful discussions. A.J. is supported by the “Ligue nationale contre le cancer” (LNCC doctoral grant 2018) and the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (ARCDOC42021020003051). R.R. and A.G. are supported by the “Centre national de la recherche scientifique” (CNRS). Our projects are funded by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (20171206145) and by the PNR-EST ANSES & ECOPHYTO II (2017). We also received support from the French government, through the UCAJEDI Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR) with the reference number ANR-15-IDEX-01.

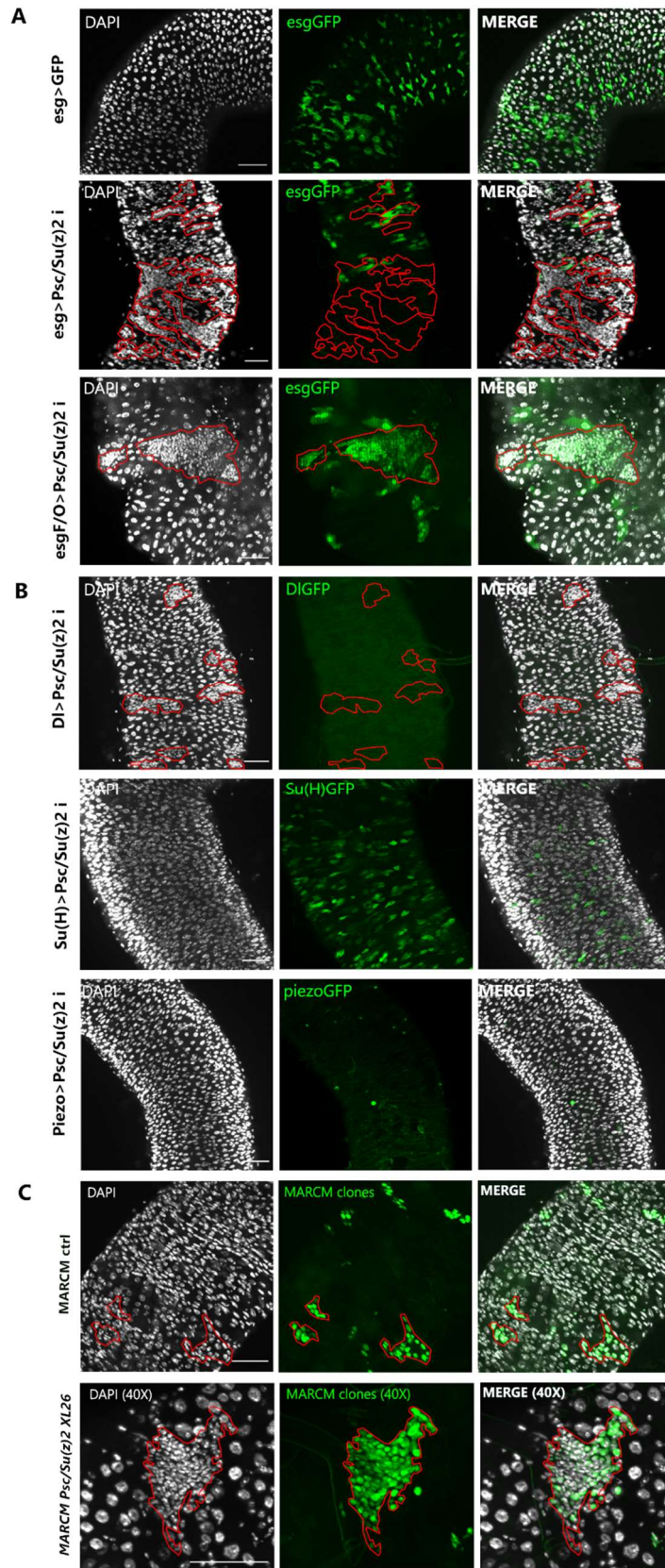


Figure 1

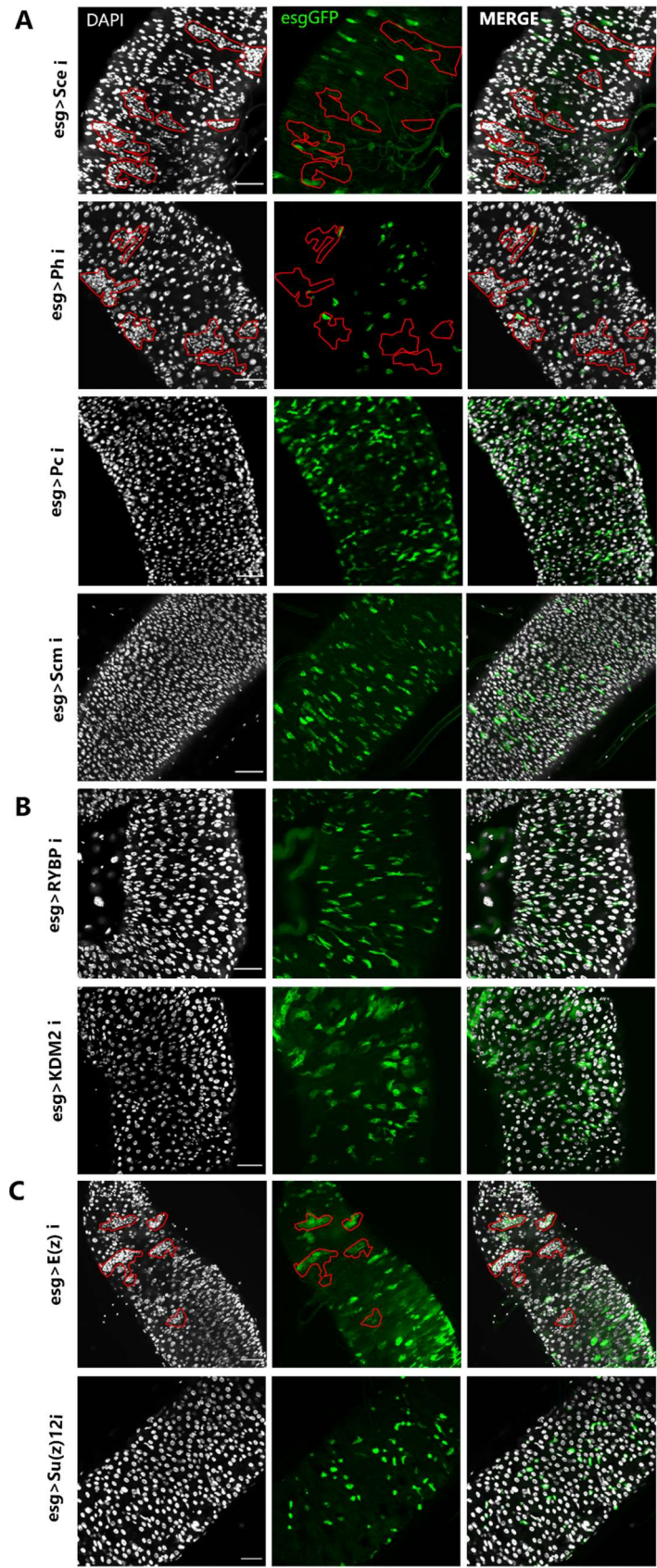


Figure 3

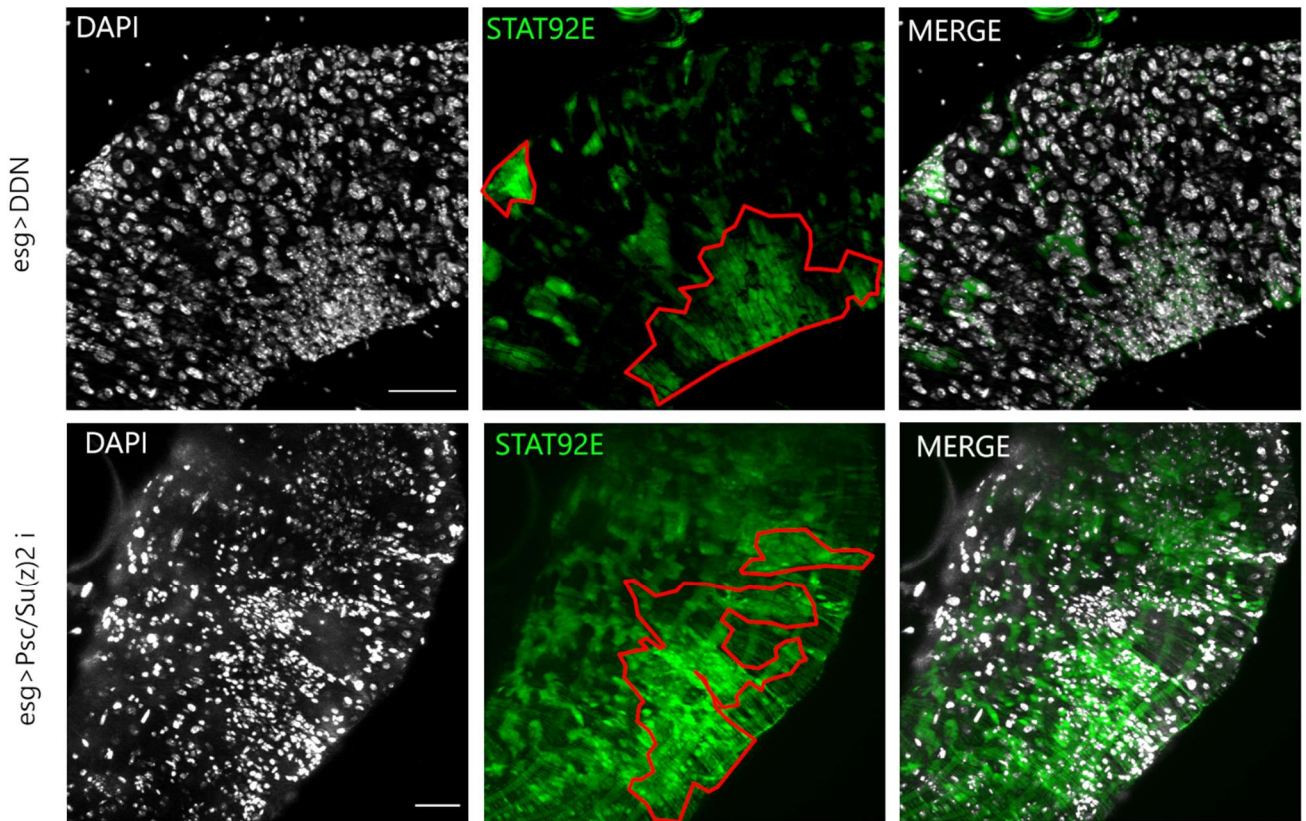
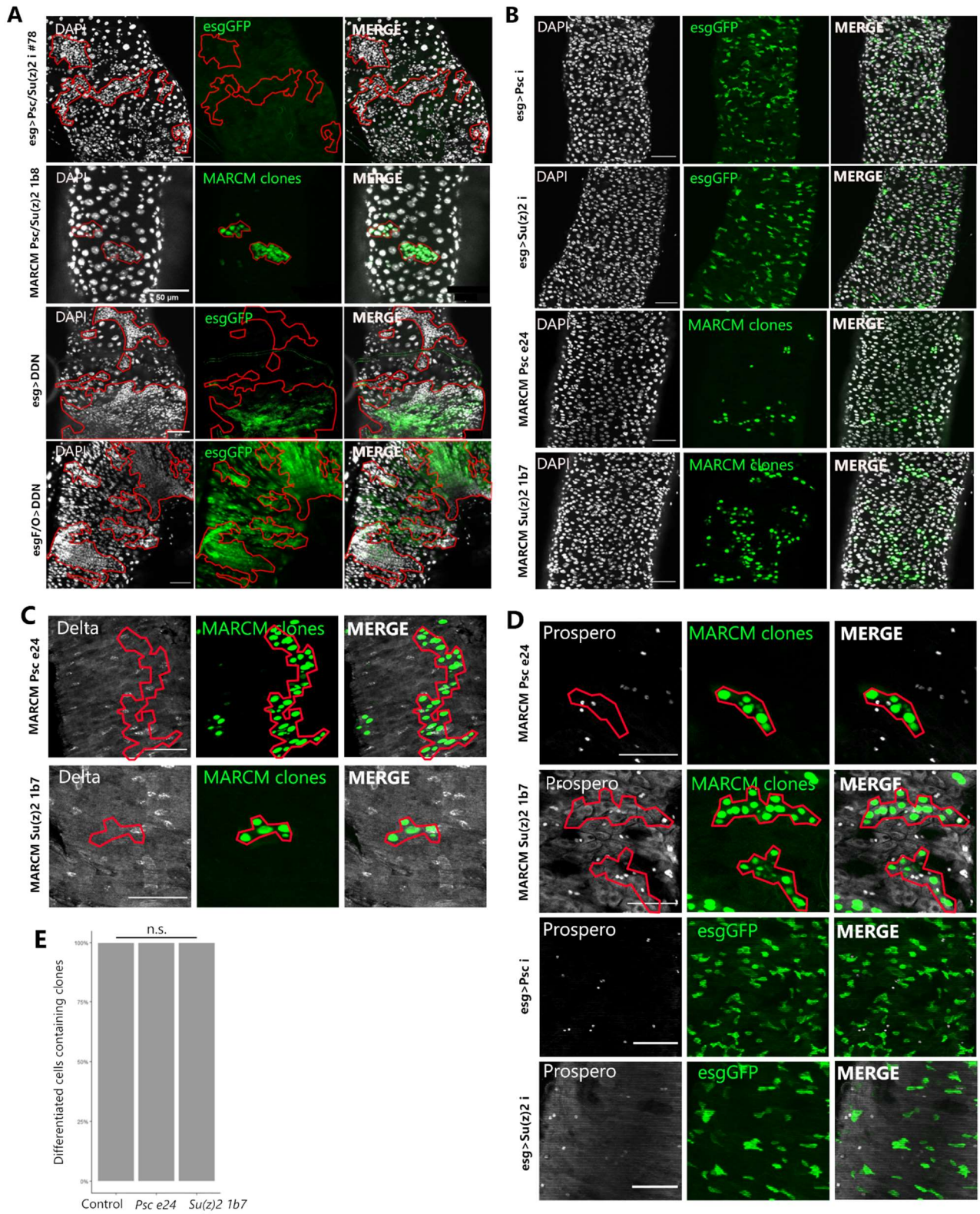
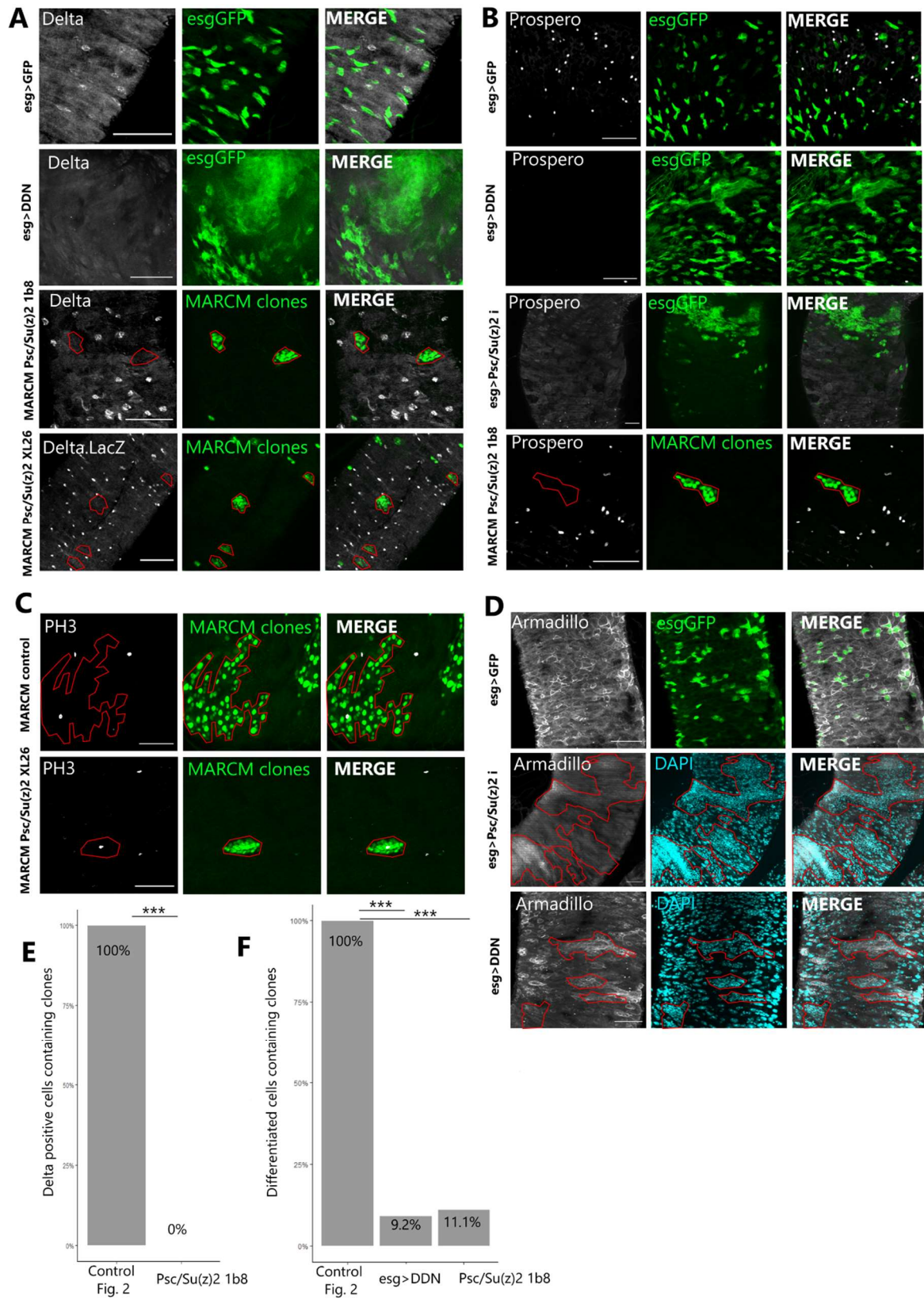


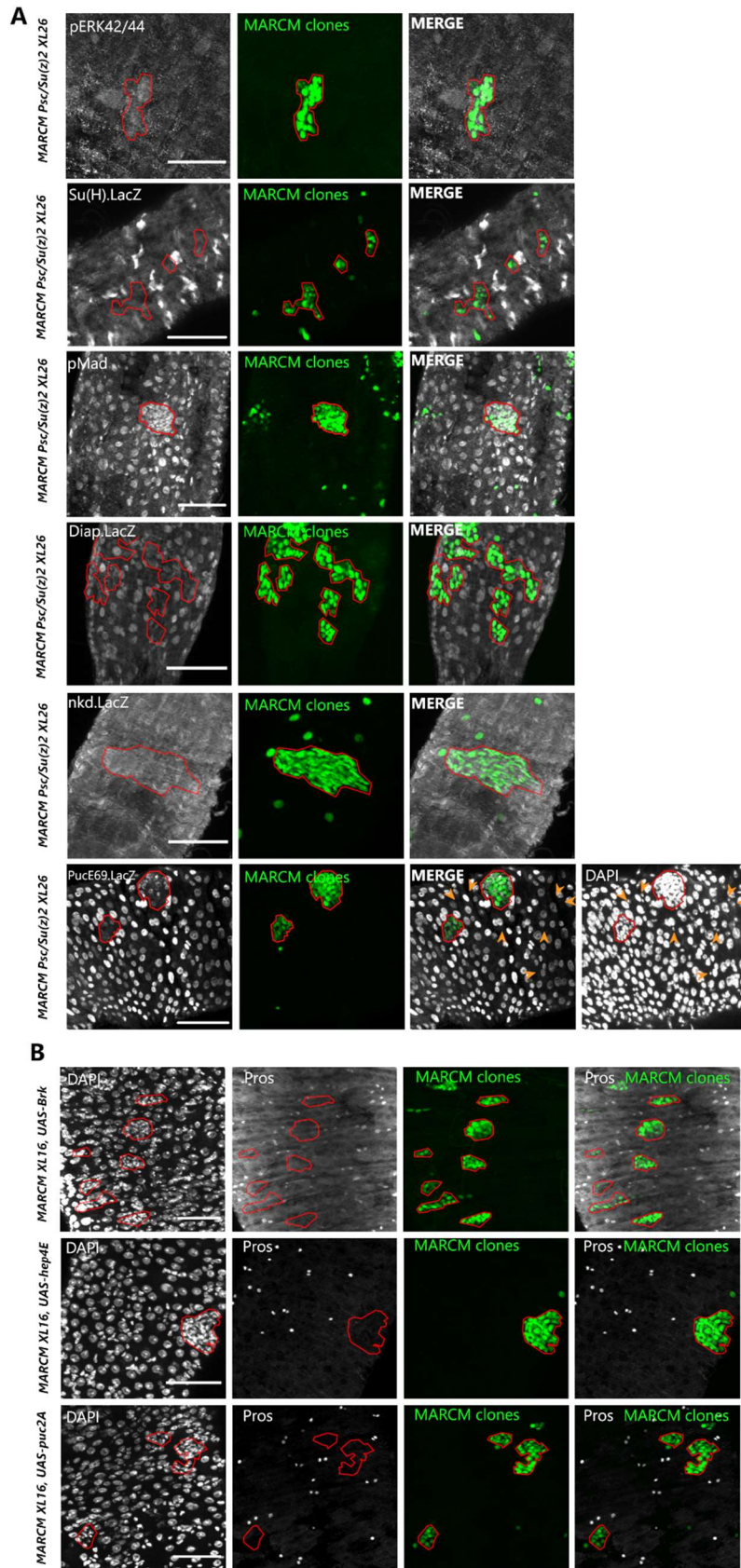
Figure 4



Supplemental S1



Supplemental S2



Supplemental S3

Pathway	Tool	Result	Comment
EGFR / IIS	pERK42/44 (antibody)	-	No pERK signaling
Notch	<i>Su(H).LacZ</i> (reporter gene)	-	No Notch activity
BMP/Dpp	pMad (antibody)	+	pMad signaling in clone (inconsistent)
	<i>UAS.brk</i> (to repress BMP activity)		Tumor clone
Hippo/Yki	<i>diap.LacZ</i> (reporter gene)	-	No Yki activity
JNK	<i>puc^{E69}.LacZ</i> (reporter gene)	+	JNK activity in clones
	<i>UAS.puc^{2A}</i> (to repress JNK activity)		Tumor clone
	<i>UAS.hep^{4E}</i> (to stimulate JNK activity)		Tumor clone
JAK/STAT	<i>10XSTAT92E>GFP</i> (reporter gene)	+	Strong JAK/STAT activity
Wnt/Wg	<i>nkd.LacZ</i> (reporter gene)	-	No Wg activity

TABLE 1

Figure legends

Figure 1. *Psc* and *Su(z)2* loss of function induces tumor clones from intestinal stem cells

A. *esg*-positive cells expressing GFP alone (control; upper panel) and together with *Psc/Su(z)2ⁱ* (mid panel). *Psc/Su(z)2* RNAi-induced loss of function generates aggregates of cells with a small nucleus (red lines). Bottom panel show GFP-marked *Psc/Su(z)2ⁱ* clones obtained with the *esgF/O* driver. **B.** Expression of *Psc/Su(z)2ⁱ* in ISC (*Delta-GAL4*), EB (*Su(H)-GAL4*) and EEP (*Piezo-GAL4*) cells. **C.** MARCM loss of function with the double mutant *Psc/Su(z)2^{XL26}*, showing tumor clones. Scale bar = 50um. Red line defined cluster contours.

Figure 2. *Psc* and *Su(z)2* maintain stem cell identity and adherens junctions in ISC

A. Control and *Psc/Su(z)2* mutant MARCM clones with anti-Prospero staining. **B.** Quantification in % of the number of clones containing differentiated cells (large nucleus and/or Prospero-positive cells). *Psc/Su(z)2* mutant clones do not contain differentiated cells. *Chi²-test p-value* < 2.2e-16 ; n=203 and 151 **C.** Control and *Psc/Su(z)2* mutant MARCM clones with anti-Delta staining. **D.** Quantification (%) of the number of clones containing Delta-positive cells. The majority of *Psc/Su(z)2* mutant clones does not express Delta. *Chi²-test p-value* < 2.2e-16 ; n= 37 and 45 **E.** *esg*-positive cells expressing GFP alone (control; upper panel) or with the double dominant negative forms (DDN) of both *Psc* and *Su(z)2* proteins (lower panel) with anti-PH3 staining. **F.** Quantification of PH3 counts per gut from 3d to 21d after induction of expression, showing increased proliferation in *esg>DDN* guts. *Kruskall-Wallis and Wilcoxon test p-values* at 3, 7, 10, 14 and 21 days are respectively 0.00028; 5.7e-07; 5.2e-10; 2.2e-08; 3.9e-12 ; n= 67, 52, 27, 29, 28, 31, 30, 25, 47 and 47. **G.** Control and *Psc/Su(z)2* mutant MARCM clones with anti-armadillo staining. **H.** Quantification of the mean intensity in mutant clones compared to control zones present in the same guts (R4 region). The *Psc/Su(z)2* mutant clones lose the Arm staining. *T-test p-value* < 2.2e-16; n= 30 and 30. Scale bar = 50um. Red line defined clone contours.

Figure 3. *Psc* and *Su(z)2* act through the core PRC1 (*Psc/Su(z)2*, *Sc* and *Ph*) and the *E(z)*-mediated catalytic activity of PRC2

A. Loss of function by RNAi targeting the PRC1 subunits *Sc*, *Ph*, *Pc* and *Scm* in *esg*-positive cells. Only *Scⁱ* and *Phⁱ* generate neoplastic tumors. **B.** RNAi loss of function of the ncPRC1 subunits *RYBP* and *Kdm2* in *esg*-positive cells, which do not generate a phenotype. **C.** Loss of

function by RNAi of the PRC1 subunits E(z) and Su(z)12 in *esg*-positive cells, and only E(z)ⁱ triggers tumor clones. Scale bar = 50um. Red line defined clone contours.

Figure 4. Tumor clones harbor JAK/STAT activity to proliferate

STAT92E>GFP gene reporter in *Psc/Su(z)2ⁱ* and DDN *esg*-positive cells shows strong and consistent activation of the JAK/STAT pathway in tumor clones.

TABLE 1. Summary of the different signaling investigations in tumor clones

Figure S1.

A. *Psc/Su(z)2* loss of function using another strain of UAS-RNAi (*Psc/Su(z)2* #78), another double mutant (*Psc/Su(z)2^{1b8}*) for MARCM clones and double dominant negative (DDN) forms of Psc and Su(z)2 proteins with *esg-GAL4* or *esgF/O*. **B.** Loss of function of only *Psc* or *Su(z)2* using RNAi and MARCM do not generate tumor clones. **C.** Anti-Delta staining in MARCM single mutants *Psc^{e24}* or *Su(z)2^{1b7}* **D.** Anti-Prospero staining in MARCM single mutants *Psc^{e24}* or *Su(z)2^{1b7}* (upper panels) and in *esg*-positive cells expressing *Pscⁱ* or *Su(z)2ⁱ* (lower panels). **E.** Quantification of clones count containing differentiated cells in the single *Psc* and *Su(z)2* mutants. *Chi²-test p-value = n.s. ; n= 70 and 85.* Scale bar=50um. Red line defined clone/cluster contours.

Figure S2.

A. Anti-Delta staining in *esg*-positive cells expressing GFP alone (first panels), in *esg*-positive cells expressing *Psc/Su(z)2* DDN (second panels) and in MARCM mutant clones with *Psc/Su(z)2^{1b8}* (third panels). The fourth panel shows *Psc/Su(z)2^{XL26}* MARCM clones associated with a Delta.LacZ reporter gene. **B.** Anti-Prospero staining in *esg*-positive cells expressing GFP alone (first panels), in *esg*-positive cells expressing *Psc/Su(z)2* DDN (second panels), in *esg*-positive cells expressing *Psc/Su(z)2ⁱ* (third panels), and in *Psc/Su(z)2^{1b8}* MARCM clones. **C.** Control (up) and *Psc/Su(z)2^{XL26}* (down) MARCM clones with anti-PH3 staining. **D.** Anti-Armadillo staining in *esg*-positive cells expressing GFP alone (first panels), with *Psc/Su(z)2ⁱ* (second panels), or with *Psc/Su(z)2* DDN (third panels). **E.** Quantification of Delta-positive cells in *Psc/Su(z)2^{1b8}* clones. *Chi²-test p-value = 9.653e-15 ; n=37 and 27* **F.** Quantification of

clones/cluster numbers containing differentiated cells in *esg>DDN* and *Psc/Su(z)2^{1b8}* clones. *Chi²-test p-value* < 2.2e-16 and < 2.2e-16 ; n= 203, 65 and 45. Scale bar=50um. Red line defined clone/cluster contours.

Figure S3.

A. Staining using antibodies and different reporter genes to evaluate the activity of different signaling pathways in *Psc/Su(z)2^{XL26}* MARCM clones. We used the pERK42/44 antibody to detect ERK signaling reflecting EGFR and IIS activity and found no pERK staining in MARCM clones (upper panel). We used the *Su(H)GBE.LacZ* reporter gene to detect Notch activity and observed no Notch signaling in MARCM clones. Using the pMad antibody we observed pMad staining in MARCM clones, meaning that there is a Dpp/BMP activation. We used the *Diap.LacZ* reporter gene to detect Yki transcription activity and detect no *Diap* activity meaning that there is no Yki transcription activity in MARCM clones. We used the *nkd.LacZ* reporter gene to detect Wg/Wnt activation and detect no *nkd* activity meaning that there is no Wg/Wnt signaling in MARCM clones. We used *puc^{E69}.LacZ* reporter gene to detect JNK pathway activity and detect β -Gal staining in clones that is absent in ISC (small nucleus, orange arrows), meaning that the JNK pathway is activated in MARCM clones. **B.** Modulation of Dpp/BMP and JNK activation in MARCM mutant clones for *Psc/Su(z)2*. We down-regulated the Dpp/BMP and the JNK pathway in MARCM clones with *UAS-brk* and *UAS-puc^{2A}*, respectively, and observed no impact on clone formation. Over-activation of the JNK pathway in MARCM clones using *UAS-hep^{4E}* shows no impact on tumor formation. Scale bar=50um. Red line defined clone contours.

- Antonello, Z. A., Reiff, T., & Dominguez, M. (2015). Mesenchymal to epithelial transition during tissue homeostasis and regeneration: Patching up the *Drosophila* midgut epithelium. *Fly*, 9(3), 132–137. <https://doi.org/10.1080/19336934.2016.1140709>
- Barbour, H., Daou, S., Hendzel, M., & Affar, E. B. (2020). Polycomb group-mediated histone H2A monoubiquitination in epigenome regulation and nuclear processes. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19722-9>
- Beehler-Evans, R., & Micchelli, C. A. (2015). Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development (Cambridge)*, 142(4), 654–664. <https://doi.org/10.1242/dev.114959>
- Beumer, J., & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(1), 39–53. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0278-0>
- Biteau, B., & Jasper, H. (2014). Slit/Robo Signaling Regulates Cell Fate Decisions in the Intestinal Stem Cell Lineage of *Drosophila*. *Cell Reports*, 7(6), 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.024>
- Blackledge, N. P., & Klose, R. J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 12, pp. 815–833). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00398-y>
- Chen, Ji, Kim, S.-M., & Kwon, J. Y. (2016). A Systematic Analysis of *Drosophila* Regulatory Peptide Expression in Enteroendocrine Cells. *Mol. Cells*, 39(4), 358–366. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0014>
- Chen, Jun, Xu, N., Wang, C., Huang, P., Huang, H., Jin, Z., Yu, Z., Cai, T., Jiao, R., & Xi, R. (2018). Erratum to: Transient Scute activation via a self-stimulatory loop directs enteroendocrine cell pair specification from self-renewing intestinal stem cells. In *Nature Cell Biology* (Vol. 20, Issue 8, p. 991). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0053-z>
- Flora, P., Dalal, G., Cohen, I., & Ezhkova, E. (2021). Polycomb repressive complex(Es) and their role in adult stem cells. In *Genes* (Vol. 12, Issue 10, p. 1485). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes12101485>
- Guo, Z., & Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science*, 350(6263), aab0988. <https://doi.org/10.1126/science.aab0988>
- Kalderon, D. (2022). Investigating Adult Stem Cells Through Lineage analyses. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(1), 2–22. <https://doi.org/10.1007/S12015-021-10282-Z>
- Li, X., Han, Y., & Xi, R. (2010). Polycomb group genes Psc and Su(z)2 restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes & Development*, 24(9), 933–946. <https://doi.org/10.1101/gad.1901510>
- Morillo Prado, J. R., Chen, X., & Fuller, M. T. (2012). Polycomb Group Genes Psc and Su(z)2 Maintain Somatic Stem Cell Identity and Activity in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7(12), e52892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052892>
- Pasco, M. Y., Loudhaief, R., & Gallet, A. (2015). The cellular homeostasis of the gut: What the *Drosophila* model points out. In *Histology and Histopathology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 277–292). *Histology and Histopathology*. <https://doi.org/10.14670/HH-30.277>

- Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M., & Helin, K. (2007). The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3769–3779. <https://doi.org/10.1128/MCB.01432-06>
- Post, Y., & Clevers, H. (2019). Defining Adult Stem Cell Function at Its Simplest: The Ability to Replace Lost Cells through Mitosis. *Cell Stem Cell*, 25(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2019.07.002>
- Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L., & Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171(1), 34–57. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.002>
- Schwartz, Y. B., & Cavalli, G. (2017). Three-Dimensional Genome Organization and Function in *Drosophila*. *Genetics*, 205(1), 5–24. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.185132>
- Sparmann, A., & Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 6, Issue 11, pp. 846–856). <https://doi.org/10.1038/nrc1991>
- Tang, X., Zhao, Y., Buchon, N., & Engström, Y. (2018). The POU/Oct Transcription Factor Nubbin Controls the Balance of Intestinal Stem Cell Maintenance and Differentiation by Isoform-Specific Regulation. *Stem Cell Reports*, 10(5), 1565. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2018.03.014>
- Tian, A., & Jiang, J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife.Elifesciences.Org Tian and Jiang*. *ELife*, 3, e01857. <https://doi.org/10.7554/eLife.01857>
- van der Heijden, M., & Vermeulen, L. (2019). Stem cells in homeostasis and cancer of the gut. *Molecular Cancer*, 18(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0962-x>
- Vanuytsel, T., Senger, S., Fasano, A., & Shea-Donohue, T. (2013). Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(2), 2410–2426. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.08.006>
- Wang, S., C. Ordonez-Rubiano, S., Dhiman, A., Jiao, G., Strohmer, B. P., Krusemark, C. J., & Dykhuizen, E. C. (2021). Polycomb group proteins in cancer: multifaceted functions and strategies for modulation. *NAR Cancer*, 3(4). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAB039>
- Zeng, X., & Hou, S. X. (2015). Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *drosophila* posterior midgut. *Development (Cambridge)*, 142(4), 644–653. <https://doi.org/10.1242/DEV.113357/-/DC1>

CHAPITRE II : Rôle des E3 ubiquitines ligases dans l'homéostasie intestinale

II-1 Contexte

Au cours du travail effectué sur l'implication des PcG dans le contrôle des ISC (partie précédente), j'avais en premier lieu testé la perte de fonction des différentes sous-unités des complexes PRC1 et PRC2 en utilisant la technique du MARCM. Le but était ainsi d'évaluer leur implication dans cette fonction par utilisation de mutants de perte de fonction plutôt que la technique du RNAi qui peut être plus sujette à la génération d'effets non-spécifiques. J'ai observé de ces expériences que les pertes de fonction de *Sce*, *ph* et *E(z)* engendraient un phénotype sauvage pour lequel on retrouvait au sein des clones des cellules différenciées (gros noyau des EC et cellules Prospero-positives de la lignée sécrétrice). Ces résultats sont en désaccord avec les résultats obtenus plus tard par perte de fonction RNAi, et présentés dans la partie précédente. Ces premiers résultats suggéraient ainsi que la fonction de *Psc* et *Su(z)2* dans les ISC était indépendante de l'activité de PRC1 et PRC2. Au sein du PRC1, *Psc* et *Su(z)2* interagissent avec la sous-unité catalytique *Sce* (chez les mammifères, leurs homologues PCGF1-6 avec RING1A/B). *Sce* et RING1A/B sont des enzymes de la catégorie des E3 ubiquitines ligases (E3 ub.L) dont l'activité permet ici d'ubiquitiner l'H2A. De façon indépendante du PRC1, *Psc/Su(z)2* sont capables d'interagir avec d'autres enzymes de type E3 ub.L. Chez la drosophile, nous avons largement vu que *Psc* peut interagir avec *Sce* du PRC1. Il a également été décrit que *Psc* est capable d'interagir avec *LemmingA* (*LmgA*) du complexe APC (Anaphase-Promoting Complex). En agissant comme une sorte de « cargo », *Psc* permet à *LmgA* d'ubiquitiner sa cible, la cycline B, et de réguler sa dégradation par le protéasome (Mohd-Sarip et al., 2012). Chez les mammifères, l'homologue de *Psc*, *BMI1* interagit également avec *E6AP* (E6 associated protein) et *UBR5* (Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 5), homologues respectifs de *Ub3ea* (Ubiquitin protein ligase E3A) et *Hyd* (Hyperplastic discs) chez la drosophile (Sanchez et al., 2016; Xin et al., 2018). Dans l'endomètre, *BMI1* est ainsi capable d'assurer l'activation normale du récepteur à la progestérone (PR) en modulant l'activité de *E6AP* pour une ubiquitination adéquate du PR, et ce, de façon indépendante des autres membres PcG. De cette façon, ce mécanisme participe à une réponse à la progestérone adaptée en début de grossesse (Xin et al., 2018). Il a été montré dans les cellules HeLa que *BMI1* est également impliquée dans la réponse aux dommages à

l'ADN induit par les UV. BMI1 s'associe à UBR5 de façon dépendante du PRC1 (RING1A/B) afin d'envoyer à dégrader une composante du complexe FACT et empêcher ainsi l'élongation et la synthèse d'ARN réalisées par l'ARN polymérase II aux sites lésés par les UV (Sanchez et al., 2016).

Le phénotype de perte de fonction de Psc/Su(z)2 montre le développement de tumeurs. Or, les E3 ub.L sont des protéines connues pour être régulièrement dérégulées dans des cancers (Q. Jiang et al., 2020). En effet, leur rôle prépondérant dans la régulation post-traductionnelle des protéines afin de les envoyer à dégradation par le protéasome en fait des acteurs cruciaux de la stabilisation/déstabilisation de nombreuses protéines.

II-2 Hypothèse et méthodologie

Au vu des multiples interactions relatives de Psc avec des E3 ub.L et du lien entre son phénotype perte de fonction et l'implication de ces enzymes dans des processus tumoraux, nous avons imaginé que Psc/Su(z)2 pouvait potentiellement interagir avec une E3 ub.L afin d'ubiquitiner une protéine cible et ainsi l'envoyer à dégrader. Selon cette hypothèse, l'E3 ub.L serait incapable d'ubiquitiner sa cible en l'absence de Psc/Su(z)2, empêchant ainsi la dégradation de sa protéine cible et provoquant de ce fait le phénotype tumoral observé.

Le génome de la drosophile code pour 150 E3 ub.L (<http://flybase.org/reports/FBgg0000069>). Afin d'identifier des E3 ub.L partenaires de Psc/Su(z)2, Raphaël Rousset, Tiffany Marson (stagiaire de Master) et moi-même avons donc réalisé un crible perte de fonction des différentes E3 ub.L dans les progéniteurs de l'intestin de la drosophile par la technique du RNAi. Grâce à la lignée *esgGAL4^{ts}*, UAS-GFP, j'ai ainsi exprimé dans les cellules progénitrices (*esg*-positives) différentes lignées UAS-RNAi de E3 ub.L. Après 14 jours d'induction du système à 29°C, les drosophiles ont été disséquées et la morphologie des ISC a été observée. Les 112 lignées UAS-RNAi disponibles dans les banques de stock de Bloomington (lignées TRiP : Transgenic RNAi Project) ont ainsi été testées. Certaines E3 ub.L codées par le génome de la drosophile ne possède pas de lignée RNAi, tandis que certaines en possèdent deux (16 d'entre elles) (**TABLEAU 1**). La lignée RNAi contre *LmgA* provient du centre de stock de Vienne (VDRC). Des lignées RNAi correspondant aux E3 ub.L qui ne sont pas disponibles chez Bloomington ont été commandés chez VDRC et sont en cours de traitement. C'est donc 92 E3 ub.L qui ont été testées pour le moment par perte de fonction dans ce crible (+ *LmgA*). J'ai

commencé par Sce du PRC1, connue pour interagir chez la drosophile avec Psc, puis Ub3a, Hyd et LmgA avant de réaliser ensuite le reste de crible sans à priori.

II-3 Résultats obtenus

II-3-1 Perte de fonction des E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1

La perte de fonction par RNAi de *Sce* induit la formation de clones tumoraux similaires à ceux obtenus avec la perte de fonction de *Psc/Su(z)2* (**Fig. 19, voir partie précédente**). Ce résultat signifie que la fonction suppresseur de tumeur de *Psc/Su(z)2* dans les ISC est donc dépendante de l'activité catalytique du PRC1.

Par la suite, j'ai testé si la perte de fonction des autres E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1 pouvait générer un phénotype intéressant (**Fig. 19**). J'ai observé que la perte de fonction de *Ube3a* dans les cellules progénitrices n'affectait visuellement pas la morphologie et le nombre de cellules *esg*-positives. En revanche, il est très intéressant d'observer que la perte de fonction de *hyd* provoque une perte totale des cellules progénitrices dans l'intestin. Enfin, la perte de fonction de *lmgA* dans les progéniteurs de l'intestin ne semble pas affecter les caractéristiques de prolifération et de maintien de ces cellules.

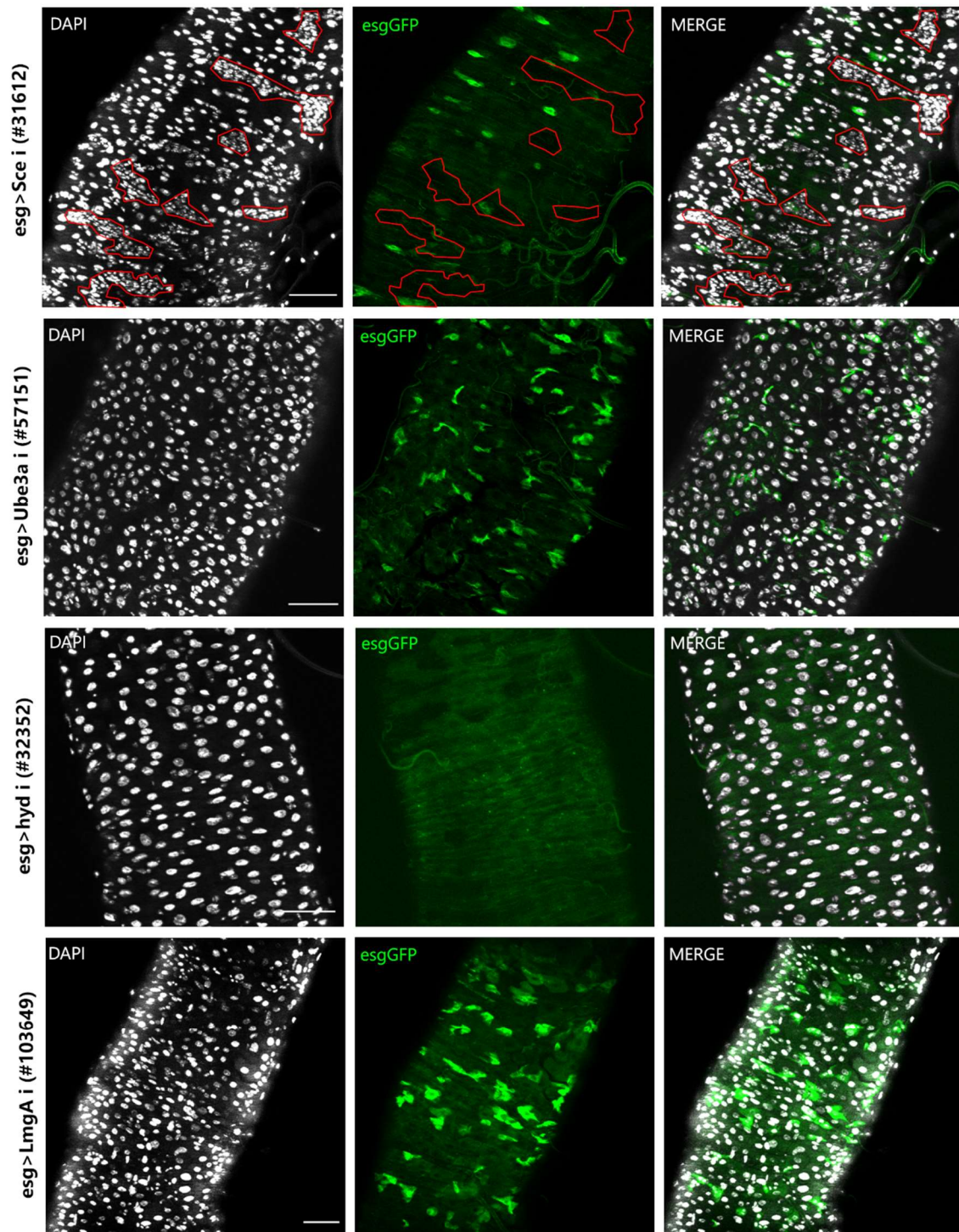


Figure 19: Phénotypes observés pour la perte de fonction des E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1

II-3-2 Crible RNAi de la perte de fonction des E3 ub.L codées par le génome de la drosophile

Après avoir identifié Sce comme partenaire d'action de Psc/Su(z)2 dans la fonction suppresseurs de tumeurs étudiée, réaliser le reste du crible sans a priori ne restait pas moins intéressant. Les E3 ub.L ont des rôles essentielles dans la régulation de la stabilisation/dégradation des protéines. Le but de notre crible RNAi était alors d'identifier des E3 ub.L pouvant avoir un rôle important de par leur activité dans la régulation des progéniteurs. Les observations ont donc été classées en plusieurs catégories selon les phénotypes morphologiques observés (**Fig. 20 ; TABLEAU 1**). La perte de fonction de 71 des 92 E3 ub.L testées n'a pas induit de phénotype observable selon le critère morphologie/densité, représentant 77% des protéines testées. En revanche, la perte de fonction de 11 des 92 E3ub.L testées (soit 12%) provoque une perte partielle ou totale des cellules progénitrices. A contrario, la perte de 6 d'entre elles a provoqué une hyperprolifération des progéniteurs (7% des cas). Nous avons également observé quelques phénotypes (4/92 soit 4% des cas) atypiques intéressants classés dans « autres » que je détaillerai plus tard. L'ensemble de ces résultats signifie que la perte de fonction de 23% des E3 ub.L testées mène à une altération morphologique, voire physiologique, des progéniteurs. Ce crible a ainsi permis d'identifier 21 E3 ub.L pouvant jouer un rôle important dans la biologie des ISC.

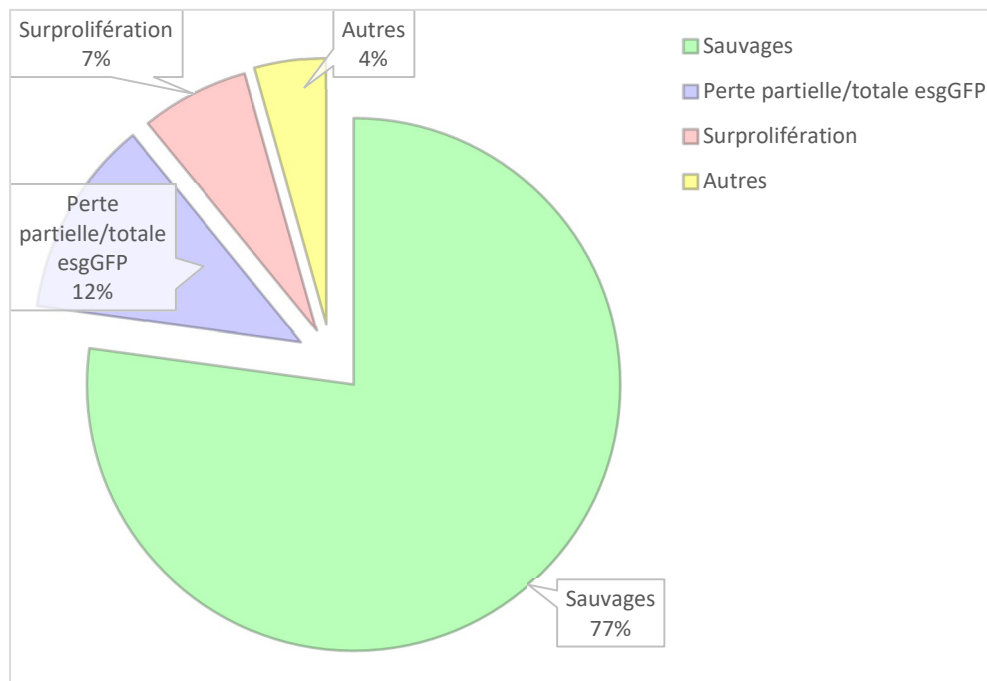


Figure 20: Proportions des différents phénotypes observés du crible RNAi pour les 92 E3 ub.L testées

Parmi les pertes de fonctions induisant une hyperprolifération des progéniteurs, la perte de la protéine **Cbl** provoque un phénotype très marqué dans l'ensemble de l'intestin (**Fig. 21**). A l'inverse, la perte de fonction de 11 E3 ub.L induit une perte partielle ou totale des progéniteurs. Parmi celles-ci, 7 possèdent un nom connu et des fonctions définies relatées dans flybase.org. C'est le cas de la protéine **Brel** dont les deux lignées RNAi exprimées dans les progéniteurs ont généré le même phénotype (**Fig. 21**). Enfin, la perte de fonction de certaines E3 ub.L a généré des phénotype différents de la perte/surprolifération des progéniteurs. C'est le cas des protéines **Dor** (codée par *deep orange*) et **Gzl** (codée par *godzilla*) (**Fig. 21**). La perte de fonction de la protéine Dor impact la morphologie des progéniteurs. Naturellement allongées en forme d'étoiles, les cellules *esg*-positives sont ici de forme arrondie. Enfin, la perte de fonction de la protéine Gzl induit quant à elle un marquage GFP punctiforme des cellules *esg*-positives.

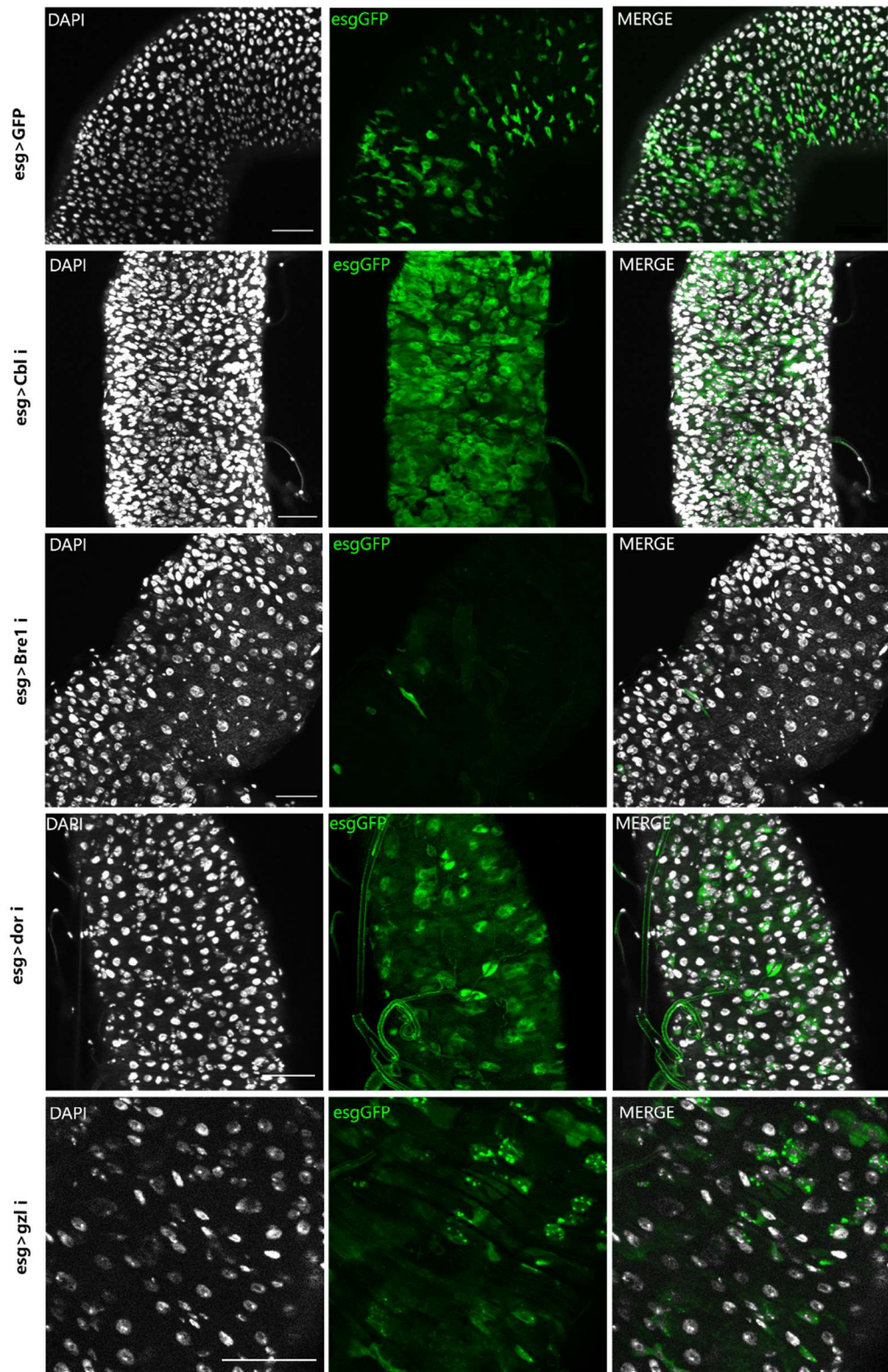


Figure 21: Phénotypes divers obtenus au cours du criblé RNAi

BL #	Fbgn	CG #	SYMBOL	NAME	TRIP #	Vector	Hairpin Loc
42618	FBgn0035059	CG3894	CG3894	-	HMS02453	VALIUM20	attP2
44094	FBgn0283503	CG4284	Neur14	Neutralized E3 ubiquitin protein ligase 4	HMS02814	VALIUM20	attP2
32945	FBgn0011230	CG14472	poe	purity of essence	HMS00739	VALIUM20	attP2
66347	FBgn0030970	CG7326	CG7326	-	HMC06299	VALIUM20	attP40
32507	FBgn0057655	CG11984	Kcmf1	Potassium channel modulatory factor 1	HMS00511	VALIUM20	attP2
62173	FBgn0020831	CG15286	CG15286	-	HMC05180	VALIUM20	attP40
57726	FBgn0051642	CG31642	CG31642	-	HMC04915	VALIUM20	attP40
57848	-	CG31642	CG31642	-	HMJ21895	VALIUM20	attP40
62188	FBgn0040355	CG3526	CG3526	-	HMC05195	VALIUM20	attP40
32865	FBgn0261119	CG5519	Prp19	Pre-RNA processing factor 19	HMS00652	VALIUM20	attP2
34017	FBgn0027052	CG5203	STU81	STP1 homology and U-box containing protein 1	HMS00986	VALIUM20	attP2
33938	-	CG5203	STU81	STP1 homology and U-box containing protein 1	HMS00889	VALIUM20	attP2
56975	FBgn0034109	CG7747	CG7747	-	HMC04415	VALIUM20	attP40
61924	FBgn0039767	CG2218	CG2218	-	HMJ23507	VALIUM20	attP40
27540	FBgn0032467	CG9934	Ube4B	Ubiquitination factor E4B	JF02691	VALIUM10	attP40
56909	FBgn0030915	CG6179	CG6179	-	HMS04328	VALIUM20	attP40
33597	FBgn0260635	CG12284	Diap1	Death-associated inhibitor of apoptosis 1	HMS00752	VALIUM20	attP2
34776	FBgn0015247	CG8293	Diap2	Death-associated inhibitor of apoptosis 2	HMS00085	VALIUM20	attP2
42826	FBgn0265356	CG15105	tn	thin	HMS02508	VALIUM20	attP40
67287	-	CG15105	tn	thin	HMC06390	VALIUM20	attP40
57268	FBgn0026206	CG12218	mei-P26	meiotic P26	HMC04662	VALIUM20	attP40
27047	FBgn0023909	CG5206	bon	bonus	JF02373	VALIUM10	attP2
37515	-	CG5206	bon	bonus	HMS01657	VALIUM20	attP40
31351	FBgn0086694	CG10542	Bre1	Bre1	JF01309	VALIUM1	attP2
28019	-	CG10542	Bre1	Bre1	JF02853	VALIUM10	attP2
27500	FBgn0020224	CG7037	Cbl	Cbl proto-oncogene	JF02650	VALIUM10	attP2
60415	-	CG7037	Cbl	Cbl proto-oncogene	HMJ22706	VALIUM20	attP40
58060	FBgn0032877	CG2617	CG2617	-	HMJ21915	VALIUM20	attP40
61020	-	CG2617	CG2617	-	HMJ23476	VALIUM20	attP40
61303	FBgn0039013	CG4813	CG4813	-	HMJ23135	VALIUM20	attP40
55402	FBgn0039886	CG5555	CG5555	-	HMC04090	VALIUM20	attP2
64019	FBgn0038296	CG6752	Kpc1	Kip1 ubiquitination-promoting complex subunit 1	HMS05355	VALIUM20	attP40
32448	FBgn0037944	CG6923	CG6923	-	HMS00447	VALIUM20	attP2
62317	FBgn0038125	CG8141	CG8141	-	HMJ23674	VALIUM20	attP40
40882	FBgn0036897	CG8786	Rnf146	Ring finger protein 146	HMS02130	VALIUM20	attP2
31374	FBgn0030809	CG9086	Ubr1	Ubr1 ubiquitin ligase	JF01341	VALIUM1	attP2
42534	FBgn0030514	CG9941	CG9941	-	GLC04421	VALIUM22	attP2
37485	FBgn0034312	CG10916	CG10916	-	GLC00528	VALIUM22	attP2
62158	FBgn0039920	CG11360	CG11360	-	HMC05165	VALIUM20	attP40
67933	-	CG11360	CG11360	-	HMS05762	VALIUM20	attP40
67278	FBgn0035024	CG11414	CG11414	-	HMC06381	VALIUM20	attP40
61288	-	CG11414	CG11414	-	HMJ23120	VALIUM20	attP40
41831	FBgn0033884	CG13344	CG13344	-	GLI01259	VALIUM22	attP2
58099	FBgn0031816	CG16947	Rchy1	Ring finger and CHY zinc finger domain containing 1	HMJ22014	VALIUM20	attP40
62320	FBgn0033783	CG17019	CG17019	-	HMJ23677	VALIUM20	attP40
62365	FBgn0039498	CG17991	CG17991	-	HMJ23760	VALIUM20	attP40
65067	FBgn0052847	CG32847	CG32847	-	HMC06025	VALIUM20	attP40
44570	FBgn0052850	CG32850	Rnf11	Ring finger protein 11	HMS02866	VALIUM20	attP40
58136	-	CG32850	Rnf11	Ring finger protein 11	HMJ22085	VALIUM20	attP40
61970	FBgn0053552	CG33552	CG33552	-	HMJ23596	VALIUM20	attP40
28775	FBgn0051716	CG31716	Cnot4	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	JF03203	VALIUM10	attP2
42513	-	CG31716	Cnot4	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	HMJ02078	VALIUM20	attP40
27267	FBgn0037384	CG10981	dgrn	degringolade	JF02580	VALIUM10	attP2
66953	FBgn0262065	CG11489	dmr1	defense repressor 1	HMS05419	VALIUM20	attP40
27041	FBgn0000524	CG3929	dx	detex	JF02367	VALIUM10	attP2
67931	FBgn0030600	CG32592	hiw	highwire	HMS05737	VALIUM20	attP40
80451	-	CG32592	hiw	highwire	HMS06036	VALIUM20	attP40
57027	FBgn0038772	CG4973	mdic	midlife crisis	HMS04472	VALIUM20	attP40
27320	FBgn0263601	CG5841	mb1	mind bomb 1	JF02629	VALIUM10	attP2
57833	FBgn0086442	CG17492	mb2	mind bomb 2	HMJ21843	VALIUM20	attP40
43178	FBgn0029152	CG7184	Mkrm1	Makorin 1	GLI01521	VALIUM22	attP2
35236	FBgn0057705	CG9381	mura	murashikha	GLC00121	VALIUM22	attP2
67917	FBgn0002932	CG11988	neur	neurallized	HMS05744	VALIUM20	attP40
51826	FBgn0052323	CG7864	Pex10	Peroxin 10	HMC03398	VALIUM20	attP2
53308	FBgn0031282	CG3639	Pex12	Peroxin 12	HMC03536	VALIUM20	attP2
64569	FBgn0040294	CG4909	POSH	Plenty of SH3s	HMC05588	VALIUM20	attP40
41662	FBgn0263974	CG43726	qin	qin	GLI01398	VALIUM22	attP2
31612	FBgn0003330	CG5595	Sce	Sex combs extra	JF01396	VALIUM1	attP2
67924	-	CG5595	Sce	Sex combs extra	HMS05745	VALIUM20	attP40
40842	FBgn0003410	CG9949	sina	seven in absentia	HMS02028	VALIUM20	attP40
50629	FBgn0039875	CG1937	slp3	septin interacting protein 3	HMC02976	VALIUM20	attP2
61344	-	CG1937	slp3	septin interacting protein 3	HMJ23236	VALIUM20	attP40
43248	FBgn0086129	CG3231	snama	something that sticks like glue	GLC01436	VALIUM22	attP2
53986	FBgn0086916	CG11281	snky	sneaky	HMJ21388	VALIUM20	attP40
44051	FBgn0001978	CG3647	stc	shuttle craft	HMS02768	VALIUM20	attP40
31091	FBgn0267351	CG15104	Topors	Topoisomerase I-interacting protein	JF01556	VALIUM1	attP2
34671	-	CG15104	Topors	Topoisomerase I-interacting protein	HMS01149	VALIUM20	attP2
33931	FBgn0265464	CG10961	Traf6	TNF-receptor-associated factor 6	HMS00890	VALIUM20	attP2
56990	FBgn0039668	CG6304	Trc9	TRC9 ring finger protein	HMC04111	VALIUM20	attP40
31627	FBgn0005616	CG3241	msl-2	male-specific lethal 2	JF01412	VALIUM1	attP2
36787	FBgn0025574	CG5212	Pli	Pellino	GLC0524	VALIUM22	attP2
35769	FBgn0034546	CG13442	CG13442	-	HMS01518	VALIUM20	attP2
41847	FBgn0031848	CG11329	Nse1	Non-SMC element 1	GLI01275	VALIUM22	attP2
57253	FBgn0032635	CG15141	CG15141	-	HMC04643	VALIUM20	attP40
33050	FBgn0037781	CG12812	Fandc	Fanc1	HMS00771	VALIUM20	attP2
62460	FBgn0287695	CG13025	CG13025	-	HMJ23940	VALIUM20	attP40
61896	FBgn0034573	CG3295	Sou	Souji	HMJ23451	VALIUM20	attP40
54460	FBgn0000482	CG3093	dor	deep orange	HMS03720	VALIUM20	attP40
33435	FBgn0260794	CG42574	ctrip	circadian trip	HMS00322	VALIUM20	attP2
44481	-	CG42574	ctrip	circadian trip	HMC02371	VALIUM20	attP40
32352	FBgn0002431	CG9484	hyd	hyperplastic discs	HMS00343	VALIUM20	attP2
67012	FBgn0003557	CG4244	Sul(dx)	Suppressor of detex	HMS05478	VALIUM20	attP40
31972	FBgn0061469	CG6190	Ube3a	Ubiquitin protein ligase E3A	JF03406	VALIUM10	attP2
57151	-	CG6190	Ube3a	Ubiquitin protein ligase E3A	HMC04528	VALIUM20	attP40
51773	FBgn0031107	CG11734	HERC2	HECT and RLD domain containing protein 2	HMC03328	VALIUM20	attP40
31687	FBgn0259174	CG42729	Nedd4	Nedd4	JF01860	VALIUM1	attP2
34741	-	CG42729	Nedd4	Nedd4	HMS01221	VALIUM20	attP2
51767	FBgn0261931	CG42797	CG42797	-	HMC03322	VALIUM20	attP40
40905	FBgn0029006	CG4943	Smurf	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase	HMS02153	VALIUM20	attP40
31376	FBgn0034989	CG3356	CG3356	-	JF01343	VALIUM1	attP2
36714	FBgn0030674	CG8184	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin p	HMS01604	VALIUM20	attP40
36715	-	CG8184	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin p	HMS01605	VALIUM20	attP40
36286	FBgn0031384	CG4238	CG4238	-	GLC0505	VALIUM22	attP2
28785	FBgn0004919	CG2679	gol	goliath	JF03213	VALIUM10	attP2
64034	FBgn0037442	CG10277	gzl	godzilla E3 ubiquitin protein ligase	HMS05370	VALIUM20	attP40
32362	FBgn0025638	CG16982	Roc1a	Regulator of cullins 1a	HMS00353	VALIUM20	attP2
44646	FBgn0025186	CG5709	ari-2	ariadne 2	HMC02353	VALIUM20	attP2
64033	FBgn0053144	CG33144	CG33144	-	HMS05369	VALIUM20	attP40
29416	FBgn0017418	CG5659	ari-1	ariadne 1	JF03352	VALIUM10	attP2
37059	FBgn0041100	CG10523	park	parkin	HMS01651	VALIUM20	attP40
38333	-	CG10523	park	parkin	HMS01680	VALIUM20	attP2
50727	FBgn0041174	CG13221	Vhl	von Hippel-Lindau	HMS02963	VALIUM20	attP2

Tableau 1 : Liste des lignées UAS-RNAi de chez Bloomington utilisées dans le crible RNAi

Phénotype sauvages (vert), hyperprolifération (rose), perte des progéniteurs (violet) ou autres (jaunes)

CHAPITRE III : Impact des bioinsecticides *Btk* sur le développement de physiopathologies de l'intestin

III-1 Résumé

Les bioinsecticides à base de spores de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) sont largement utilisés dans le monde pour lutter contre les insectes ravageurs de cultures et de forêts. Aucune toxicité aiguë des produits *Bt* n'a été rapportée chez les autres organismes non cibles de son action. Cependant, *Bt* est un pathogène humain opportuniste. Il est connu que la présence d'agent pathogène dans l'intestin déclenche des mécanismes de défense qui permettent son élimination et de restaurer l'homéostasie. Cependant, le comportement intestinal face aux spores de bactéries reste largement inconnu. Il est donc légitime de s'interroger sur le fait que la présence répétée de spores de la bactérie pathogène opportuniste *Bt* dans le tube digestif par le biais de l'alimentation pourrait potentiellement induire un contexte délétère et favoriser le développement de maladies intestinales. En utilisant la drosophile, un organisme non-cible des propriétés insecticides de *Bt*, j'ai participé à montrer que l'ingestion chronique de produits *Bt* réduit la durée de vie des mouches. Les résultats obtenus montrent également que l'ingestion de spores de *Bt* de façon répétée modifie la morphologie et la physiologie de l'intestin dus à un vieillissement prématuré de l'intestin.

Chronic ingestion of *Btk* spores used as insecticide promotes premature aging of the gut in non-susceptible *Drosophila*

Aurélia Joly†, Julie Soltys†, Marie-Paule Nawrot-Esposito, Armel Gallet, Raphaël Rousset*

Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, France

† *These authors contributed equally to this work*

* *Correspondence: raphael.rousset@univ-cotedazur.fr*

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt), a spore-forming Gram-positive bacterium, is the leading microbial insecticide used in both organic and conventional farming. Commercial *Bt* insecticides, which are made of *Bt* spores producing entomopathogenic toxins (named Cry toxins), kill target pests after ingestion by destroying their intestinal epithelium. Although there is no evidence of acute toxicity of *Bt* spores and toxins towards non-susceptible organisms over a short period of time, the potential adverse effects of chronic ingestion have not been studied. Using *Drosophila*, an organism non-susceptible to the insecticidal properties of *Bt*, we show here that chronic ingestion of low doses of spores with the diet reduces lifespan. Our results demonstrate that chronic ingestion of *Bt* spores affects gut morphology, promotes progenitor mis-differentiation, increases enteroendocrine cell number and alters septate junctions, indicating the onset of early signs of dysplasia and aging of the midgut. We further observed by transcriptome analysis and ROS detection an increase in oxidative stress. Overall, our results show that chronic ingestion of *Bt* spores, although considered as inert forms, boosts the level of intestinal ROS, leading to premature aging of the gut and early lethality in non-susceptible *Drosophila*.

INTRODUCTION

To face the growing global food needs and the demand for profitable crops, the use of pesticides exploded in the middle of the 20th century. The massive use of these chemical substances for several decades has impacted dramatically on the ecology and implications of some of them in diseases have also been reported. To reduce the use of chemical pesticides, alternative methods of plant protection using natural mechanisms, called methods of biocontrol, have emerged. Among these solutions, spores of the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are widely used as a insecticide to fight insect larvae that ravage crops (tomatoes, cabbage, lettuce, corn, etc.), forests (pine trees), but also against harmful pests such as mosquitoes (De Maagd et al., 2003). In 2015, *Bt* accounted for 32°000 tons of products sold in both organic and conventional agriculture, thus placing it in second position among the most used insecticide products (chemical and biological combined) (Casida & Bryant, 2017). Moreover, the application of *Bt* insecticides is expected to grow due to governmental and societal incentives to reduce the use of chemical pesticides in favor of biocontrol solutions.

Bt is a Gram-positive bacterium belonging to the *Bacillus cereus* group (Ehling-Schulz, Koehler, et al., 2019). Upon unfavorable conditions (pH, nutrients...), vegetative bacteria of this group have the capacity to transforming into spores, a state of dormancy allowing the bacteria to resist until the conditions become favorable again. Insecticidal proprieties of *Bt* are given by enthomopathogenic crystal toxins that *Bt* produces during sporulation (Schnepf et al., 1998). Different *Bt* subspecies produce unique Cry toxin cocktails targeting distinct pest populations, providing them with specific insecticidal properties (Crickmore et al., 2021; Palma et al., 2014). The dispersed *Bt* plant protection products are ingested by insects at the larval stage and thus reach the digestive tract. Upon dissolution and activation by gut proteases, the toxins then bind to specific receptors on the surface of the epithelium and create pores in the intestinal cells. In parallel, spores germinate thanks to the favorable conditions in the gut and invade the systemic circulation, causing death of the larvae by septicemia in 2 to 3 days (Raymond et al., 2010; Soberón et al., 2009). No acute toxicity of *Bt* products has been reported on different mammals, but the long-term effects of ingestion of low doses are poorly documented (Betz et al., 2000; EFSA, 2018; Ignoffo, 1973; McClintock et al., 1995; Raymond & Federici, 2017b; Siegel, 2001). In view of the increasing use of these insecticides, their potential side effects on non-susceptible organisms upon chronic ingestion with food need to be investigated. Three recent studies have shown that several strains of *Bt* from commercial products have been traced back to foodborne outbreaks, suggesting that *Bt* may represent a risk for food safety like the

opportunistic pathogen *B. cereus* (Biggel, Jessberger, et al., 2022; Bonis et al., 2021; Jöhler et al., 2018b).

Previous work on *Drosophila*, a non-susceptible organism, reported that low doses of *Bt* vegetative bacteria induced a transient hyperplasia dependent on the JNK, JAK/STAT and Hippo/Yki signaling pathways in the adults (Loudhaief et al., 2017). More recently, it has been shown that ingestion of *Bt* spores by fruit fly larvae induces growth defect and developmental delay mainly caused by enterocytes death, thereby impairing protein digestion, as well as mortality at higher doses (Babin et al., 2020; Nawrot-Esposito et al., 2020). In rats, *Bt* spores are able to germinate and persist in the gut for several days (Wilcks et al., 2006b). It is recognized in mammals that the presence of non-commensal (allochthonous) bacteria in the gut can cause a pro-inflammatory state that can lead to the development of IBD such as Crohn's disease or ulcerative colitis and, in the worst case, degenerate into cancers (Nakanishi et al., 2021; Sobhani, 2004). Yet, the potential consequences of chronic ingestion of *Bt* spores on the development of intestinal pathophysiology are not known. Here we used the intestine of *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate the impacts of chronic ingestion of low doses of *Bt* spores on non-susceptible organisms of insect type.

RESULTS

Chronic ingestion of low-dose *Btk* spores with the diet reduces *Drosophila* lifespan.

For this study, we exposed fruit flies along with their regular diet to the DiPel commercial formulation containing *Bt subspecies kurstaki* (*Btk*, containing the ABTS-351 strain) used worldwide as bioinsecticide to kill lepidopteran larvae. To do so, we have developed a controlled protocol, changing tubes every 3-4 days prior to germination on medium to avoid vegetative cells and thus reproducing regular dietary exposure only to *Btk* spores (see material and methods). We first performed a dose-response survival assay with doses of *Btk* DiPel ranging from 10^3 to 10^6 CFU/tube/fly (Fig.1A). We observed that the doses 10^5 and 10^6 reduce significantly the lifespan of flies. At lower doses (10^4 and 10^3), the lifespan of control and *Btk*-exposed flies did not differ significantly. Changing tubes every day did not alter the effect of *Btk*, confirming that the flies ingested only spores, not vegetative bacteria that might have germinated on the medium (Fig.S1). We also tested a homemade production of *Btk* ABTS-351 spores, therefore devoid of the adjuvants present in the DiPel formulation that favor spore dispersion, adherence and preservation. Chronic ingestion of *Btk* spores alone at the dose of 10^6 exhibits the same effect as DiPel at the same dose, indicating that the *Btk* spores, and not the

adjuvants, are solely responsible for the increased mortality (Fig.1B). The recommendations for the spreading of *Bt* products in France are 1 to 1.5 kg/ha (corresponding to ~ 4 to 6×10^5 CFU/tube, see material and methods), per application with repetitions ranging from 2 to 12 times (<https://ephy.anses.fr/>). Therefore, the 10^6 dose is equivalent to two consecutive treatments per *Drosophila* (2X), while the 10^5 dose is 5 times lower than the dose of one treatment (0.2X). These results show that ingestion of low doses of *Btk* spores has a critical impact on the lifespan of a non-susceptible organism like *Drosophila*.

We then tested whether the decreased longevity induced by the *Btk* spores was dependent on the gut microbiota. In axenic flies deprived of intestinal flora, DiPel retains the ability to decrease survival, meaning that *Btk* does not interfere with the gut microbiota (Fig.1C).

Chronic *Btk* ingestion affects gut morphology, increases enteroendocrine cell number, promotes progenitor mis-differentiation and alters septate junctions.

To investigate the causes of this reduced lifespan, we first performed cross-sections of *Drosophila* guts. We used *Myo1AGAL4,UAS-GFP* flies expressing GFP in EC to observe the global morphology of the epithelium after 14 days of chronic *Btk* ingestion. We observed that the regular pseudo-stratification of nuclei seen in control guts is disorganized in those challenged with *Btk* (Fig. 2A). We also noticed bigger nuclei in the epithelium. Strikingly, we observed that EC morphology has changed, forming sort of waves on contact with the lumen, instead of a linear surface. These results show that *Btk* ingestion impacts gut morphology.

We previously showed that a one-time exposure to *Btk* at the 10^6 dose increased the number of EE, which is due to Cry toxins diverting progenitor cell fate towards the enteroendocrine lineage by diminishing cell adhesion with intestinal stem cells (Jneid et al., 2022). After 21 days of *Btk* chronic ingestion, we also observed a significant increase in the R5 region of the total number of EE (Fig. 2B). Next, using *esgGAL4,UAS-GFP* flies, the results revealed that chronic ingestion of *Btk* causes an increase of progenitors in the gut (data not shown). This phenotype looks like dysplasia, characterized by an overproliferation of ISC and progenitor mis-differentiation (Benoît Biteau et al., 2010). Dysplasia increases naturally in the gut through aging, and mis-differentiation is characterized by larger, round shaped progenitors (Benoît Biteau et al., 2008). To quantify dysplasia, we analyzed the size of GFP-positive progenitors sorted by FACS from control or *Btk*-challenged midguts. Two populations could be distinguished: small GFP cells, representing ISC, and larger GFP cells, representing precursors (mainly EB) or mis-differentiated cells. In control flies, we found at days 7 and 14 $\sim 20\%$ of

large EB versus ~80% of small ISC, and at day 21, an increase in the proportion of large cells, consistent with the onset of dysplasia that naturally occurs during aging (Fig.2C). In comparison, we observe no significant difference at days 7 and 21 between these control conditions and *Btk* chronic ingestion. However, there is a strong augmentation of the large GFP population at day 14 with *Btk* ingestion, at a level close to the one seen in 21-day control flies. These results show that chronic ingestion of *Btk* spores leads to the emergence of early intestinal dysplasia between days 7 and 14 after the start of exposure.

Septate junctions link all cells (except ISC) of the midgut to support its integrity (Jia Chen et al., 2018a). Decrease and re-localization to the cytoplasm of components of these junctions is a hallmark of aging (Resnik-Docampo et al., 2017; Salazar et al., 2018). We performed immunostaining for Discs large (Dlg), a protein localized in septate junctions, on midguts at 7, 14 and 21 days. In control flies, Dlg staining delineates nicely septate junctions at day 7 and then gradually diminishes during aging (Fig 2D, 2E). For chronic *Btk* ingestion, we observed a strong loss of Dlg staining at septate junctions already at 7 days, which then reaches at 21 days the same level as the control staining. These results show that *Btk* chronic ingestion induces premature alteration of midgut septate junctions. Altogether, our results show that chronic ingestion of *Btk* spores affects gut morphology, promotes progenitor mis-differentiation, increases enteroendocrine cell number and alters septate junctions, indicating the onset of early signs of dysplasia and aging of the midgut.

Transcriptome analysis reveals oxidative stress

To further characterize the molecular processes involved in the deregulation of gut physiology induced by chronic *Btk* ingestion, we performed a transcriptome analysis of *Drosophila* intestines. Total RNA were isolated from dissected midguts and sequenced by RNA-seq. We found at 7, 14 and 21 days respectively 29, 48 and 51 genes (adjusted p-value < 0.5) differentially expressed upon chronic *Btk* ingestion with a fold change of at least 2 or inferior to -2 (Fig. 3A, B). Most of the genes are upregulated and interestingly, 15 of them are shared at the different time points, and 29 between days 14 and 21 (Fig. 3B). Strikingly, genes differentially expressed at each time point share an enrichment in gene ontology (GO) related to glutathione metabolic process (GO:0006749; *GstD1*, *GstD2*, *GstD4*, *GstD5*, *GstD10*, *GstE1*, *GstS1*) (Fig. 3C). Glutathione participates in many cellular events, and notably in antioxidant defense (Panday et al., 2020). This is consistent with the oxidation-reduction process (GO:0055114) that appears at 21 days (*Cyp4g1*, *Cyp6a21*, *Fad2*, *Cyp309a1*, *Cyp6d2*, *Cyp12d1-p*). In addition, we obtained

an enrichment in Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process (GO:0006777; *Mocs1*, *mal*). Mo-molybdopterin, an essential cofactor for the catalytic activity of diverse enzymes, has been linked to cell metabolism and, interestingly, to intestinal inflammation in murine models of colitis (Marelja et al., 2018; W. Zhu et al., 2018). Overall, these RNA-seq results show a transcriptional regulation in *Btk*-challenged midguts of genes engaged in redox and inflammation via mechanisms involving glutathione and the Mo-molybdopterin cofactor.

Chronic *Btk* ingestion increases ROS in the midgut

Since the RNA-seq experiment pinpointed to consistent regulation of genes involved in redox metabolism, we sought to detect ROS using the R19S and DHE probes (Hachfi et al., 2019; Owusu-Ansah et al., 2008). The DHE probe strongly reacts with superoxide O_2^- , and also to a lesser extent with other ROS (Graham et al., 2022), whereas the R19S probe R19S is highly specific to DUOX- dependent hypochlorous acid (HOCl) during immune response (K. A. Lee et al., 2013). We detected low levels of immune HOCl with the R19S probe in the guts, which did not change upon chronic *Btk* ingestion (data not shown). However, using the DHE probe, we detected an increase in oxidative stress in the guts of flies treated with chronic *Btk* ingestion (Fig. 4). Accumulation of high levels of mitochondrial ROS is a hallmark of aging (Lennicke & Cochemé, 2021; López-Otín et al., 2013), and in *Drosophila*, old intestines exhibit elevated DHE-stained ROS level (Hochmuth et al., 2011). Overall, our results show that chronic *Btk* ingestion increases oxidative stress, resulting in premature aging of the gut and early lethality.

Discussion: see the discussion part in the thesis manuscript (PARTIE III : DISCUSSION page 154)

MATERIEL AND METHODS

Reagents and resources

Antibodies

Dlg (DSHB #4F3-s) 1:200; Prospero (DHSB #MR1A-c) 1:200 ; Alexa-546 anti-mouse 1:400; Alexa-488 anti-mouse 1:400

Chemical and consumables

PBS-10X (Euromedex #ET330)

Triton X-100 (Sigma #T9284)

16% Formaldehyde solution Methanol-free (ThermoScientific #28900)

Fluoroshield™ DAPI medium (SIGMA #F6057-20mL)

Elastase from porcine pancreas (SIGMA #E7885-5MG)

R19S probe (Hachfi et al., 2019)

DHE probe (Invitrogen #D11347)

MicroElute Total RNA Kit (Omega #R6831-01)

DiPel (CP Jardin S.A.)

Drosophila Strains

WT Canton S (Bloomington #64349)

w; myo1A-Gal4 UAS-GFP/CyO (Y. Apidianakis)

y w; esg-Gal4^{NP5130} UAS-GFP/CyO (N. Tapon)

Software and algorithms

FIJI/ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>) (J. Schindelin et al. 2012); GraphPad; Krita (<https://krita.org/fr>); R project (<https://r-project.org>)

Experimental methods

Chronic *Btk* ingestion

10 flies (7 females and 3 males) were put on a vial containing fresh medium and waterman paper discs with 50µL of water (control condition) or *Btk* solution in order to give 1,25.10⁶ CFU/fly/vial of 4cm² (*Btk* ingestion condition). We found that *Btk* spores placed on the nutrient medium in this way were starting to germinate from the fourth day (data not shown). Flies were therefore transferred to new vials with fresh paper discs and solutions twice a week to leave them for no longer than 4 days and to avoid the presence of *Btk* vegetative bacteria coming

from germinated spores. Only females were counted and dissected for all the experiments. For survival experiments, males were added when a female was counted dead during the vial change in order to always have 10 flies per vial. Experiments were done at 25°C.

The recommendations for the spreading of *Bt* products in France are 1 to 1.5 kg/ha per application with repetitions ranging from 2 to 12 times (<https://ephy.anses.fr/>). This represents 1 to 1.5×10^{13} CFU/ha (10^4 m²), equal to 4 to 6×10^5 CFU/vial of 4 cm², per application. The dose of 10⁶/fly/vial is therefore equivalent to 2 consecutive treatments.

FACS

Dissociated cell samples were prepared as follows: 20 guts were dissected in PBS-1X and transferred to a 1.5 mL tube containing PBS-1X (400 µL) on ice. Guts were dissociated by adding 10 µL of elastase (stock at 10 mg/mL) and 90 µL of Tris-HCl (pH=8.8) buffer, and incubated during 30 min at 27°C with slow rotation (55 rpm) and gentle pipetting at 0, 10, 20 and 30 min. The cells were then rinsed three times with PBS-1X after centrifugation at 300g during 20 min (4°C). The third time, cells are resuspended with 500 µL of PBS-1X and filtrated with 40µm filter. GFP expressing cells were analyzed at the Platform of Imagery and Flux Cytometry at the Cellular and Molecular Pharmacology Institute in Sophia-Antipolis.

R19S and DHE stainings

Stainings with the DHE and R19S probes were performed as previously reported (Owusu-Ansah et al., 2008; Hachfi et al., 2019).

Homemade spores

From isolated colonies on LB agar Petri dish, 4 × 5mL of *Bt* pre-culture was carried out. The pre-culture was used for sowing 4 × 500mL of PGSM medium (0.75% casamino acids, 0.34% KH₂PO₄, 0.435% K₂HPO₄, 0.75% glucose, 1.25mM CaCl₂, 0.123% MgSO₄, 0.002% MnSO₄, 0.014% ZnSO₄, 0.02% FeSO₄) and allowed to grow and sporulate in an incubator shaker at 30°C, 180 rpm for 2 weeks. To eliminate vegetative cells, culture was heated 1 hour at 70°C and then centrifugated 15 min at 5000g. Each pellet were resuspended with a Dounce homogenizer in 250mL of 150 mM NaCl and placed for 30 min on roller agitation at room temperature. After centrifugation (15 min, 5000g), pellets were washed twice with sterile water (250mL). Final pellets were resuspended in 30mL of sterile water, dispatched in 1mL weighed tubes and lyophilized for 24-48h. The spore mass was determined by the difference between the full and the empty tubes weights.

RNAsequencing

Following dissection of *Drosophila* midguts, samples were homogenized in a tissue lyser using 5mm beads at 50 hertz for 50 seconds. Total RNA was extracted using the MicroElute Total

RNA Kit (Omega). Three replicates have been made for each condition at each timepoint indicated. RNA sequencing was performed by Genewiz (Azenta Life Sciences) using Illumina NovaSeq, PE 2x150 technology (version 2.0.0) in a polyA pair-end manner.

RNA-seq analysis

Mapping sequence reads to the reference genome: Sequence reads were trimmed to remove possible adapter sequences and nucleotides with poor quality using “Trimmomatic v.0.36”. The trimmed reads were mapped to the *Drosophila melanogaster* BDGP6 reference genome available on ENSEMBL using the “STAR aligner v.2.5.2b”. The STAR aligner is a splice aligner that detects splice junctions and incorporates them to help align the entire read sequences. BAM files were generated as a result of this step.

Extracting gene hit counts: Unique gene hit counts were calculated by using “featureCounts” from the Subread package v.1.5.2. The hit counts were summarized and reported using the gene_id feature in the annotation file. Only unique reads that fell within exon regions were counted.

Differential gene expression analysis: After extraction of gene hit counts, the gene hit counts table was used for downstream differential expression analysis. Using “DESeq2”, a comparison of gene expression between the customer-defined groups of samples was performed. The Wald test was used to generate p-values and log₂ fold changes. Genes with an adjusted p-value < 0.05 and absolute log₂ fold change > 1 were called as differentially expressed genes for each comparison.

Gene ontology analysis : A gene ontology analysis was performed on the statistically significant set of genes by implementing the software “GeneSCF v.1.1-p2”. The fb GO list was used to cluster the set of genes based on their biological processes and determine their statistical significance.

Quantification and statistics

Image Capture and Processing

All the pictures and data presented were always performed from R4-R5 posterior midgut (see Buchon et al. 2013) with Zeiss Axioplan Z1 (with Apotome 2 module) at 20x objective. FIJI/ImageJ and Krita software were used for image analysis.

Statistics

For all experiments, flies were randomly chosen for experimental analysis. All experiments were independently repeated at least 3 times. Statistical tests were performed with R software or GraphPad. The tests used, the total number of analyzed guts (“*n*”) and the exact P-value are indicated in the legend of each figure.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Nic Tapon, Yiorgos Apidianakis, the Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC; NIH P40OD018537), the Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) and the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) for fly stocks and reagents. We are very grateful to the Alain Robichon Foundation for the financial support of the RNA-seq. We acknowledge Olivier Pierre from the imagery platform of our “Institut Sophia Agrobiotech” and Julie Cazareth from the cellular imaging and cytometry platform of the “Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire” for their assistance. We thank all the members of our team “Bioinsecticides, Environment and Health” for insightful discussions. A.J. is supported by the “Ligue nationale contre le cancer” (LNCC doctoral grant 2018) and the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (ARCDOC42021020003051). R.R. and A.G. are supported by the “Centre national de la recherche scientifique” (CNRS). Our projects are funded by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (20171206145) and by the PNR-EST ANSES & ECOPHYTO II (2017). We also received support from the French government, through the UCAJEDI Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR) with the reference number ANR-15-IDEX-01.

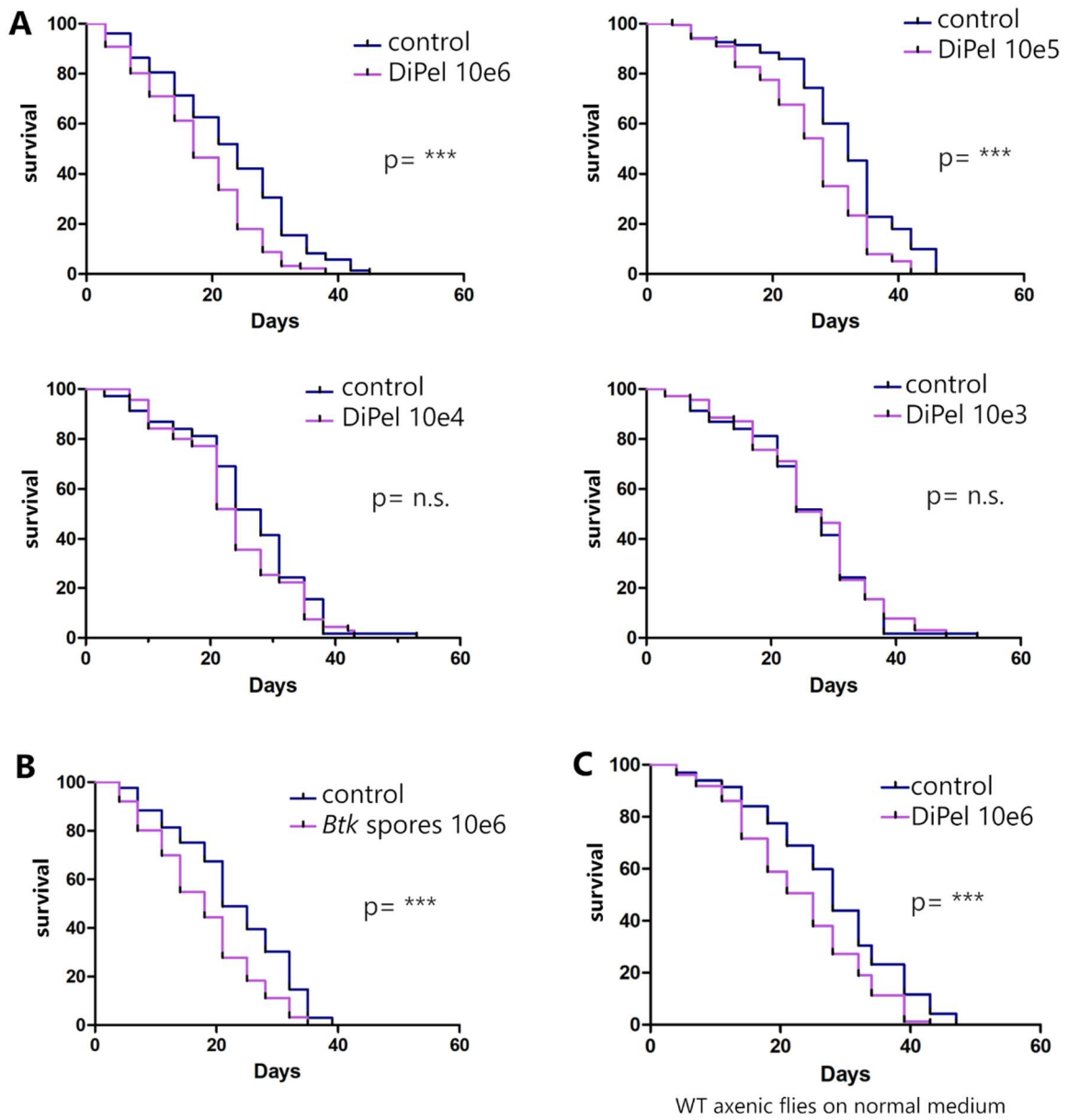


Figure 1

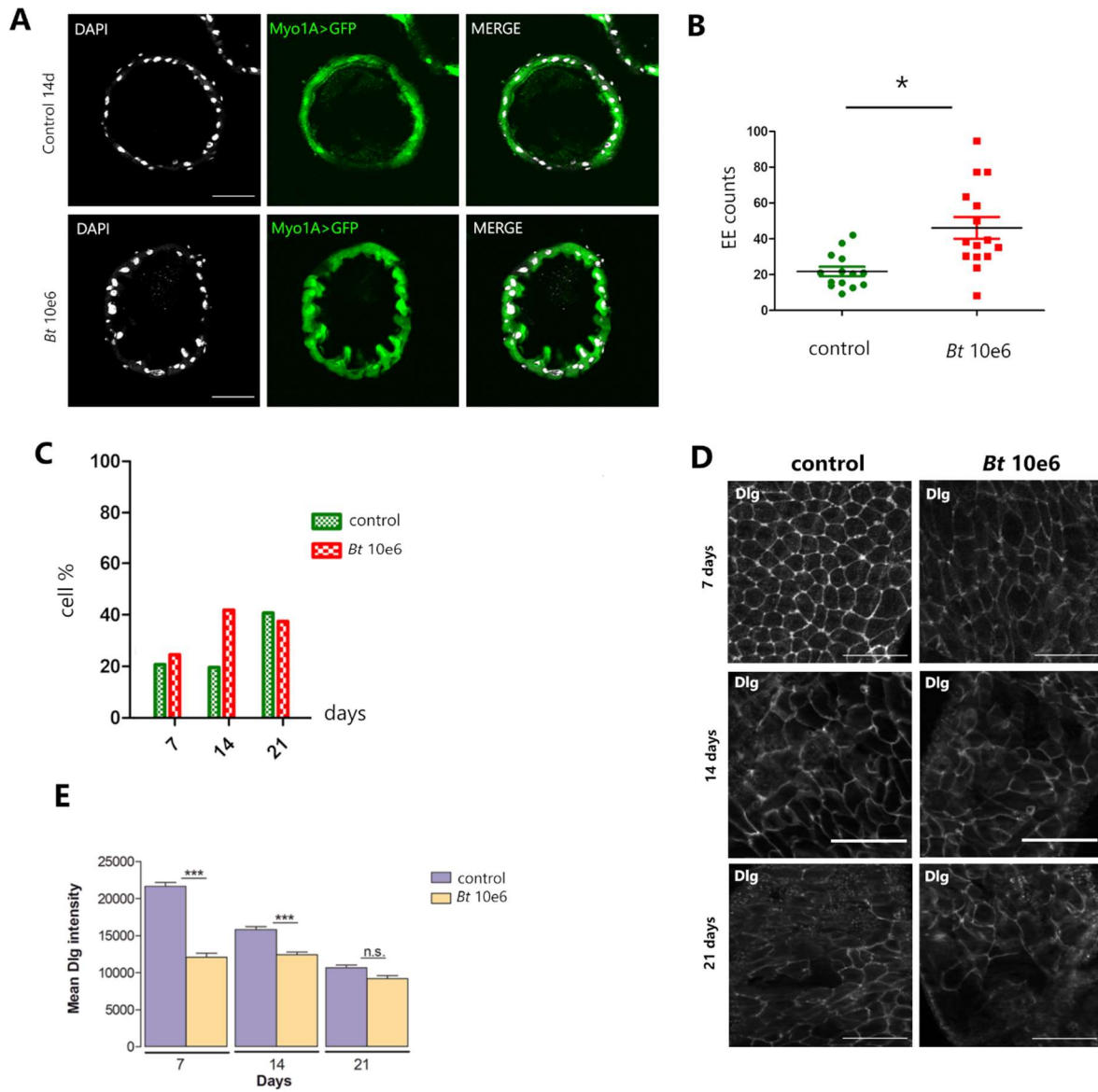


Figure 2

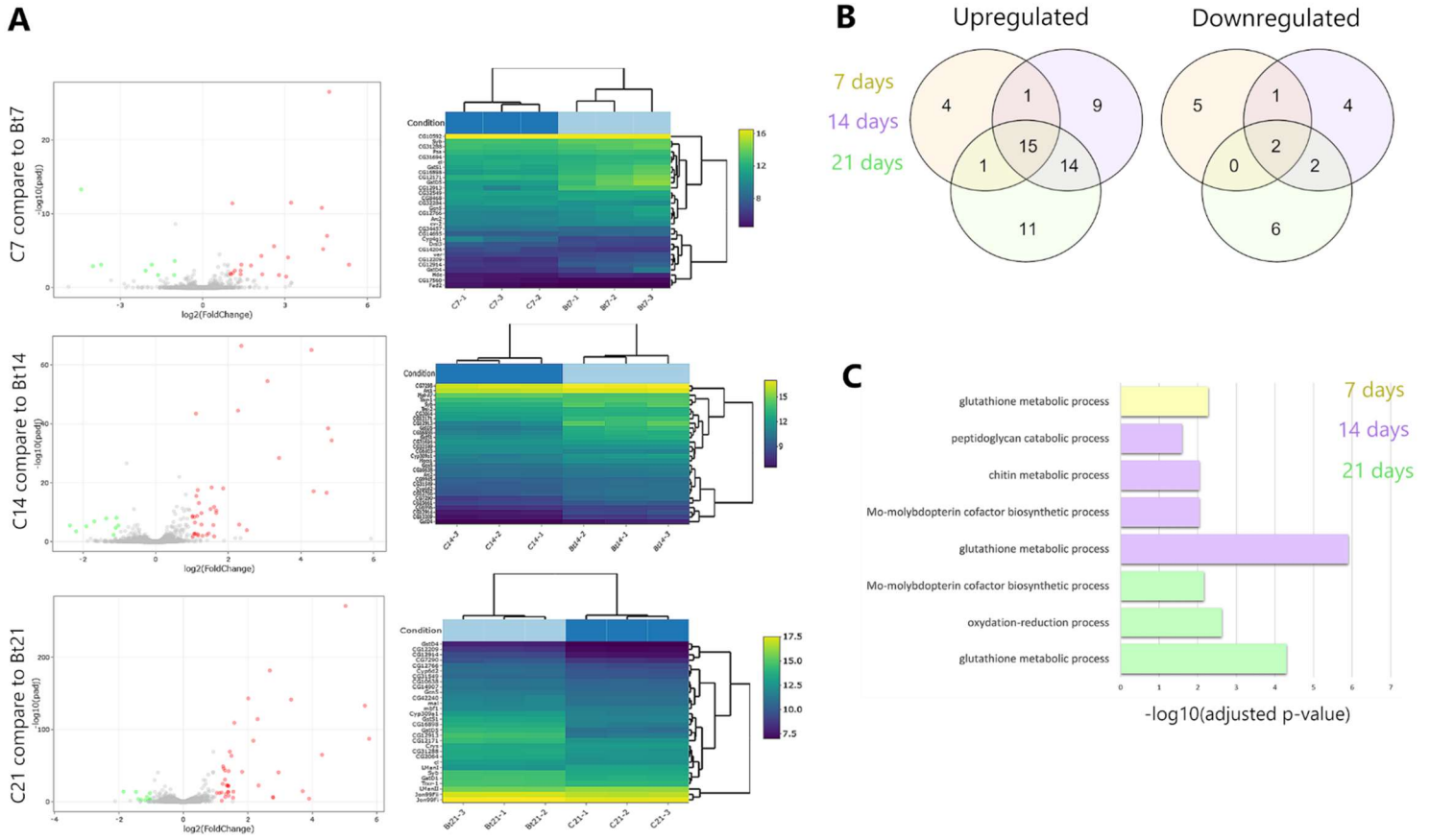


Figure 3

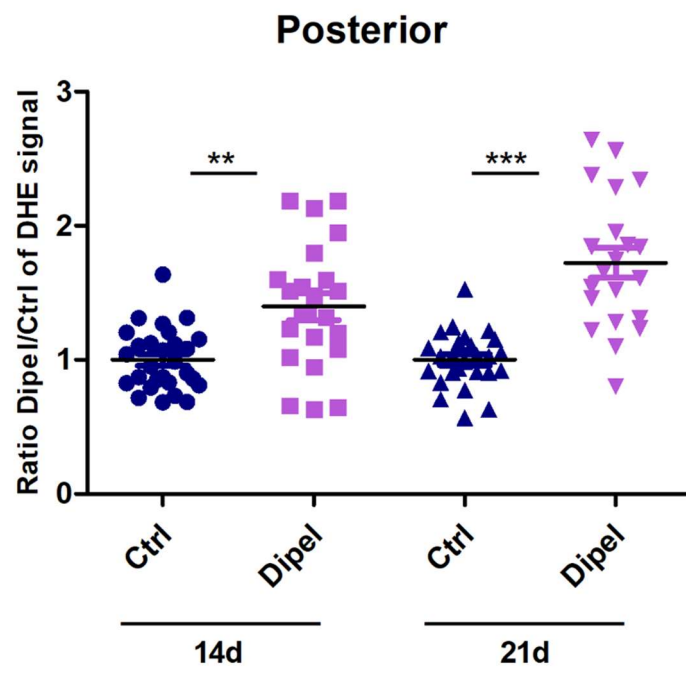
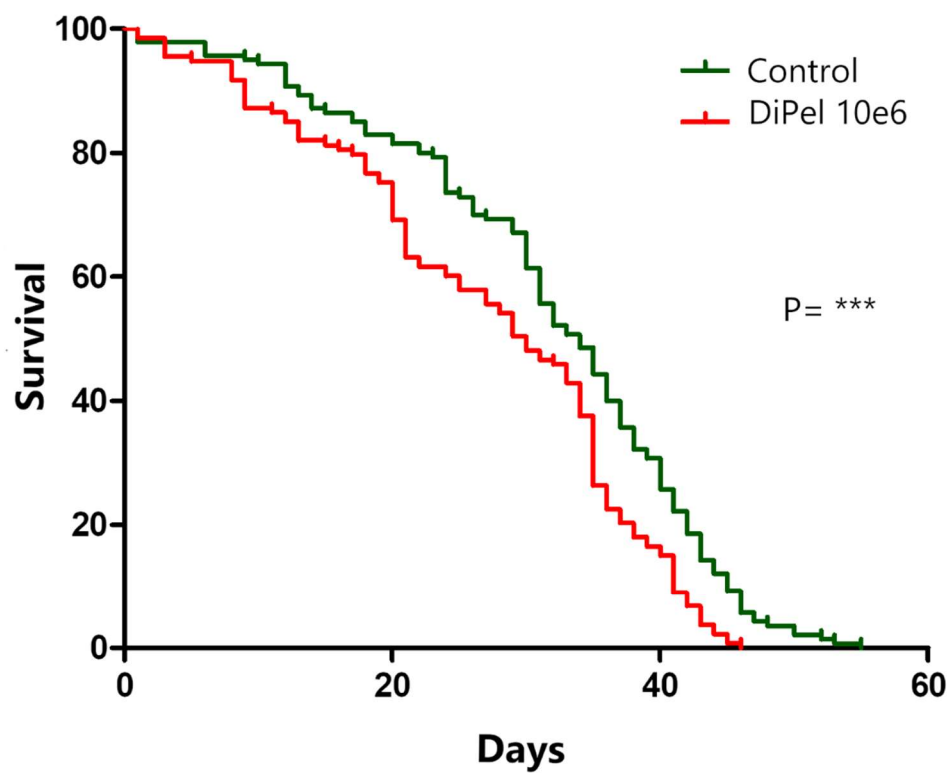
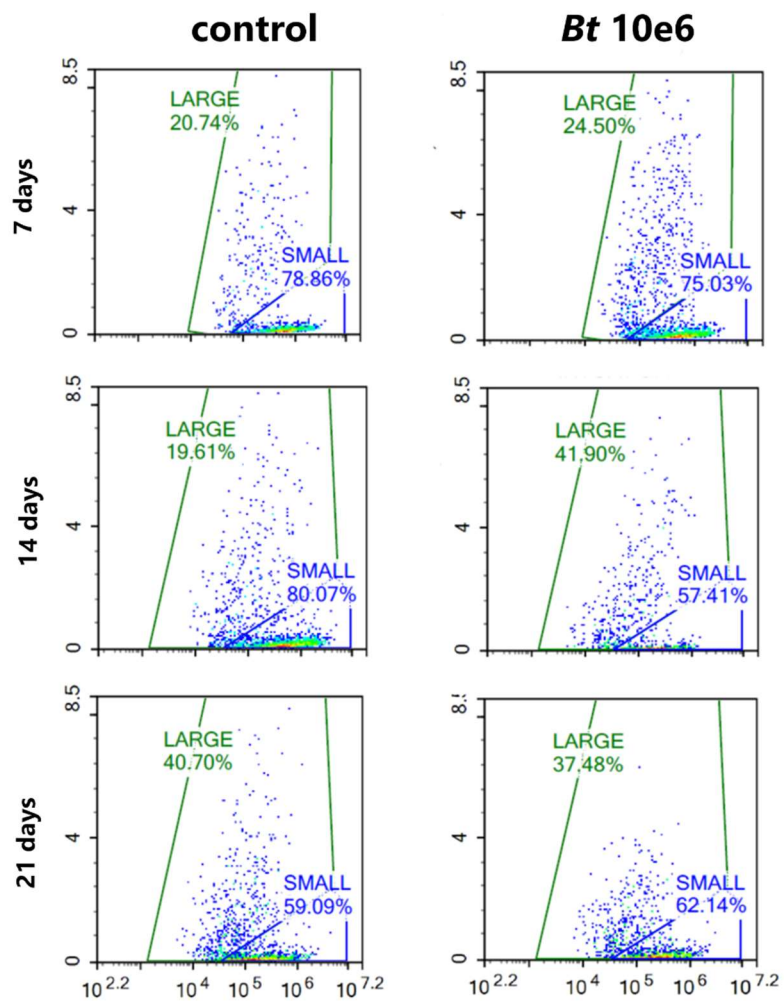


Figure 4



Supplemental 1

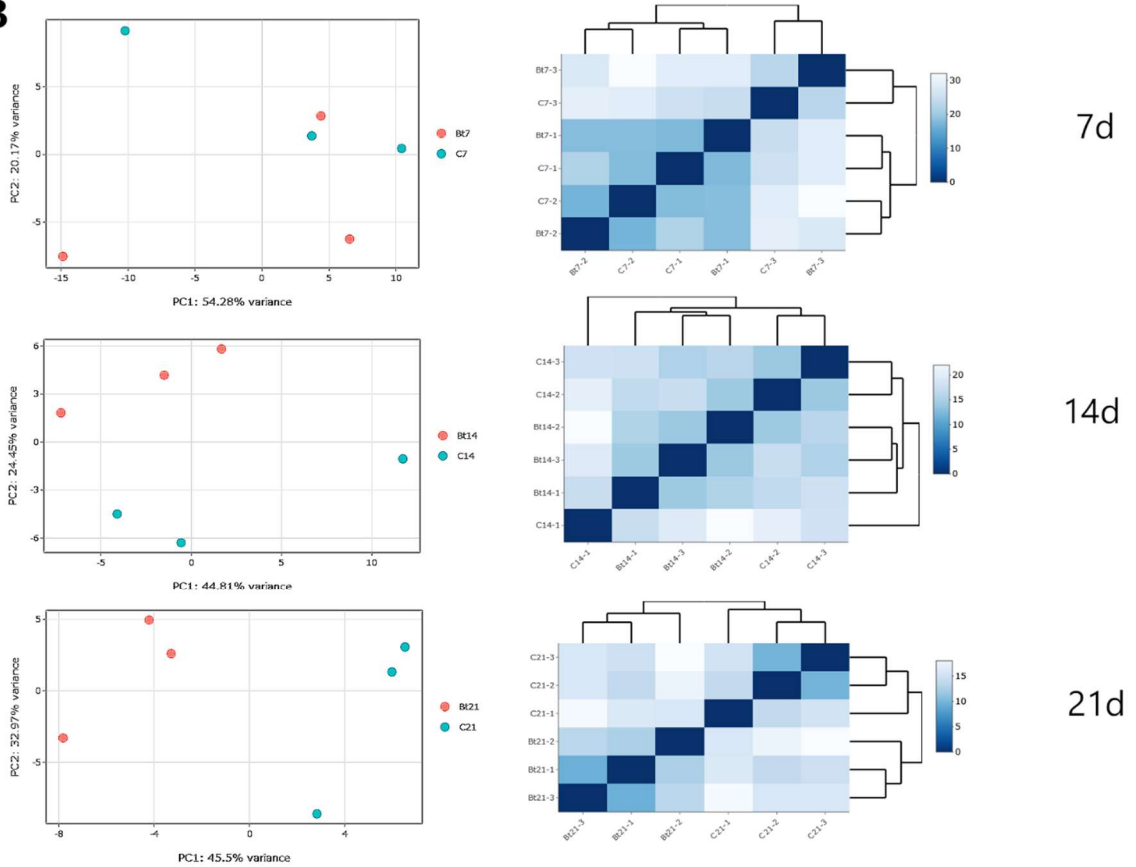


Supplemental 2

A

Sample ID	# Reads	Yield (Mbases)	Mean Quality Score	% Bases >= 30
RAR02_Bt14-1	39,897,856	11,969	35.20	90.07
RAR02_Bt14-2	37,638,440	11,292	35.15	89.85
RAR02_Bt14-3	37,186,573	11,156	35.11	89.65
RAR02_Bt21-1	59,808,132	17,942	35.14	89.78
RAR02_Bt21-2	40,540,424	12,162	35.07	89.50
RAR02_Bt21-3	37,990,685	11,397	35.17	89.94
RAR02_Bt7-1	44,742,035	13,423	34.98	89.06
RAR02_Bt7-2	33,650,662	10,095	35.04	89.34
RAR02_Bt7-3	35,960,570	10,788	35.10	89.69
RAR02_C14-1	35,339,945	10,602	34.92	88.88
RAR02_C14-2	27,277,216	8,183	34.68	87.82
RAR02_C14-3	41,032,917	12,31	35.14	89.79
RAR02_C21-1	31,308,457	9,393	35.16	89.90
RAR02_C21-2	51,065,075	15,32	35.12	89.67
RAR02_C21-3	35,749,926	10,725	35.05	89.43
RAR02_C7-1	33,248,138	9,974	35.09	89.64
RAR02_C7-2	31,588,207	9,476	35.05	89.45
RAR02_C7-3	40,966,969	12,29	35.06	89.41

B



Supplemental 3

Figure legends

Figure 1. Chronic ingestion of low doses of *Btk* spores with the diet reduces *Drosophila* lifespan independently of the gut microbiota

A. Survival assays at different doses of DiPel (*Btk*) B. Survival assay with homemade *Btk* spores from the DiPel product C. Survival assay of WT axenic flies with DiPel (*Btk*) at the 10^6 doses. Kaplan-Meier curves with Mantel-Cox test. Three experiments for 10^6 and 10^5 doses and one experiment for 10^4 and 10^3 doses. Three experiments for *Btk* spores and axenic fly assays.

Figure 2. Chronic *Btk* ingestion affects gut morphology, increases enteroendocrine cell number, promotes progenitor mis-differentiation, and alters septate junctions

A. Cross sections of control fly guts (upper panels) and guts after DiPel (*Btk*) ingestion B. EE counts in the R5 region with DiPel (*Btk*) ingestion, showing an increase of EE upon chronic *Btk* ingestion at 21 days. Two independent experiments Mann-Whitney test p -value=0.018 ; $n=14$ (control) and 15 (DiPel) C. Quantification of FACS experiments (%; on the right) representing both small (ISC) and large (regular or mis-differentiated EB) GFP progenitors. Mis-differentiation is clearly accelerated at day 14. For 7, 14 and 21 days respectively 3, 6 and 2 experiments D. Septate junction staining (Dlg) revealing that a loss upon DiPel (*Btk*) ingestion as early as day 7. E. Quantification of Dlg intensities show on D. Three experiments for each condition.

Figure 3. Transcriptome analysis of intestines exposed to chronic ingestion of *Btk* reveals an oxidative stress response

A. Global information (left) about differentially expressed genes (fold change greater than 2 and inferior to -2) in all conditions (control and *Btk* at 7-, 14- and 21-days of chronic ingestion) and top 30 of these genes (right) B. Number of the differentially expressed genes shared between the three conditions C. GO terms found in differentially expressed genes for each time point and revealing an enrichment of genes involved in ROS detoxification.

Figure 4. Chronic *Btk* ingestion increases ROS in the gut

ROS detected with the DHE probe in the gut upon *Btk* ingestion at days 14 and 21.

Supplementary S1.

Survival assay of WT flies when vials were changed every day, still showing an impact of *Btk* spores on longevity. *Kaplan-Meier curves with Mantel-Cox test p-value = 0.0002. Two experiments combined with n=140 (control) and n=133 (DiPel).*

Supplementary S2.

FACS profiles for population determination at 7, 14 and 21 days.

Supplementary S3.

A. Information on mapping reads **B.** Information on sample quality for 7, 14 and 21 days.

- Babin, A., Nawrot-Esposito, M. P., Gallet, A., Gatti, J. L., & Poirié, M. (2020). Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73145-6>
- Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 156–173. <https://doi.org/10.1006/rtp.2000.1426>
- Biggel, M., Jessberger, N., Kovac, J., & Johler, S. (2022). Recent paradigm shifts in the perception of the role of *Bacillus thuringiensis* in foodborne disease. In *Food Microbiology* (Vol. 105). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104025>
- Biteau, B., Hochmuth, C. E., & Jasper, H. (2008). JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell*, 3(4), 442–455. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.024>
- Biteau, B., Karpac, J., Supoyo, S., DeGennaro, M., Lehmann, R., & Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 6(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001159>
- Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., Radomski, N., Duboisset, A., Arar, C., Sarda, X., Vial, G., Mistou, M. Y., Firmesse, O., Hennekinne, J. A., & Herbin, S. (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. *PLOS ONE*, 16(2), e0246885. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0246885>
- Casida, J. E., & Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicology Research*, 6(6), 755. <https://doi.org/10.1039/C7TX00198C>
- Chen, J., Sayadian, A.-C., Lowe, N., Lovegrove, H. E., & St Johnston, D. (2018). An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLOS Biology*, 16(10), e3000041. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000041>
- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107438>
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Genet.37.110801.143042](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Genet.37.110801.143042), 37, 409–433. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.37.110801.143042>
- EFSA. (2018). Reply to the article “In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—a response to EFSA.” In *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 94, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX171>
- Ehling-Schulz, M., Koehler, T. M., & Lereclus, D. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0032-2018>
- Graham, C., Stefanatos, R., Yek, A. E. H., Spriggs, R. V., Loh, S. H. Y., Uribe, A. H., Zhang, T., Martins, L. M., Maddocks, O. D. K., Scialo, F., & Sanz, A. (2022). Mitochondrial ROS signalling requires uninterrupted electron flow and is lost during ageing in flies. *GeroScience*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00555-x>

- Hachfi, S., Benguettat, O., & Gallet, A. (2019). Hypochlorous Acid Staining with R19-S in the *Drosophila* Intestine upon Ingestion of Opportunistic Bacteria. *BIO-PROTOCOL*, 9(10). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3246>
- Hochmuth, C. E., Biteau, B., Bohmann, D., & Jasper, H. (2011). Redox regulation by keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*, 8(2), 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.006>
- Ignoffo, C. M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 217(1), 141–164. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1973.tb32756.x>
- Jneid, R., Loudhaief, R., Zucchini-Pascal, N., Nawrot-Esposito, M.-P., Fichant, A., Rousset, R., Bonis, M., Osman, D., & Gallet, A. (2022). *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins divert progenitor cells toward enteroendocrine fate by decreasing cell adhesion with intestinal stem cells. *BioRxiv*, 2022.04.13.488147. <https://doi.org/10.1101/2022.04.13.488147>
- Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., & Ehling-Schulz, M. (2018). Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01915>
- Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 153(4), 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>
- Lenicke, C., & Cochemé, H. M. (2021). Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. In *Molecular Cell* (Vol. 81, Issue 18, pp. 3691–3707). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguettat, O., Nawrot-Esposito, M.-P., Pauron, D., Amichot, M., & Gallet, A. (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development (Cambridge, England)*, 144(5), 808–819. <https://doi.org/10.1242/dev.142539>
- Marelja, Z., Leimkühler, S., & Missirlis, F. (2018). Iron sulfur and molybdenum cofactor enzymes regulate the *Drosophila* life cycle by controlling cell metabolism. *Frontiers in Physiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00050>
- McClintock, J. T., Schaffer, C. R., & Sjoblad, R. D. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. In *Pesticide Science* (Vol. 45, Issue 2, pp. 95–105). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.2780450202>
- Nakanishi, R., Shimizu, T., Kumagai, K., Takai, A., & Marusawa, H. (2021). Genetic Pathogenesis of Inflammation-Associated Cancers in Digestive Organs. *Pathogens*, 10(4), 453. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040453>
- Nawrot-Esposito, M.-P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J.-L., & Gallet, A. (2020). *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticides Induce Developmental Defects in Non-Target *Drosophila melanogaster* Larvae. *Insects*, MDPI, 2020(10), 697. <https://doi.org/10.3390/insects11100697>
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S., & Banerjee, U. (2008). Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nature Genetics*, 40(3), 356–361. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.50>

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/TOXINS6123296>
- Panday, S., Talreja, R., & Kavdia, M. (2020). The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104010>
- Raymond, B., & Federici, B. A. (2017). In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(7). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX084>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–194. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2010.02.006>
- Resnik-Docampo, M., Koehler, C. L., Clark, R. I., Schinaman, J. M., Sauer, V., Wong, D. M., Lewis, S., D'Alterio, C., Walker, D. W., & Jones, D. L. (2017). Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behaviour to maintain homeostasis. *Nature Cell Biology*, 19(1), 52–59. <https://doi.org/10.1038/ncb3454>
- Salazar, A. M., Resnik-Docampo, M., Ulgherait, M., Clark, R. I., Shirasu-Hiza, M., Jones, D. L., & Walker, D. W. (2018). Intestinal Snakeskin Limits Microbial Dysbiosis during Aging and Promotes Longevity. *ISCIENCE*, 9, 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.022>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. Van, Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Siegel, J. P. (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(1), 13–21. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.5000>
- Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/S00018-008-8330-9>
- Sobhani, I. (2004). *Helicobacter pylori* et cancer gastrique. In *Medecine/Sciences* (Vol. 20, Issue 4, pp. 431–436). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004204431>
- Wilcks, A., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., & Licht, T. R. (2006). Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00169.x>
- Zhu, W., Winter, M. G., Byndloss, M. X., Spiga, L., Duerkop, B. A., Hughes, E. R., Büttner, L., De Lima Romão, E., Behrendt, C. L., Lopez, C. A., Sifuentes-Dominguez, L., Huff-Hardy, K., Wilson, R. P., Gillis, C. C., Tükel, Ç., Koh, A. Y., Burstein, E., Hooper, L. V., Bäuml, A. J., & Winter, S. E. (2018). Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*, 553(7687), 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature25172>

III-3 Impact des bioinsecticides *Btk* sur le développement de pathologies inflammatoires et de cancers chez des individus génétiquement prédisposés

Alors que la première partie de l'étude sur l'impact de *Bt* portait sur des drosophiles adultes saines, la seconde partie du projet était d'étudier les effets sur des individus prédisposés génétiquement à développer des pathologies inflammatoires et des cancers de l'intestin.

III-3-1 Impact chez des individus de contexte pro-inflammé

La voie JNK est une voie de stress connue pour être activée en contexte inflammatoire et au cours du vieillissement. En effet, l'activation de la signalisation de la voie JNK induit la production de cytokines pro-inflammatoires Upds (IL-6 chez les mammifères). Chez les mammifères, il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, jouent un rôle prépondérant dans le développement de pathologies inflammatoires chroniques (telles que les MICI) et de cancers de l'intestin (voir introduction **I-3-1**). La voie JNK est également suractivée au cours du vieillissement et du développement de contexte dysplasique (voir introduction **I-3-3**). J'ai donc testé l'impact d'une ingestion chronique du produit DiPel (*Btk*, voir article de la partie précédente (Résultats **III-2**), protocole et dose utilisées identiques, température 29°C) sur l'intestin de drosophile présentant un contexte pro-inflammatoire en induisant une suractivation de la voie JNK. Afin de stimuler modérément l'activation de la voie JNK, j'ai utilisé un mutant du régulateur négatif de la voie, *puc* (mutant *puc^{E69}*). Avec cet outil, j'ai généré des drosophiles hétérozygotes *puc^{E69/+}*, qui présentent donc une faible suractivation de la voie JNK. J'ai dans un premier temps étudié l'impact de *Bt* sur la durée de vie de ces drosophiles que je qualifierai par la suite d'individus « pro-inflammés » (**Fig. 22A**).

J'ai observé que l'ingestion chronique de *Bt* avait un impact négatif significatif ($p = 2.41e-05$) sur la durée de vie des drosophiles *esg>GFP*. En effet, elles perdent 50% de leur population à partir de 28 jours d'ingestion chronique de *Bt*, contre 32 jours pour les drosophiles contrôles. (**Fig. 22A**). J'ai également observé qu'en l'absence de *Bt*, un contexte pro-inflammé (*esg>GFP ; puc^{E69/+}*) avait un impact négatif significatif ($p = 0.0243$) sur la durée de vie des individus (probabilité de survie à 50% : 28 jours). Lors de l'ingestion de *Bt*, ces individus pro-inflammés subissent une baisse encore plus importante de leur durée de vie que les individus *esg>GFP* ($p < 2e-16$). En effet, les drosophiles pro-inflammées perdent 50% de leur population

après seulement 20 jours d'ingestion chronique de *Bt*, ce qui signifie une perte de 28,5% d'espérance de vie contre seulement 12,5% en contexte sain. Ces résultats montrent que les drosophiles portant un contexte pro-inflammatoire sont plus sensibles aux effets à long terme de l'ingestion chronique de *Bt*, entraînant une mortalité encore plus précoce. En visualisant par microscopie des intestins disséqués à différents temps au cours de l'intoxication (4, 7, 14, 21 jours), j'ai observé que les intestins de drosophiles saines (*esg>GFP*) semblaient présenter un contexte de dysplasie visible ici à 21 jours en condition *Bt* qui n'était pas présent en condition contrôle (**Fig. 22B**). Ces résultats confirment les effets décrits précédemment (*Joly, Soltys et al., manuscrit en préparation*) à savoir que l'ingestion chronique de *Bt* provoque sur le long terme une mauvaise différenciation des progéniteurs, visible par la GFP présente dans des amas de cellules et de façon atténuée. De façon frappante, j'ai observé en condition pro-inflammée qu'un tel contexte apparaissait bien plus précocement, visible dès 4j, lors de l'ingestion chronique de *Bt*. J'ai également observé par marquage anti-PH3 chez les individus pro-inflammés une hyperprolifération des ISC, qui est encore plus augmentée par *Bt* (**Fig. 22C**). L'ensemble de ces résultats montrent que l'ingestion chronique de *Bt* favorise le développement d'une dysplasie chez des individus sains, et provoque très précocement ce contexte pathologique chez des individus pro-inflammés portant une mutation provoquant une légère suractivation de la voie JNK.

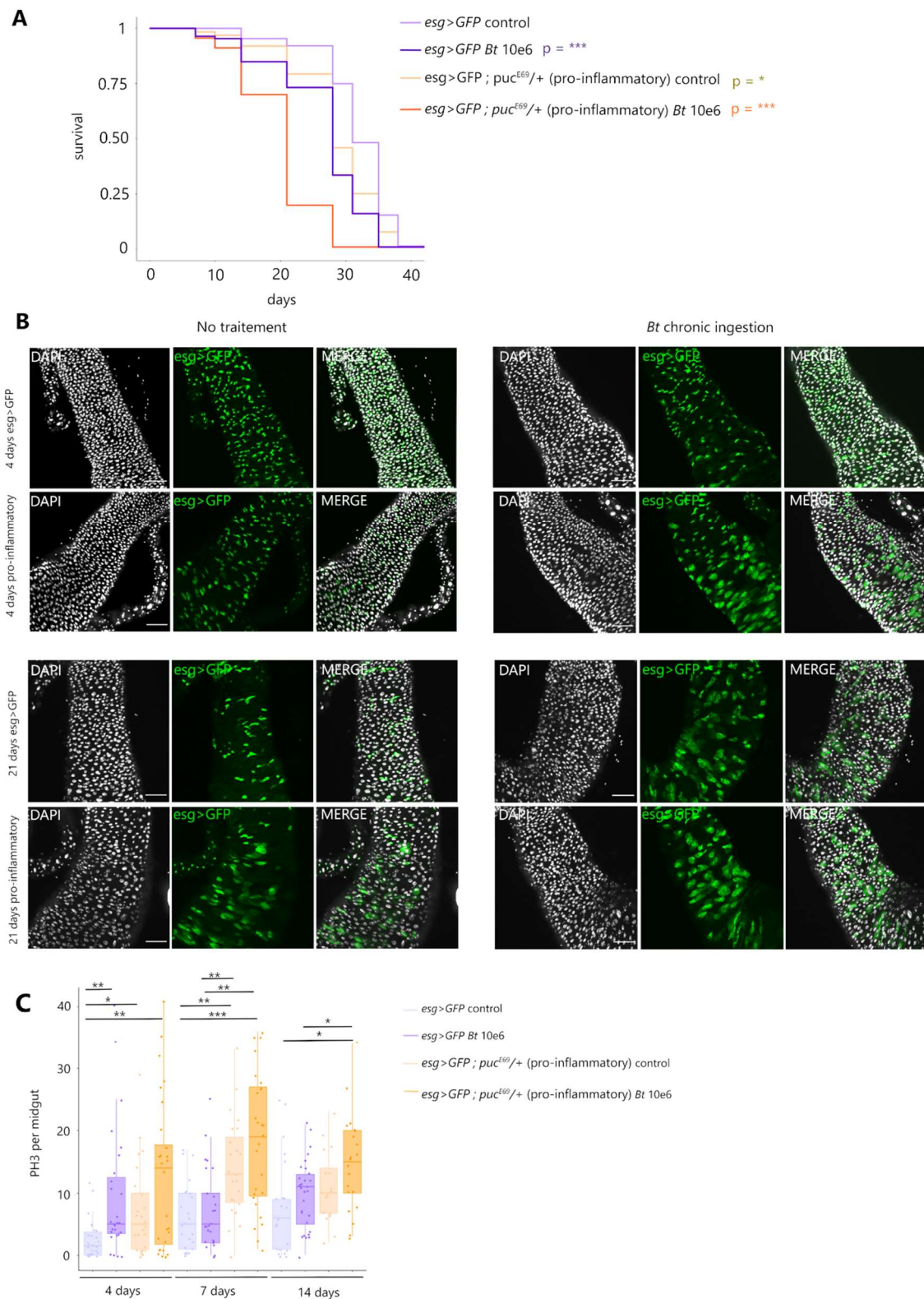


Figure 22 : Impact de Bt sur des drosophiles pro-inflammées.

A. Suivre de la mortalité de drosophiles *esg>GFP* et pro-inflammées (suractivation de la voie JNK en contexte hétérozygote *puc^{E69}/+*) lors d'une ingestion chronique de Bt. (Test coxph sur courbe de Kaplan-Meier : P-value (on ne sait pas entre qui et qui ? écrit p-value dans figure suivante) = $2.41e-05$ (violet); 0.0243 (vert); $< 2e-16$ (orange)) **B.** Mis-différenciation des progéniteurs des drosophiles *esg>GFP* et pro-inflammées lors d'une ingestion chronique de Bt. Barre d'échelle $50\mu\text{m}$. **C.** Hyperprolifération des progéniteurs avec la quantification du nombre de cellules PH3-positives par intestin de drosophiles *esg>GFP* et pro-inflammées *esg>GFP*; *puc^{E69}/+* lors d'une ingestion chronique de Bt. (Statistiques et P-values en **tableau 2**).

	CSctrl_14d	CSctrl_4d	CSctrl_7d	CSintox_14d	CSintox_4d	CSintox_7d
CSctrl_4d	0.04269	-	-	-	-	-
CSctrl_7d	0.77762	0.05153	-	-	-	-
CSintox_14d	0.16853	2.4e-05	0.03023	-	-	-
CSintox_4d	0.77762	0.00345	0.40712	0.33596	-	-
CSintox_7d	0.92061	0.00473	0.66435	0.11825	0.77762	-
INFLctrl_14d	0.12652	0.00012	0.02976	0.77762	0.17236	0.07850
INFLctrl_4d	0.83681	0.02976	0.85882	0.05976	0.54099	0.69036
INFLctrl_7d	0.02947	7.3e-06	0.00318	0.09646	0.02976	0.00768
INFLintox_14d	0.01388	5.7e-06	0.00129	0.04767	0.02762	0.00362
INFLintox_4d	0.30601	0.00362	0.11825	0.69854	0.57779	0.32489
INFLintox_7d	0.00318	4.2e-06	0.00038	0.01376	0.00574	0.00129
	INFLctrl_14d	INFLctrl_4d	INFLctrl_7d	INFLintox_14d	INFLintox_4d	
CSctrl_4d	-	-	-	-	-	
CSctrl_7d	-	-	-	-	-	
CSintox_14d	-	-	-	-	-	
CSintox_4d	-	-	-	-	-	
CSintox_7d	-	-	-	-	-	
INFLctrl_14d	-	-	-	-	-	
INFLctrl_4d	0.04492	-	-	-	-	
INFLctrl_7d	0.32489	0.00473	-	-	-	
INFLintox_14d	0.17209	0.00325	0.77762	-	-	
INFLintox_4d	0.92061	0.22256	0.49285	0.34518	-	
INFLintox_7d	0.06296	0.00092	0.22830	0.33540	0.07261	

Tableau 2: P-values du graphique de la Figure 3C.

Test de Kruskal et Wallis (post-hoc Pairwise comparisons using Wilcoxon rank)

III-3-2 Impact chez des individus en contexte pro-tumoral

J'ai également recherché les conséquences d'une ingestion chronique de *Bt* sur des individus présentant des défauts dans la voie pro-oncogénique Wnt/Wg. Celle-ci est l'une des voies clés de la régulation du maintien de l'identité des cellules souches et de leur prolifération chez les mammifères et la drosophile. Elle est également étroitement associée au cancer : son rôle dans la carcinogenèse a été maintes fois décrite dans le cancer colorectal et une dérégulation de cette voie est observée dans de nombreux autres types de cancers. L'activation de la voie de signalisation Wnt/Wg causée par la mutation du gène *APC* est un événement critique dans le développement du cancer du côlon (voir Introduction I-3-2).

J'ai utilisé des drosophiles hétérozygotes pour un mutant *APC* (*esg>GFP ; APC^{Q8/+}*) afin de tester si l'ingestion répétée de produits *Bt* peut aggraver la condition d'individus sensibilisés (individus pro-tumoraux). J'ai observé qu'en l'absence de *Bt*, un contexte pro-tumoral avait un impact négatif significatif (p -value = 0.00448) sur la durée de vie des individus (**Fig. 23**). En effet, elles perdent 50% de leur population à partir de 32 jours d'ingestion chronique de *Bt*, contre 35 jours pour les drosophiles saines. . Lors de l'ingestion chronique de *Bt*, ces individus pro-tumoraux subissent une baisse alarmante de leur durée de vie : ils perdent 50% de leur population dès 14 jours, ce qui représente une réduction de 56% de leur espérance de vie. Les drosophiles saines (*esg>GFP*) perdent 50% de leur population après environ 25 jours d'ingestion chronique, ce que représente 28% d'espérance de vie en moins. Ces résultats montrent de façon frappante qu'une suractivation de la voie Wnt/Wg sensibilise terriblement les mouches à l'ingestion des produits *Bt*, entraînant une mortalité vraiment très précoce.

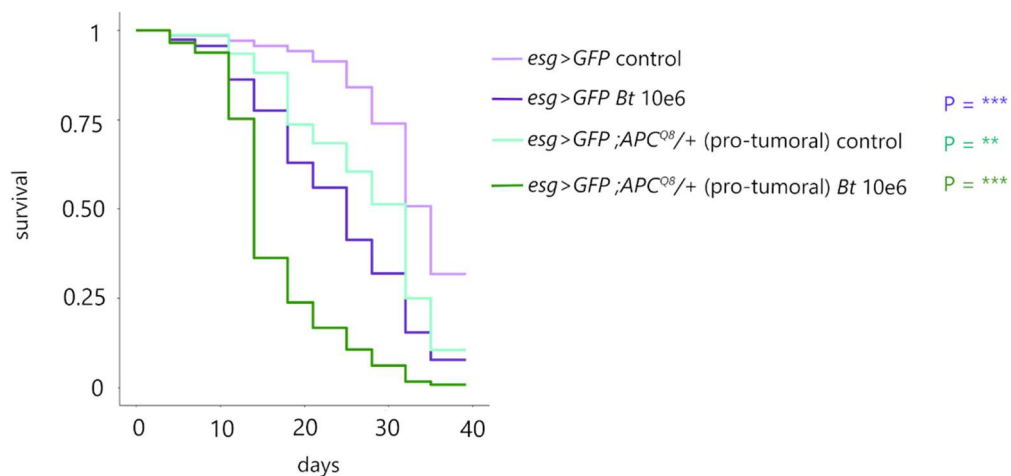


Figure 23 : Impact d'une ingestion chronique de *Bt* sur la survie des drosophiles portant une mutation pro-tumorale

(Test coxph sur courbe de Kaplan-Meier : p -value = $9.25e-07$ (violet foncé) ; 0.00448 (bleu) ; $< 2e-16$ (vert))

PARTIE III : DISCUSSION

III-1 Rôle des protéines Polycomb dans l'homéostasie de l'intestin

J'ai montré que des membres des PcG jouaient un rôle important dans la régulation des ISC chez la drosophile. De ce fait, ce travail fournit un exemple supplémentaire de cellules souches adultes dans lesquelles les PcG sont impliqués. Les PcG jouent ainsi un rôle direct dans la capacité de l'intestin à maintenir son homéostasie et à se régénérer en cas d'agressions. J'ai montré par perte de fonction totale ou partielle (mutant/RNAi/DDN) que les sous-unités Psc et Su(z)2 de PRC1 agissent de façon redondante afin de maintenir l'identité des ISC et leur capacité à générer des cellules différenciées. Grâce à la technique du RNAi, j'ai identifié les protéines Sce et Ph (du PRC1), et E(z) (du PRC2) comme également impliquées dans cette fonction. De façon surprenante, une perte de fonction totale pour *Sce*, *ph* et *E(z)* avec le système MARCM n'impacte pas la physiologie des ISC, contrairement au RNAi (données non présentées). Alors que le RNAi induit une perte d'expression via un promoteur qui est actif en continu, la technique du MARCM permet de générer des clones homozygotes mutants dans des cellules en division, au cours de la mitose. La différence observée dans les phénotypes générés pourrait donc être expliquée par le fait que le « *timing* » d'induction de la perte de fonction est différent. L'ISC en division fait face à des mécanismes moléculaires différents de l'ISC en stade G1. La structure de la chromatine est impactée au cours du cycle cellulaire et les PcG pourraient être différenciellement recrutés au cours de ces processus pour des besoins différents, expliquant que la perte de fonction de ces protéines à des moments distincts puisse impacter diversement le comportement de la cellule. La perte de fonction par mutant ou par RNAi n'a pas permis d'identifier Pc, Scm, RYBP, Kdm2 et Su(z)12 comme sous-unités impliquées dans la fonction suppresseur de tumeur des PcG. L'ensemble des résultats obtenus permettent de pointer du doigt le fait que l'activité catalytique du PRC1 (portée par Sce) et celles du PRC2 (portée par E(z)) sont importantes dans le maintien des ISC et leur correcte régulation. Cependant, le mécanisme canonique de PRC1/2 implique que les sous-unités Pc, Su(z)12 et en moindre mesure Scm soient impliquées. Or, les résultats obtenus n'ont pas permis de les identifier comme tels et ont également permis d'écarter l'implication de complexes non-canoniques de PRC1 impliquant RYBP et Kdm2. Il est intéressant de garder en mémoire que la perte de

fonction par RNAi de *Pc* dans les progéniteurs, même si elle ne génère pas de clone tumoral, mène à la perte de la capacité à générer des cellules de la lignée EE (Tauc et al., 2021). *Pc* est donc impliquée d'une autre façon, ou en d'autres proportions, à la génération de cellules différenciées. Les protéines PcG agissent en complexes de façon dynamique, et une même protéine peut intervenir dans plusieurs d'entre eux. L'ensemble de mes résultats obtenus illustre bien la complexité des mécanismes qui peuvent être mis en jeu, et mettent en lumière le travail qu'il reste à effectuer pour élucider les diverses fonctions des PcG et les complexes spécifiques associés. L'implication de ces protéines font entrer en jeu leur associations, le « *timing* » dans lequel elles agissent, mais également les quantités de chacune d'entre elles.

J'ai également recherché les signaux moléculaires pouvant être ciblés par la régulation des PcG. La fonction principale de cette famille de gènes étant la répression génique, j'ai recherché le niveau d'activation des différentes voies de signalisation connues pour réguler l'homéostasie et la régénération de l'intestin dans les clones tumoraux. Ainsi, je n'ai pas détecté d'activité des voies Notch, ERK (EGFR, IIS), Hippo/Yki et Wg/Wnt. En revanche, j'ai détecté une activation des voies JNK et BMP/Dpp dans les clones tumoraux générés. En modulant l'activité de ces voies (activation/repression), je n'ai observé aucun impact sur la génération et la propagation des clones tumoraux, signifiant que ces signaux ne sont pas cruciaux pour générer le phénotype observé. Dans la littérature, l'activation de la voie Dpp/BMP permet de contrôler négativement la prolifération des ISC. Une mutation d'un composant de la voie ou d'un ligand génère des clones dont les ISC génèrent l'ensemble des cellules différenciées du tissu tout en continuant de s'autorenouveler de façon plus rapide (Zheng Guo et al., 2013; Aiguo Tian & Jiang, 2014). Une suractivation de la voie empêcherait ainsi une surprolifération des ISC. Une dérégulation de la voie Dpp/BMP (sursactivation/perte d'activation) ne permet donc pas de générer les tumeurs observées dans notre cas. La suractivation de la voie JNK dans les ISC est documentée pour induire une hyperprolifération des ISC et générer des clusters de cellules *esg*-positives contenant des cellules Delta-positives. Là encore, une suractivation de la voie JNK ne suffirait pas à expliquer le phénotype observé (Benoît Biteau et al., 2008). J'ai également observé une forte activation consistante de la voie JAK/STAT dans les clones, constituant probablement le signal majoritaire de leur capacité à se diviser. Il est intéressant de réaliser que dans les ISC, la signalisation JAK/STAT est habituellement active, et qu'elle est également retrouvée dans ces cellules qui ne possèdent plus rien de « cellules souches », mis à part leur capacité de division. Cependant, la signalisation JAK/STAT à elle seule ne peut pas expliquer le phénotype observé. La suractivation de la voie dans les progéniteurs par la surexpression des ligands *Upds* ou de

composants de la voie provoque une hyperprolifération, la différenciation des progéniteurs et induit une hyperplasie dans l'intestin (Bausek, 2013; Beebe et al., 2010). J'ai observé une perte de la signalisation Delta-Notch entre les cellules des clones tumoraux. Cependant, la perte du ligand Delta et donc de la signalisation Notch dans les cellules avoisinantes ne peut également pas expliquer le phénotype obtenu. En effet, la perte de signalisation Notch entraîne une augmentation du nombre de cellules souches, une augmentation du nombre d'EE et une perte d'EC (Bardin et al., 2010; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2007). Des clones MARCM générés à partir d'ISC exprimant un RNAi dirigé contre Notch contiennent uniquement de petites cellules correspondant aux ISC et à des cellules de la lignée entéroendocrine Prospero-positives (Sallé et al., 2017). Dans notre cas, nous pouvons proposer que la perte du ligand Delta dans l'ISC induit une incapacité à activer le récepteur Notch de manière juxtacrine et conduit à un échec de l'activation de la signalisation Notch et du processus de différenciation dans les cellules filles. De façon intéressante, Su(H) constitue un marqueur de l'identité des EB. L'absence de signalisation Notch dans les cellules tumorales exclue ainsi le fait qu'elle soient des EB. L'absence de signalisation ERK que j'ai observée ne peut également pas expliquer le phénotype obtenu. Une perte d'activité de la voie EGFR dans les ISC diminue drastiquement leur prolifération sans altérer leur identité et leur survie (Benoît Biteau & Jasper, 2011). Il en est de même avec une absence de la voie IIS qui réduit la prolifération des ISC (Choi et al., 2011). Nous n'avons également pas observé de signalisation Hippo/Yki, ni Wg/Wnt, connues pour favoriser la prolifération des ISC. Une mutation de Yki dans les ISC n'affecte pas/peu leur prolifération tandis qu'une perte de signalisation Wg/Wnt dans les ISC réduit leur capacité à proliférer (Karpowicz et al., 2010; Lin et al., 2010). De ce fait, l'absence de ces signalisations n'explique là encore pas le phénotype obtenu. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel phénotype de tumeur néoplasique dérivée d'ISC est décrit dans l'intestin de la drosophile. Bien que les différentes voies de signalisation aient été beaucoup étudiée individuellement, la manière dont ces voies sont intégrées les unes aux autres pour maintenir les ISC et réguler les modes de différenciation restent mal connue. Les PcG pourraient être ainsi des facteurs clés de cette régulation.

Afin de consolider les résultats obtenus et d'aller plus loin, des expériences de MARCM sont en cours afin d'exprimer une forme dominante négative du récepteur Dome et un RNAi contre le facteur de transcription STAT92E dans un contexte mutant *Psc/Su(z)2*. Ces expériences permettront d'inhiber la voie JAK/STAT spécifiquement dans les clones tumoraux, et il sera intéressant d'observer si cela permet d'empêcher ou pas la formation de ces tumeurs. La

préparation d'échantillons d'ARN pour RNA-séquençage est également en cours, le but étant de comparer le transcriptome de progéniteurs contrôles (*esg>GFP*) avec celui des cellules tumorales ayant perdu la fonction de *Psc/Su(z)2* (*esg>GFP, Psc/Su(z)2i*). Cela permettra de caractériser des cibles transcriptionnelles de l'action des PcG, et donc d'identifier les gènes qui permettent de maintenir l'identité des ISC. En parallèle, j'ai préparé des échantillons contenant des cellules *esg>GFP* afin de réaliser une expérience de « *Cut and Run* » qui est en cours de réalisation en collaboration avec Anne-Marie Martinez et le laboratoire de Giacomo Cavalli à Montpellier. Pour réaliser ces échantillons, j'ai disséqué des intestins *esg>GFP* que j'ai ensuite dissociés avant de trier les cellules GFP-positives par FACS. En utilisant des anticorps dirigés contre les marques d'histones H3K27me3 et H2A118ub, ces expériences (réalisées à Montpellier par Lauriane Fritsch) permettront de déterminer dans ces cellules où les marques dépendantes de l'activité des PRC1/2 sont localisées sur le génome. Croisées avec le RNA-séquençage décrit précédemment, ces données permettront de pointer du doigt les cibles transcriptionnelles directes des PcG dans les ISC. Enfin, ce même laboratoire (Victoria Parreno et Anne-Marie Martinez) réalise des expériences d'allogreffes (implantations successives des clones tumoraux marqués à la GFP (*esgF/O>GFP ;Psc/Su(z)2i*) dans l'abdomen de drosophiles) afin de déterminer le développement tumoral et d'évaluer le pouvoir malin ou bénin de ces cellules. L'ensemble de mes résultats déjà acquis et ceux à venir permettront d'approfondir la connaissance récente du rôle des PcG dans les cellules souches adultes, en caractérisant leur mécanisme d'action dans les ISC.

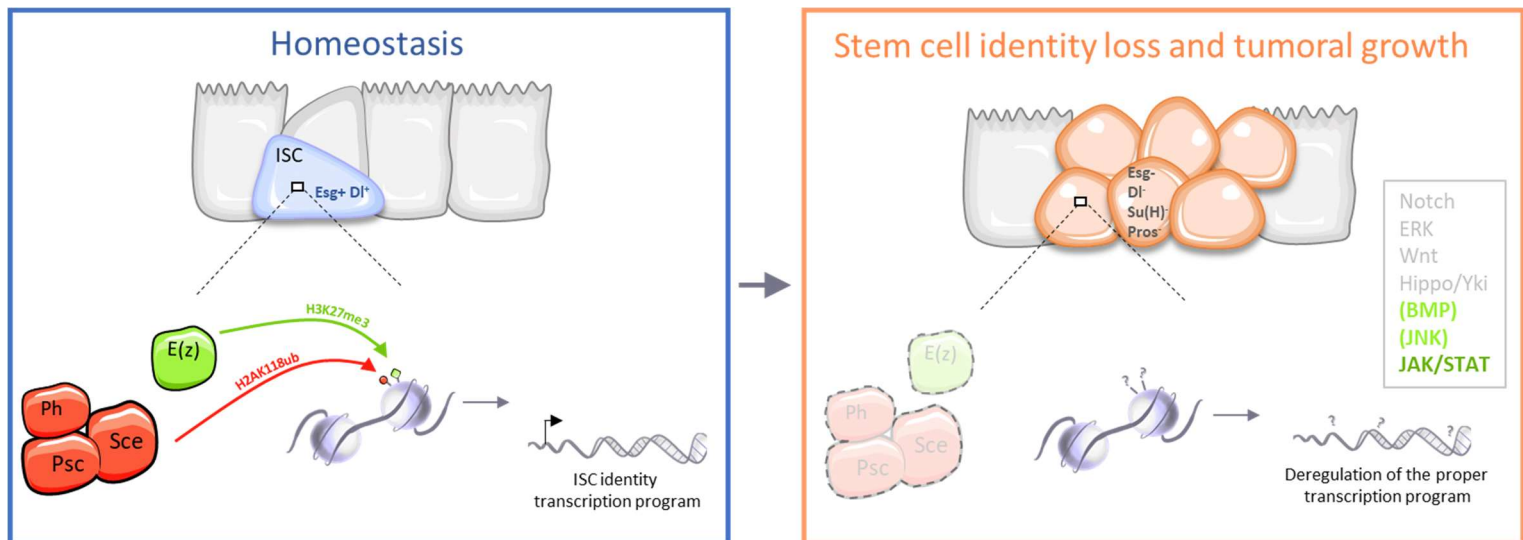


Figure 24: Modèle d'action des PcG dans les ISC chez la drosophile

Le core du PRC1 (Sce et Psc/Su(z)2) additionné de Ph et de la sous-unité catalytique du PRC2 (E(z)) sont nécessaires à un programme transcriptionnel permettant le maintien de l'identité « cellule souche ». La perte de l'une de ces protéines induit une dérégulation de ce programme menant à une perte de l'identité « cellule souche » et une croissance tumorale.

III-2 Rôle des E3 ubiquitines ligases dans l'homéostasie intestinale

III-2-1 Perte de fonction des E3 ub.L connues pour interagir avec Psc ou BMI1

Il serait intéressant d'étudier la cause de la perte des progéniteurs en condition de perte de fonction de *hyd*. On peut imaginer que la perte de *hyd* induit la différenciation forcée des progéniteurs, menant ainsi à leur disparition, ou encore leur mort par apoptose. Il est intéressant de noter que des résultats antérieurs de l'équipe ont montré que la surexpression de Psc menait à un phénotype similaire à celui obtenu avec la perte de fonction *hyd*. De plus, comme je l'ai énoncé précédemment, son homologue UBR5 interagit avec BMI1 l'homologue de Psc chez les mammifères. Si tel est le cas chez la drosophile, il est possible que Hyd et Psc interagissent également ensemble et de ce fait, que Hyd constitue un régulateur négatif de Psc. Psc pourrait être ainsi ubiquitinée par Hyd et envoyée à dégrader afin de contrôler sa quantité de protéine, expliquant ainsi que le phénotype de perte de fonction de *hyd* soit identique à celui de gain de fonction de Psc. Dans les discs imaginaux d'ailes comme chez les cellules humaines, Hyd/UBR5 catalyse l'ubiquitination du co-répresseur Groucho (Gro)/TLE, permettant ensuite l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Flack et al., 2017). La perte de Hyd pourrait induire une accumulation de Gro, empêchant l'expression des gènes cibles de la voie Wnt dans l'intestin comme dans les discs imaginaux d'ailes. La perte d'activation de la voie Wnt entraîne la perte des cryptes intestinales et des altérations des lignées différenciées chez les mammifères (Mah et al., 2016). Chez *Drosophila*, une étude de 2017 a montré un rôle des co-répresseurs Gro et CtBP (*C-terminal binding protein*) dans l'inhibition latérale médiée par Notch lors de la différenciation des ISC (X. Guo, Huang, et al., 2019). Gro agit dans les EB avec la protéine E(spl)-C pour supprimer l'expression de Delta, inhiber l'entrée du cycle cellulaire et favoriser la différenciation cellulaire, tandis que CtBP fonctionne spécifiquement dans les ISC pour médier la répression transcriptionnelle des cibles de Su(H) et maintenir le destin des ISC. Les auteurs ont montré que la perte d'expression de Gro provoquait une accumulation de cellules ISC Delta-positives ISC, et que sa surexpression avait un impact négatif sur la prolifération des ISC (X. Guo, Huang, et al., 2019). Il est donc envisageable que la perte de fonction de *hyd* mène

à l'accumulation de Gro dans les ISC, et que ces ISC soient perdues face à leur capacité de renouvellement amoindries.

Dans les cellules S2 de drosophile, LmgA est une protéine essentielle du complexe APC (Anapase-promoting complex) permettant la poly-ubiquitination de la cycline B afin de l'envoyer à dégrader par le protéasome. La cycline B est un facteur important de la progression du cycle cellulaire et sa dégradation est un processus nécessaire à la transition du cycle en G2/M. En absence de sa dégradation, les cellules restent bloquées au point de contrôle et ne peuvent progresser dans le cycle. Selon ces observations, la perte de LmgA devrait provoquer une accumulation de cycline B et ainsi empêcher les ISC de se diviser. De cette façon, nous nous attendions à observer une perte des cellules progénitrices puisqu'elles sont incapables de se diviser. Or, les résultats obtenus ne sont pas en accord avec ce raisonnement car le RNAi *lmgA* dans les ISC ne génère pas de phénotype. L'induction du RNAi étant de 14 jours, il serait intéressant de réitérer l'expérience avec une induction qui dure plus longtemps (4 semaines par exemple) pour voir si une durée plus longue de perte de fonction de *lmgA* permettrait de faire de telles observations.

III-2-2 Crible RNAi de la perte de fonction des E3 ub.L codées par le génome de la drosophile

Les résultats de ce crible ont permis de révéler un rôle pour certaines E3 ub.L au sein des progéniteurs de l'intestin. Certaines d'entre elles possèdent un nom et une fonction connue dans d'autre tissus, tandis que d'autres ne possèdent à ce jour pas encore de nom et de fonction établie. Il serait très intéressant d'étudier ces protéines « inconnues » afin d'élargir la connaissance sur leurs fonctions. Parmi les protéines qui possèdent une fonction connue, **Cbl** est une protéine proto-oncogénique dont le rôle est d'ubiquitiner des composants de signalisations induites par les RTK (récepteurs tyrosines kinases), et notamment les signalisations EGFR, VEGFR et FGFR majoritairement connues pour leur rôle prolifératif. Il n'est donc pas inattendu d'observer en l'absence de Cbl une surprolifération des progéniteurs. Un tel phénotype d'hyperprolifération lors de la perte de fonction de *Cbl* a en fait déjà été décrit dans la littérature (Gervais et al., 2019; H. Jiang et al., 2011; X. Zeng et al., 2015). Le résultat obtenu permet ainsi de fournir un contrôle positif du crible réalisé.

Rnf146 est une autre E3 ub.L connue, décrite pour avoir un rôle dans la protéolyse de la protéine Axin de la voie Wg/Wnt afin de contrôler la prolifération des ISC. En effet il a été montré dans l'intestin de la drosophile que la perte de *Rnf146* impliquait une accumulation d'Axin. L'augmentation de la protéine Axin dans les entérocytes provoque la production de cytokines Upd qui vont ainsi stimuler l'activité de la voie JAK-STAT dans les ISC (Gultekin & Steller, 2019). Le phénotype observé de surprolifération des progéniteurs constitue également un contrôle positif du crible réalisé. Il faut cependant noter qu'une autre étude conclue que Rnf146 n'est pas nécessaire pour réguler la prolifération des ISC pendant l'homéostasie (Z. Wang et al., 2019). Enfin, parmi les protéines dont la perte de fonction induit une hyperprolifération des progéniteurs, **Kcmfl** est impliquée dans la régulation négative de la signalisation Ras-MAPK dans les ailes de la drosophile (Ashton-Beaucage et al., 2016). Il n'est donc pas surprenant d'observer une hyperprolifération des progéniteurs en son absence, suggérant que Kcmfl pourrait avoir un rôle similaire dans l'intestin.

Bre1 est une E3 ub.L qui interagit avec une E2 ub.L codée par *Ubc6* afin de diriger l'ubiquitination spécifique de l'histone H2B sur la lysine 120 au niveau de la plupart des gènes transcrits (Bray et al., 2005). Cette action favorise le dépôt de méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3, marque connue comme activatrice de la transcription. J'ai observé que la perte de fonction de *Bre1* dans les progéniteurs intestinaux provoque une perte partielle des cellules *esg*-positives (**Fig. 21**). Bre1 pourrait donc permettre l'activation de la transcription de gènes important pour le maintien des ISC. Les pertes de fonction de *mib1* (*mind bomb 1*) et *dx* (*deltex*) provoquent également une diminution des cellules *esg*-positives. De façon très intéressante, ces deux E3 ub.L sont impliquées dans la régulation de la voie Notch. Par son activité enzymatique, Mib1 joue un rôle crucial dans l'activation des ligands de la voie Notch et leur endocytose (Le Borgne et al., 2005). J'ai observé que sa perte d'activité induisait une perte totale des cellules *esg*-positives dans le R4, et diminuait leur densité dans le reste de l'intestin. Dx quant à elle agit principalement comme régulateur positif de Notch en interagissant directement avec le récepteur Notch (Lidong Wang et al., 2021). La perte de fonction de *dx* provoque une perte globale (mais pas totale) dans tout l'intestin du nombre de cellules *esg*-positives. Les phénotypes observés pour la perte de ces deux protéines ne coïncident pas avec un phénotype perte d'activation de la voie Notch. En effet, une perte de la **signalisation** Notch entraîne une augmentation du nombre de cellules souches, une augmentation du nombre d'EE et une perte d'EC. Mib1 et Dx pourraient être impliquées dans un processus plus finement régulé, ou bien dans une autre fonction indépendante du rôle déjà décrit dans la signalisation Notch. Bre1,

Mib1, Dx et Hyd pourraient tous jouer un rôle chez les progéniteurs intestinaux dans le processus de différenciation ou le maintien des ISC. Pour chacune de ces protéines, il serait intéressant de regarder si leur perte de fonction impact l'activation de la voie Notch dans les EB. Il serait également intéressant d'étudier le lignage des progéniteurs afin de déterminer si ces cellules sont capables de générer une descendance malgré l'altération de la voie Notch, et si oui, de déterminer quels types de cellules sont générés.

La protéine **Dor** joue un rôle dans le trafic vésiculaire des protéines, notamment lors la pigmentation des yeux de la drosophile. Sa perte de fonction dans les progéniteurs provoque un changement de la morphologie des cellules *esg*-positives. Il est possible d'imaginer un rôle de la protéine Dor dans un processus vésiculaire ou d'endocytose important pour le trafic de protéines impliquées dans la morphologie adéquate de ces cellules. La protéine **Gzl** ubiquitine une protéine de type SNARE (système endomembranaire qui catalyse les réactions de fusion membranaire au cours du transport vésiculaire) codée par le gène *Syb* (*Synaptobrevin*). La GFP punctiforme observée fait penser à de petites vésicules à la périphérie des cellules (membrane). On peut imaginer que la perte de fonction *gzl* entraîne un problème de trafic vésiculaire dans les progéniteurs, qui est révélé par une mauvaise localisation de la GFP.

En conclusion, le crible RNAi réalisé a permis d'identifier une potentielle coopération entre Hyd et Psc qui reste à étudier, et d'identifier 13 E3 ub.L ayant un rôle dans la prolifération ou le maintien des progéniteurs intestinaux. En effet, la perte de certaines de ces protéines induit soit une hyperprolifération des ISC, soit une perte totale ou partielle des cellules *esg*-positives. Les différences de phénotypes observables d'une région à l'autre (perte de cellules *esg*-positives dans des régions spécifiques) peut être expliquées par la régionalisation de l'intestin de drosophile (Marianes & Spradling, 2013) (voir Introduction **I-1-1**). Au vu du rôle crucial des E3 ub.L dans la régulation post-traductionnelle des protéines, il serait intéressant de se pencher sur leur cibles, qui, potentiellement non régulées par le protéasome provoque un dérèglement des ISC et de ce fait impact grandement l'homéostasie. Les futures investigations sur ces protéines déjà connues ou non permettront d'élucider de nouveaux mécanismes ou interactions mis en œuvre par les ISC afin de contrôler leur prolifération/maintien et peut-être d'autres processus. L'implication des E3 ub.L dans de nombreux cancers en font d'autant plus de bons candidats à étudier dans le cadre de la régulation de cellules souches adultes.

III-3 Impact des bioinsecticides *Btk* sur le développement de physiopathologies de l'intestin

Nous avons montré que l'ingestion répétée de produits à base de spores de *Bt* à des doses correspondant aux épandages agricoles avait un impact sur la physiologie de l'intestin des organismes non cibles de la toxicité aiguë du produit. Cet impact sur la physiologie de l'intestin réduit significativement la durée de vie des drosophiles. Nous avons montré que l'homéostasie du tissu était altérée. En effet, les cellules de la lignée entéroendocrine voient leur nombre augmenté significativement dans l'intestin postérieur (région R5). Plus frappant encore, les progéniteurs présentent des dérégulations similaires au développement de dysplasies : nous avons observé une hyperprolifération des ISC et une mauvaise différenciation des progéniteurs lors d'une ingestion chronique de *Bt*. J'ai montré que l'impact de *Bt* était encore plus prononcé chez des individus fragilisés portant un contexte pro-inflammatoire ou pro-oncogénique, notamment avec des mutations dans les voies JNK et Wg/Wnt. En effet, l'espérance de vie des drosophiles est gravement impactée et le contexte de dysplasie s'installe très précocement. La dysplasie est une condition pathologique qui dépend de facteurs environnementaux, mais qui se développe de façon inévitable au cours du vieillissement. Nous avons recherché d'autres signes de vieillissement prématuré de l'intestin chez les drosophiles sauvages. De nombreuses études démontrent que les ROS et les dommages oxydatifs augmentent avec l'âge (Stadtman, 1992). Des études montrent également que la réduction des dommages oxydatifs prolonge la durée de vie de divers organismes modèles (levures, nématodes, mouches des fruits, souris, etc.), ainsi que la production accrue de ROS raccourcit la durée de vie (Gladyshev, 2014; Kirkwood & Kowald, 2012). En utilisant des sondes permettant d'identifier la présence de ROS, nous avons observé l'absence de ROS HOCl dépendant de l'activité immunitaire et de la NADPH oxydase Duox (Dual oxydase). L'absence de ROS HOCl témoigne de l'absence de bactéries végétatives dans l'intestin, et apporte un élément solide pour appuyer le fait que nous étudions l'impact de *Bt* sous forme de spores. En effet, la présence de bactéries végétatives déclenche la production de ROS HOCl en moins d'une heure (Benguettat et al., 2018; Ha et al., 2009). Ici, sous la forme de spores, *Bt* ne déclenche pas la production de ROS HOCl (question étudiée dans l'équipe). Cependant, l'intestin de ces drosophiles traitées avec *Bt* présentent un niveau significativement élevé des autres types de ROS (notamment O_2^- et autres). Ceux-ci peuvent venir de différentes sources enzymatiques (Nox, Cyp, Sod, chaîne de transport des

électrons...) et de différentes localisations subcellulaires (mitochondrie, membrane plasmique, réticulum endoplasmique, peroxyosome...) (Lennicke & Cochemé, 2021). Les résultats du séquençage du transcriptome de l'intestin de ces drosophiles ont également révélé la régulation positive de processus liés à la production et à l'élimination de produits de stress oxydatif. Le stress oxydatif résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial est impliqué dans le vieillissement et des pathologies comme les cancers (Green et al., 2004; Shigenaga et al., 1994). Malgré des décennies de recherche consacrées à la compréhension du vieillissement, les mécanismes sous-jacents au processus de vieillissement restent mal compris (Lennicke & Cochemé, 2020). L'accumulation de dommages liés aux ROS et au stress oxydatif n'est qu'une part des dommages impliqués dans le processus de vieillissement (Gladyshev, 2014). La dérégulation des progéniteurs est impliquée dans de nombreuses maladies et processus pathologiques comme le vieillissement, mais également les MICI et les cancers. Ici, nous avons vu le développement de dysplasie lors de l'ingestion chronique de spores de *Bt*. Ce contexte implique une hyperprolifération des ISC. Or, les cellules subissant des cycles de divisions de façon répétée souffrent de stress réplicatif favorisant l'apparition de dommages à l'ADN (sous forme de cassure double brin (DSB) (Gaillard et al., 2015; Zeman & Cimprich, 2014). Il est également connu que le stress oxydatif cause des dommages à l'ADN (Lennicke & Cochemé, 2021). Ces dommages sont détectés à travers le recrutement aux sites concernés de protéines de la voie de signalisation des dommages à l'ADN (DDR : *DNA damage response*), en particulier la forme phosphorylée du variant d'histone H2AX (γ H2AX) (Maréchal & Zou, 2013; Pan et al., 2011). Il serait intéressant de regarder d'autres sources de dommages dans les cellules des intestins de drosophiles ayant ingérés de façon répétée le produit *Bt*. Il serait possible d'utiliser un anticorps dirigé contre cette forme d'histone afin de repérer la signalisation de DSB afin d'évaluer la présence de dommages liés au stress réplicatif et oxydatif que peuvent subir les ISC face à leur hyperprolifération. Il existe des régions chromosomiques spécifiques préférentielles qui subissent des DSB au cours de la métaphase en cas de stress réplicatif. Ces régions portent le nom de « sites fragiles communs » (CFS *common fragile sites*). Les CFS sont des régions conservées au cours de l'évolution (Sandra G. Durkin & Glover, 2007). L'instabilité génomique survient préférentiellement au niveau de ces régions. Elle est considérée comme une caractéristique de la plupart des cellules cancéreuses, et son induction est un événement crucial dans la cancérogenèse (Gaillard et al., 2015; Grady & Carethers, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011; Zeman & Cimprich, 2014). Il est intéressant de noter que les cancers du tube digestif ne font pas exception. Par exemple, l'un des CFS les plus connus et étudiés concerne le gène *FHIT* (dont les exons se parsèment sur une région de 500kb) localisé

dans la région FRA3B du génome humain. Le gène *FHIT* est très souvent inactivé dans différents types de cancers (S. G. Durkin et al., 2008; Hosseini et al., 2013). Une baisse, voire une absence, de transcription du gène *FHIT* ont été retrouvées dans 50% des carcinomes de l'œsophage, de l'estomac et une proportion significative des adénocarcinomes colorectaux (Kapitanović et al., 2014; Ohta et al., 1996). Il pourrait être intéressant d'étudier si des gènes codés sur des régions de CFS trouvés fréquemment dérégulés dans des cancers colorectaux sont également dérégulés après une ingestion répétée de *Bt* sur le long terme. L'ensemble de ces investigations permettraient d'investiguer si au-delà des dommages liés au stress oxydatif et au stress réplicatif, et des dommages à l'ADN sur des CFS impliqués dans des cancers sont également une conséquence de l'ingestion de *Bt* sur le long terme. Cela permettra d'établir s'il existe un risque significatif de développer des cancers du tube digestif à la suite d'une ingestion répétée de spores de *Bt* sur le long terme. Il peut être important et intéressant de noter qu'il existe une grande variabilité individuelle dans le processus de vieillissement entre les hommes et les femmes, et que de nombreuses maladies liées à l'âge présentent des schémas spécifiques au sexe (Hägg & Jylhävä, 2021). De ce fait, nous avons étudié ici l'impact de l'ingestion de *Bt* sur l'intestin de drosophiles femelles, mais les résultats pourraient être différents chez les drosophiles mâles. Il serait intéressant d'étudier cette question afin d'observer s'il existe une différence de cet impact en fonction du sexe. Enfin, il serait très intéressant d'étudier l'impact de *Bt* sur des individus portant des mutations pour d'autres voies inflammatoires que JNK (testée en partie III-3), comme la voie JAK/STAT ou NF-κB, afin de déterminer si la sensibilisation observée chez les individus pro-inflammés (JNK) et pro-tumoraux (Wg/Wnt) concerne d'autres voies de signalisation. Dans la partie III-3, les contextes pro-inflammatoire et pro-oncogénique sont générés dans tout l'organisme. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de *Bt* sur un contexte pro-inflammatoire/oncogénique généré spécifiquement dans l'intestin (grâce à une lignée qui cible spécifiquement la suractivation de ces voies dans les cellules intestinales) afin de voir si la sensibilisation à l'ingestion chronique de *Bt* se fait par un contexte ciblé dans l'intestin ou intégré au niveau de l'organisme. Il est important de garder à l'esprit que l'ensemble des résultats obtenus ont été produits en utilisant des doses proches de la dose d'épandage recommandée de produits *Bt* (correspondant à 2 traitements pour la dose 10⁶). Cependant, dans la réalité des faits, les traitements aux produits phytosanitaires à base de spores de *Bt* sont récurrents et reproduits à des durées plus ou moins espacées (en général 1 semaine), favorisant un potentielle effet d'addition des spores de *Bt* dans l'alimentation. Beaucoup d'inconnues subsistent sur la quantité réelle de spores de *Bt* retrouvée dans l'alimentation, au vu des variables qui entre en jeu dans la persistance des spores dans

l'environnement et sur les cultures (voir Introduction [III-3-2](#)). L'ensemble de ce travail fournit une première évaluation des risques associés à une consommation chronique de spores de *Bt* à la dose d'épandage dans l'alimentation, et doit permettre d'ouvrir la porte à des études plus poussées chez les mammifères.

PARTIE IV : CONCLUSIONS

En conclusion, durant ma thèse, j'ai développé en parallèle deux axes portant tous deux sur les mécanismes régissant l'homéostasie intestinale avec pour modèle la drosophile. Le premier a été d'étudier le rôle des PcG dans les cellules souches adultes du tissu intestinal (ISC). J'ai identifié les sous-unités du complexe PRC1 Psc et Su(z)2 comme agissant avec Sce, Ph et la sous-unité catalytique E(z) de PRC2 afin de maintenir l'identité des ISC et leur capacité à générer des cellules différenciées. J'ai recherché les voies de signalisation pouvant être impactées par la régulation des PcG pouvant expliquer ce phénotype. Des expériences sont encore en cours afin de déterminer les cibles de la régulation des PcG permettant de mener à bien le contrôle de l'identité ISC et de leur bon fonctionnement, ainsi que pour mieux caractériser les mécanismes aboutissant à la formation tumorale. Ces résultats obtenus au cours de ma thèse permettront d'approfondir la connaissance récente du rôle des PcG chez les cellules souches adultes, en caractérisant un rôle crucial dans les cellules souches intestinales.

Le second axe de ma thèse a été d'étudier l'impact de l'ingestion chronique de bioinsecticides *Bt* sur le développement de pathologies de l'intestin. J'ai participé à montrer que l'ingestion répétée de spores de la bactérie *Bt* par l'alimentation réduisait l'espérance de vie des drosophiles. En effet, l'ingestion de *Bt* tout au long de la vie impacte la physiologie de l'intestin. J'ai participé à montrer que ces drosophiles présentaient un vieillissement prématuré de l'intestin, par le développement de dysplasie précoce et la production de ROS indépendante de la réponse immunitaire. J'ai montré que l'impact de *Bt* était encore plus prononcé chez des individus fragilisés portant des contextes pro-inflammatoires et pro-oncogéniques, notamment par le biais de mutations dans les voies JNK et Wg/Wnt. La physiologie de l'intestin de drosophile étant hautement conservée chez les mammifères, l'impact de l'ingestion répétée de bioinsecticides *Bt* avec l'alimentation chez les mammifères et chez l'homme doit être étudié. Mon travail de thèse permet donc une première évaluation des risques, et doit permettre des études plus poussées chez les mammifères afin de mettre en œuvre des conditions d'utilisations et de consommations adéquates et plus raisonnables, notamment pour les personnes fragiles déjà atteintes de pathologies inflammatoires/cancers de l'intestin ou simplement pour les personnes plus âgées.

ANNEXE I : REVUE 1 - Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells. *A. Joly and R. Rousset. IJMS, 2020.*



Review

Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells

Aurélia Joly and Raphaël Rousset *

Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, 06903 Sophia Antipolis, France; aurelia.joly@etu.univ-cotedazur.fr

* Correspondence: raphael.rousset@univ-cotedazur.fr

Received: 24 July 2020; Accepted: 30 August 2020; Published: 2 September 2020



Abstract: Tissues must adapt to the different external stimuli so that organisms can survive in their environments. The intestine is a vital organ involved in food processing and absorption, as well as in innate immune response. Its adaptation to environmental cues such as diet and biotic/abiotic stress involves regulation of the proliferative rate and a switch of division mode (asymmetric versus symmetric) of intestinal stem cells (ISC). In this review, we outline the current comprehension of the physiological and molecular mechanisms implicated in stem cell division modes in the adult *Drosophila* midgut. We present the signaling pathways and polarity cues that control the mitotic spindle orientation, which is the terminal determinant ensuring execution of the division mode. We review these events during gut homeostasis, as well as during its response to nutrient availability, bacterial infection, chemical damage, and aging. JNK signaling acts as a central player, being involved in each of these conditions as a direct regulator of spindle orientation. The studies of the mechanisms regulating ISC divisions allow a better understanding of how adult stem cells integrate different signals to control tissue plasticity, and of how various diseases, notably cancers, arise from their alterations.

Keywords: stem cell; symmetric/asymmetric divisions; gut; JNK; *Drosophila*; mouse; adaptive growth; regeneration; stress; aging

1. Introduction

In contact with ingested food, drink, and medications, the intestinal epithelium is continuously subjected to various aggressions such as bacteria, viruses, or chemical compounds. To keep its integrity, the intestinal epithelium is in constant renewal, replacing old, injured, or dead cells. This renewal is ensured by multipotent intestinal stem cells (ISC), of somatic origin and present within the tissue itself, which adapt their proliferation to daily needs (homeostasis, adaptive growth) or during aggression (regeneration). In the mouse small intestine, these ISC express the R-spondin receptor Lgr5 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5) and are located at the base of the crypts (Figure 1a). Besides these active ISC, another type of ISC located at the +4 position relative to the crypt base is present. The ISC +4 are quiescent during normal homeostasis, and their exit from quiescence occurs when the active ISC are compromised, therefore constituting reserve ISC [1,2]. Despite their stem cell potential, the ISC +4 are precursors committed to becoming secretory cells, revealing the plasticity of this cell type [3,4]. During the differentiation process, cells progress from the crypt to the villi to first become transit-amplifying precursors (TA) that retain the ability to divide (Figure 1a). Absorptive precursors then differentiate into enterocytes (EC), whereas secretory precursors can give rise to enteroendocrine cells (EEC; secreting hormones), goblet cells (secreting mucus), tuft cells (secreting interleukins), and Paneth cells (secreting anti-microbial peptides and niche factors). Active cell migration relying on

actin-rich basal protrusions, rather than passive migration, has recently been shown to allow epithelial cells to migrate upward to the villi [5].

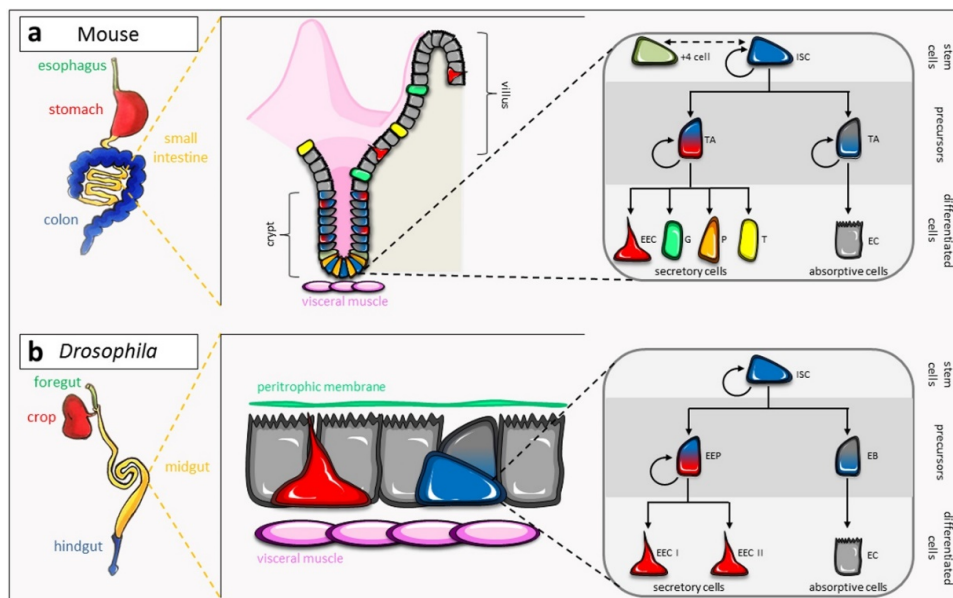


Figure 1. Cellular organization and lineages of the mouse small intestine and the *Drosophila* midgut. (a) The small intestine of the mouse is organized as units made of crypts and villi. ISC, localized at the bottom of the crypts, and transit-amplifying precursors (TA) proliferate to generate mature cells (enteroendocrine cells—EEC, goblet cells—G, Paneth cells—P, tuft cells—T, enterocytes—EC) through two distinct lineages, forming the secretory cells and the absorptive cells. Whereas Paneth cells migrate to the bottom of the crypt, the other differentiated cells migrate up to the villi. (b) The midgut of *Drosophila* is a flat epithelium. Two types of precursors are generated from ISC divisions, the enteroendocrine precursors (EEP) and the enteroblasts (EB), which give rise to the secretory enteroendocrine cells (class I and class II) and the enterocytes, respectively. The peritrophic membrane has an equivalent role as the mucus of the small intestine. See the main text for details.

The *Drosophila* midgut, which is the counterpart of the mouse small intestine, is a well-recognized model to study tissue renewal and plasticity during homeostasis, regeneration, and aging. Despite some physiological divergence, the cell lineage and molecular mechanisms involved in ISC proliferation and differentiation are well conserved between *Drosophila* and the mouse (Figure 1) [6]. Recently, single-cell RNA sequencing advances allowed the complete description of the different cell types of the mouse small intestine and the *Drosophila* midgut [7,8]. These studies confirmed the similarities between the two tissues, each containing stem cells, [7,8]. These studies confirmed the similarities between the two tissues, each containing stem cells, precursors, enterocytes, and enteroendocrine cells (Figure 1). The mouse goblet, tuft, and Paneth cells are absent from the fly intestinal epithelium, their specific functions being assumed by the enterocytes and enteroendocrine cells. Indeed, based on marker gene expression, *Drosophila* enteroendocrine cells are similar to mouse enteroendocrine cells, goblet cells, and tuft cells. *Drosophila* cardia cells, localized in the anterior midgut extremity and known to secrete components of the peritrophic membrane, which has the same protective role as the mammalian mucus, are also equivalent to goblet cells [8]. In addition, Paneth cells are related to lysozymes-producing anterior enterocytes. Interestingly, five *Drosophila* cell types could not be clearly specified, although three of them could be part of the enterocyte lineage [8]. Assigning markers for each of them will help attribute a function to these new cell types of the *Drosophila* midgut.

In *Drosophila*, only active ISC have been described so far, located at the basal side of the gut epithelium and expressing the transcription factor Escargot (Esg) and the Notch (N) ligand Delta (Dl) [9,10]. It was first proposed that ISC divide asymmetrically to both self-renew and give rise to a unique precursor, called enteroblast (EB), expressing the transcriptional reporter of Notch activity, Su(H)GBE

(Suppressor of Hairless and Grainyhead Binding Elements) (Figure 2). Three studies then showed that enteroendocrine cells come from a different precursor, Su(H)GBE negative and Esg-Dl-Prospero (Pros) positive, called enteroendocrine precursor (EEP) [11–13]. Later, the first, and so far the only specific enteroendocrine precursor marker, named Piezo, was discovered [14]. Piezo-expressing cells are also marked by Esg and Dl, but not all the Piezo-positive cells express Pros, revealing two different enteroendocrine precursor cell types [14,15]. Careful analysis of the enteroendocrine lineage is now required to highlight the various steps of differentiation from the ISC to the enteroendocrine cells. Different types of enteroendocrine cells have been described in the midgut, depending on the cocktails of hormones they produce [16,17]. Recently, single-cell analyses revealed the precise composition and distribution of the different types of enteroendocrine cells along the midgut [8,18]. Ten different subtypes, each of them expressing between two to five gut hormones, were discovered and grouped in two major classes: the Allatostatin C-expressing class I and the Tachykinin expressing class II (Figure 2). After ISC asymmetric division, the resulting enteroendocrine precursor can directly differentiate into the enteroendocrine cell, but in 71% of cases, it divides to give rise to two enteroendocrine cells, indicating that ISC are not the only cell type to divide in the midgut [19]. However, the Piezo-positive enteroendocrine precursors have a reduced capacity of proliferation compared to Piezo-negative ISC [14]. Enteroendocrine precursor division is itself asymmetric, forming one class I enteroendocrine cell and one class II enteroendocrine cell, the latter being specified by N signaling [13,16,18,19] (Figure 2). Finally, enteroendocrine cells can also be produced via symmetric ISC divisions or by direct differentiation of the ISC [11,12], although the latter process has later been challenged [19].

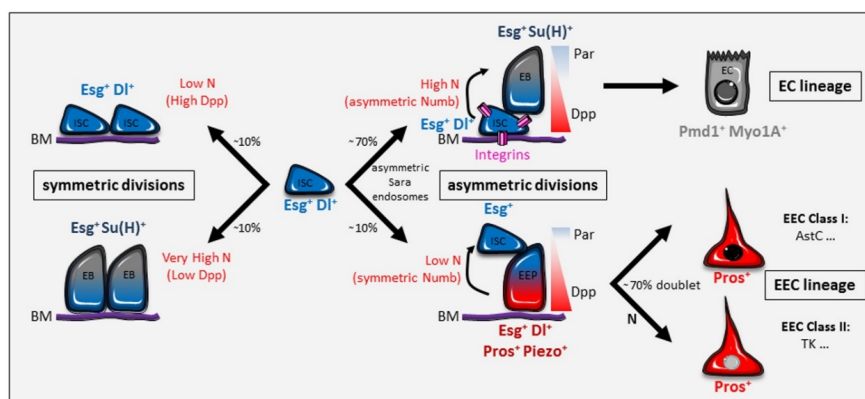


Figure 2. Division modes of *Drosophila* ISC. The interplay between Notch and Dpp/BMP signaling pathways, as well as the Par complex, integrins, Numb, and Sara endosomes, regulates the different daughter cell fates of ISC divisions: ISC-enteroblast, ISC-enteroendocrine precursor, ISC-ISC, and enteroblast-enteroblast. Symmetric division of the ISC can also give rise to two enteroendocrine precursors, but the signaling events have not been described (and therefore are not included in the figure). The localization of the Par complex in the apical daughter cell is necessary for the ISC asymmetric division. Two lineages, that of enterocytes and that of enteroendocrine cells, are produced depending on the level of Notch activity, which is itself regulated by Dpp/BMP, Numb, and Sara endosomes. In addition, in the enteroendocrine lineage, the Par complex regulates the correct localization of Pros in the basally located enteroendocrine precursor. Integrins allow the asymmetric localization of the Par complex during ISC-enteroblast asymmetric division, but their specific role in the enteroendocrine lineage is not known. Two main classes of enteroendocrine cells, expressing Allatostatin C (AstC) for class I and Tachykinin (Tk) for class II, are produced from the enteroendocrine precursors. Around 70% of the enteroendocrine cells form a doublet coming from the direct division of the enteroendocrine precursors. During the symmetric division, low Notch signaling (due to high Dpp/BMP) leads to ISC-ISC production. Conversely, a high Notch (low Dpp/BMP) leads to enteroblast-enteroblast production. Percentages are related to the homeostatic condition. Each cell type of the midgut can be distinguished by specific markers. See the main text for details. BM: basement membrane; ISC: intestinal stem cell; EB: enteroblast; EEP: enteroendocrine precursor; EC: enterocyte; EEC: enteroendocrine cell; N: Notch.

By adapting their activity to the need, the ISC are the mainstay of homeostasis and regeneration of the tissue. To do this, they respond to mechanical and molecular signals coming from numerous signaling pathways (Notch, TGF β /BMP, Hpo/Yki, EGFR, JNK, JAK/STAT, Wnt/Wg, PVR, IIS, TOR, Hh, Integrins), modulating their proliferation and differentiation rates. An important adaptive mechanism is based on the switch between the division modes of ISC, asymmetric versus symmetric. Whereas the asymmetric division generates two daughter cells of different fate, one self-renewed ISC, and one precursor (enteroblast or enteroendocrine precursor) as seen above, the symmetric division gives rise to two ISC (symmetric self-renewal) or two precursors (symmetric differentiation) (Figure 2). Although both asymmetric and symmetric divisions occur during homeostasis, the switch between the two modes is particularly important for the intestine to adapt to different conditions, such as nutrient availability, external aggression, or aging. The mechanisms involved in this regulation have started to be better described, though much work needs to be done for a complete understanding of the molecular processes controlling the adaptive capacity of adult stem cells of the intestine.

2. Asymmetric Versus Symmetric Divisions during Homeostasis

In the developing mouse intestinal crypt, Lgr5 + ISC adopt asymmetric divisions to generate precursors only after all ISC-ISC symmetric divisions have taken place in order to reach the necessary number of cells for proper tissue growth [20,21]. Later, in the small intestine of adult mice, the majority of Lgr5 + ISC divisions are symmetric, giving rise to two ISC or two fast-lived TA [22–24]. This main mode of division therefore leads to a neutral drift of the crypts, whereby progressive loss of ISC, when two TA are formed, is compensated by clonal expansion of the duplicated ISC. However, this model has recently been challenged by a study showing that the neutral drift is rather dominated by asymmetric cell division, which represents 60% of ISC division during normal homeostasis [25]. It is likely that this discrepancy results from the difference in food quality used in the two studies (see below).

During fly gut homeostasis, approximately 80% of ISC undergo asymmetric division (ISC-enteroblast), whereas only 20% undergo symmetric division, leading to self-renewing (ISC-ISC) or differentiation (enteroblast-enteroblast) [26–34] (Figure 2). Clonal analysis revealed that, whereas the majority of multicellular clones contain one Dl-positive ISC, the other clones have several ISC, or none [26]. Therefore, the asymmetric fate produces enterocytes and enteroendocrine cells, while the symmetric fate leads to a neutral competition at the population level.

2.1. Delta/Notch Signaling Pathway

The Notch pathway is an evolutionarily conserved regulator of stem cell maintenance [35]. The signaling cascade is activated when one of the transmembrane Notch ligands Dl or Serrate (Ser), present at the surface of a cell, binds to its receptor Notch exposed by a neighboring cell. This induces cleavage of the Notch intracellular domain that enters the nucleus and transcriptionally regulates gene expression along with co-factors such as Suppressor of Hairless (Su(H)). In dividing ISC, the decision of daughter cells to self-renew or differentiate is dictated by the Notch pathway, whose high level of activation in enteroblasts prevents ISC fate and promotes differentiation [32,33,36]. Dl is the unique ligand in this process, as loss of Ser has no effect on ISC maintenance and enteroblast production [36]. Initially at the anaphase stage, Dl segregates equally in the two dividing daughter cells [36]. Later, during cytokinesis, Notch and Dl were shown to be asymmetrically dispatched in enteroblasts in a process depending on Sara endosomes, thereby promoting asymmetric division [37] (Figure 2). Interestingly, Notch signaling acts bidirectionally and is important not only for enteroblast differentiation, but also for the enteroendocrine lineage [13]. In the enterocyte lineage, ISC (high Dl) remain attached to the basement membrane, whereas enteroblasts (high Notch signaling) are more apical [9,10,13,36]. In contrast, in the enteroendocrine lineage, enteroendocrine precursor daughter cells are localized basally and express low levels of Dl, inducing weak Notch signaling in the ISC [13]. This important work undertaken in pupal guts, as well as in adult guts, revealed that Notch signaling

is bidirectional with respect to the enterocyte and enteroendocrine lineages, but it is unidirectional with respect to the basement membrane, as basally located cells activate cells that are more apical, and not vice versa [13]. It is interesting to note, therefore, that two types of ISC co-exist in the *Drosophila* midgut, the Esg/Dl-positive ISC and the Esg-positive/Dl-negative ISC, although the latter are certainly transient and quickly re-express the Dl protein. Notch loss of function induces mosaic tumors made of ISC-like and enteroendocrine-like cells [36], and the bidirectionality of Notch signaling can explain this phenotype: loss of Notch leads to an accumulation of Dl-positive ISC in the enterocyte differentiation pathway and Pros-positive cells in the enteroendocrine differentiation pathway. However, activation of Notch signaling in the enteroendocrine lineage could not be confirmed using a Notch activity reporter generated by tagging the intracellular domain of Notch with GFP (NiGFP), as it was found in an inactive state at the plasma membrane [33]. One simple explanation is that NiGFP is not sensitive enough to detect the low level of Notch activity described in the enteroendocrine lineage. This study importantly identified another regulator of the choice between the enterocyte and enteroendocrine lineages, the inhibitor of Notch signaling Numb. The authors demonstrated that Numb is asymmetrically distributed in the dividing ISC of the enterocyte lineage and that symmetric Numb distribution favors the enteroendocrine fate by inhibiting Notch [33] (Figure 2).

The Dl/Notch pathway, as an actor of lateral inhibition, has also been proposed to control neutral competition resulting from symmetric duplication and loss [26]. If two ISC divide nearby, the four sibling cells might engage Notch-mediated lateral inhibition not between sisters (as seen in the asymmetric division), but between non-sibling cells. One pair of cells remains stem cells (ISC-ISC), while the other becomes precursors (mostly enteroblast-enteroblast), resulting in ISC loss and replacement. This model involving lateral inhibition between non-sibling cells was further refined, providing an alternative, complementary, and likely more frequent model based on the contact area-mediated differential fates of sibling cells [31]. This study demonstrated that the strength of Notch signaling is proportional to the contact area between the two daughter cells: the small contact area (low Notch signaling) mediates ISC-ISC fate, the medium contact area (intermediate Notch signaling) mediates ISC-enteroblast fate, and the long contact area (high Notch signaling) mediates enteroblast-enteroblast fate (Figure 2).

The molecular mechanism controlling the length of the contact zone between the two ISC-derived daughter cells was not described in this work but might involve cell adhesion molecules. During asymmetric division, reducing E-Cadherin in ISC results in an augmentation of the enteroendocrine cell number, which can be explained by a reduction of Notch signaling [38], although this phenotype could not be reproduced [39]. A negative-feedback mechanism seems to take place, whereby a high level of Notch, induced by a strong E-Cadherin-mediated contact, down-regulates the adhesion molecule itself to separate the ISC and the enteroblast [38]. The insulin pathway in enteroblasts might also contribute to the separation of the two daughter cells [39]. All these studies highlight the important role of the Dl/Notch signaling pathway in controlling ISC division modes and precursor fate during gut homeostasis.

2.2. Dpp/BMP Signaling Pathway

The Dpp/BMP (Decapentaplegic/Bone Morphogenetic Protein) pathway is another regulator of the ISC division modes [30]. Although different levels of inhibition of Dpp/BMP signaling trigger diverse phenotypes, complete loss alters the outcome of ISC divisions, from mostly asymmetric ISC-enteroblast to predominantly symmetric enteroblast-enteroblast. Conversely, over-activation of the pathway favors ISC-ISC duplication. Thus, Dpp/BMP promotes ISC identity, and it was shown that this action is carried out by down-regulating Notch activity. Sources of the Dpp/BMP signal were first described in the visceral muscles and the tracheal cells [40,41], but the main source for ISC self-renewal is the enterocytes [30]. Enterocyte-expressed ligands Dpp and Gbb (Glass bottom boat) form an apico-basal gradient, which is induced by basement membrane-localized type IV collagens. This model explains the unidirectionality of Notch signaling relative to the basement membrane in the enterocyte and enteroendocrine lineages: the apical daughter cells, located further from the source of Dpp/BMP

ligands, are active for Notch signaling, whereas the basal daughter cells, which receive high levels of Dpp/BMP, have no Notch activity (Figure 2).

2.3. Polarity Complex and Integrins

From *Drosophila* to mammals, the choice between symmetric or asymmetric division of stem cells is determined by spindle orientation during mitosis [42,43]. In the mouse small intestine, symmetric and asymmetric cell divisions display spindle axes that are parallel or perpendicular to the basal surface, respectively [25,44]. Similarly, in the *Drosophila* intestine, the asymmetric division is guided by an oblique, nearly perpendicular position of the mitotic spindle relative to the basement membrane [13,28]. Apico-basal and planar cell polarities are active processes that align the spindle along a particular axis to influence the division mode in many different cell types and organisms [45]. For the last decade, *Drosophila* neuroblasts have represented a very good model to study the molecular control of cell polarity and cell fate determinants in asymmetric cell division. Each neuroblast divides asymmetrically to give rise to another neuroblast and a smaller ganglion mother cell, which divides one more time to generate two neurons or glial cells. During neuroblast division, the Par complex, consisting of Bazooka (also known as Par-3), Par-6, and atypical Protein Kinase C (aPKC), is localized apically where, together with heterotrimeric G-proteins and the Pins (Partner of inscuteable) complex, it controls the microtubule attachment and mitotic spindle alignment along the apico-basal axis. In *Drosophila* ISC, the asymmetric localization of the Par complex also correlates with asymmetric divisions [13,28] (Figure 2). Whereas loss of function of the Par complex increases the ISC number (symmetric ISC-ISC division), the gain of function triggers enteroblast-enteroblast duplication through activation of the Notch pathway [28].

Loss of function of integrins results in the appearance of ectopic D1-positive cells, similarly to the Par complex inhibition, but in addition increases the ISC proliferation rate. Interestingly, loss of function of either integrins or the Par complex resulted in reorientation of the mitotic spindle parallel to the basement membrane [28]. These data suggest that integrins, by mediating adhesion of the basally located daughter cell to the basement membrane, provide positional information for the asymmetric segregation of the Par complex to the apical pole, thus promoting the asymmetric division mode (Figure 2). A second study using a viable null allele of the βv integrin subunit confirmed the augmentation of proliferation and of the number of ISC-ISC pairs upon integrin loss of function [46]. These results are, however, in sharp contrast to another study showing that integrin signaling is required for both maintenance and proliferation of ISC, as loss of function (mostly using null alleles) decreases ISC number, as well as their division rate [47]. This discrepancy may result from differences in the alleles used and/or the efficacy of the RNAi lines, and likely reveals complex cell-type or subunit-specific roles of integrins. However, the asymmetric segregation of the Par complex to the apical pole and its role in aligning the spindle perpendicular to the planar plane are similar to what has been described in other tissues and organisms [45]. Goulas and colleagues also observed that integrins are genetically upstream of the Par complex, indicating that they represent, so far, the earliest molecular event in the control of symmetry/asymmetry.

Whereas this last work focused on the enterocyte lineage during asymmetric division, other studies showed that the Par complex, as well as the cell polarity protein Lethal (2) giant larvae (Lgl), also act in the enteroendocrine lineage [13,33]. Indeed, the Par complex promotes Pros localization in basal daughter cells, thus specifying the enteroendocrine precursors [13] (Figure 2). Similarly, the Par complex and Lgl act on Numb, whose symmetric localization in the dividing ISC favors the enteroendocrine lineage by inhibiting Notch activity [33]. These results are very intriguing as they reveal a complex role of the polarity complex. First, its localization at the apical side of the dividing ISC orients the mitotic spindle in the oblique position to trigger the asymmetric division. Second, in the enteroendocrine lineage, it promotes the distribution of Pros in the basally located enteroendocrine precursor and induces the symmetric distribution of Numb (Figure 2). It will be interesting to decipher the molecular mechanism by which the polarity complex can control on one hand asymmetric Pros and on the other

hand symmetric Numb. Several other questions also remain unanswered regarding the role of the polarity complex and the integrins, such as: are there any signals further upstream of the integrins controlling asymmetric/symmetric divisions? What is the molecular link between the integrins and the Par complex?

3. Division Modes during Adaptive Growth of the Gut

3.1. Insulin/Insulin-Like Signaling

A study published in 2011 was the first to describe symmetric divisions in the adult *Drosophila* intestine, revealing a reversible mechanism executed by ISC to promote adaptive growth during gut maturation and in response to fasting/feeding periods [27]. This study demonstrated that feeding-induced growth of the midgut is caused by a strong increase in ISC divisions, both asymmetric and symmetric, but also by a switch towards a predominant symmetric mode of division. Whereas the ratio is 80/20 (80% for the asymmetrical division and 20% for the symmetrical division; see above) during homeostasis, it is reversed during growth (30/70) [27]. The accelerated ISC proliferation and the favored symmetric division therefore allow the gut to produce more differentiated cells, but also to have more ISC, leading to fast tissue growth.

In close contact with ISC that are basally located in the intestinal epithelium, the visceral muscle is well known to influence their behavior [48–51]. During feeding, the ligand dILP3 (*Drosophila* insulin-like peptide 3), derived locally from the visceral muscle, along with systemic dILP2/5, activates Insulin/Insulin-like (IIS) signaling in ISC, which induces their divisions and favors the symmetric mode [27] (Figure 3a). IIS signaling therefore drives organ growth, a process that is reversibly regulated by dietary changes. During nutrient deprivation, decreased IIS activity results in reduced ISC proliferation due to prolonged contact between ISC and precursors [39]. The micro-RNA *miR-305*, which targets components of both IIS and Notch signaling pathways, has been shown to coordinate the nutritional adaptive growth [29]. On a poor diet, the *miR-305* level is high in ISC, where it targets and represses the Notch signaling repressor Hairless, resulting in upregulation of Notch-mediated transcription, and consequently, increased asymmetric divisions (Figure 3b). On a rich diet, *miR-305* is transcriptionally repressed by IIS signaling. Hairless expression is therefore stabilized and can down-regulate Notch target gene transcription, which favors ISC-ISC duplication and organ growth. Another actor, the RNA-binding protein Lin-28, also promotes ISC symmetric division in fed flies by interacting with the insulin receptor (InR) mRNA, increasing its expression and enhancing IIS signaling [52,53]. On a poor diet, the InR level within ISC is post-transcriptionally down-regulated as a result of Lin-28 inhibition by the RNA-binding protein Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) [53] (Figure 3a,b).

The mouse intestine is also known to respond to dietary signals [54–59]. Surprisingly, however, calorie restriction induces an expansion of the mouse Lgr5 + ISC pool, accompanied by a reduction of mature enterocytes [54,56]. The insulin/mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) pathway is down-regulated in Paneth cells, which allows the activation of LKB1/AMPK/SIRT1 (Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase/Sirtuin 1) signaling cascade in ISC through the paracrine factor cyclic adenosine diphosphate ribose [54,56]. In parallel, mTORC1 is upregulated in ISC (independently of insulin), where it collaborates with SIRT1 to foster ISC self-renewal [56]. On the contrary, two other studies showed that Lgr5 + ISC number did not change upon fasting, but that instead, the quiescent ISC +4 contributed to intestinal growth after calorie restriction via the insulin/mTORC1 pathway [58,59]. A high-fat diet also drives ISC hyperproliferation, and this process requires insulin and the activation of the PPAR- δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta) pathway [55,57]. These studies did not analyze the cellular mechanisms driving ISC pool expansion, but it was later shown that the ISC of fasted mice exhibit a switch in favor of asymmetric divisions and that a high-glucose treatment of organoids does the opposite (more symmetry at the expense of asymmetry) through a reduction of the LKB1/AMPK pathway [44].

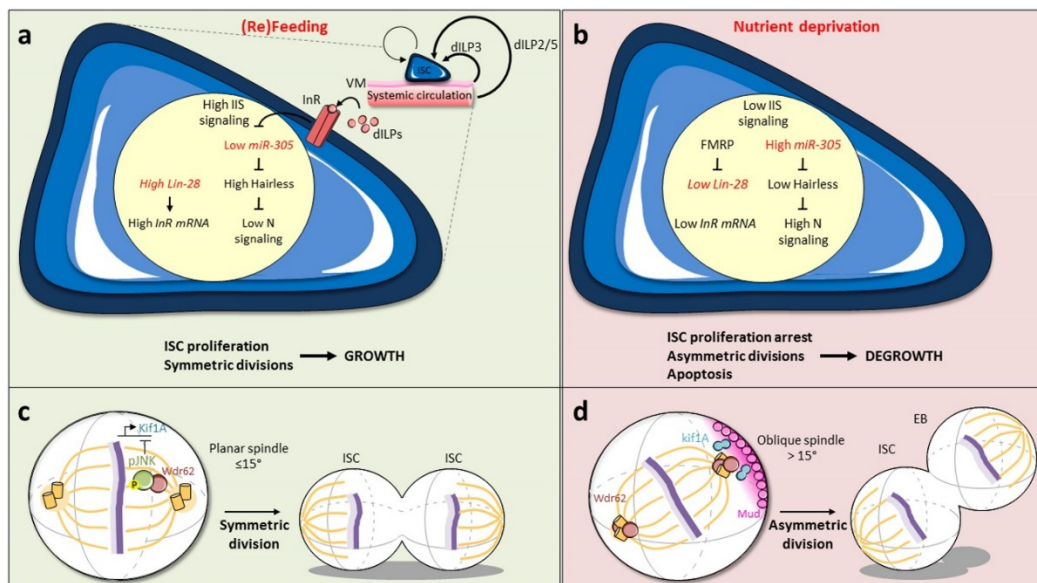


Figure 3. Adaptive growth of the gut depends on nutrient availability. Feeding (a) and nutrient deprivation (b) impact the ratio of symmetric and asymmetric divisions to mediate the adaptive growth of the gut through insulin signaling. (c,d) JNK signaling counteracts cortical determinants to regulate the planar orientation of the mitotic spindle and promotes the symmetric division. See the main text for details.

All these studies performed in *Drosophila* and mice indicate that the insulin pathway is central to the ISC dietary response, but also that other signaling events play a role in the adaptive growth of the mouse small intestine (Table 1). Future studies will have to determine whether these other pathways operate in the *Drosophila* midgut to regulate the ISC division modes, and it will also be important to analyze whether nutrient quality (lipids, proteins, carbohydrates) could induce different responses.

Table 1. Summary of the signaling pathways and their regulators (when known) involved in the gut responses to adaptive growth, stress, and aging both in *Drosophila* and the mouse. The pathways regulating the orientation of the mitotic spindle are also indicated. However, the direct molecular role of the LKB1/AMPK pathway in mouse ISC has not been proven (*). See the main text for details.

Process	<i>Drosophila</i> Midgut	Mouse Small Intestine
Adaptive growth	Insulin/IIS signaling Notch JNK	Insulin/mTORC1 LKB1/AMPK/SIRT1 Cyclic adenosine diphosphate
	Regulators: <i>mir-305</i> , <i>Lin-28</i> , <i>FMRP</i>	ribose PPAR- δ
Stress	Notch Dpp/BMP JNK	Notch
		Regulators: <i>mir-34a</i> , <i>Numb</i>
Aging	JAK/STAT PVR JNK	mTORC1 Wnt/Wg
		Regulators: Notum
Mitotic Spindle	JNK	LKB1/AMPK *

3.2. Mitotic Spindle Orientation via JNK Signaling

Several studies noticed that ISC division modes are linked to the orientation of the axis between the two daughter cells relative to the plane of the epithelium [13,28,33,36,37]. Interestingly, live imaging showed that horizontal-vertical reorientations can occur during the time of mitosis itself [60]. Recently, a detailed analysis revealed that the switch between symmetric and asymmetric stem cell divisions in the adult *Drosophila* intestine requires a change in the alignment of the mitotic spindle [61]. This study showed that the symmetric division is driven by a planar ($\leq 15^\circ$) spindle, whose orientation is controlled by c-Jun-N-terminal kinase (JNK) signaling acting at two levels [61] (Figure 3c,d). First, the activated JNK/Basket, which is associated with the spindle, directly controls the recruitment of the centrosome-associated protein Wdr62 (WD repeat domain 62) (Figure 3c). Second, JNK signaling mediates transcriptional repression of the kinesin Kif1A (kinesin family member 1A). In absence of the JNK signal, Wdr62 is localized to the centrosomes, whereas Kif1A could orient astral microtubules to the cell cortex, the two proteins interacting with cortical determinants of spindle orientation, such as Pins or Mud (Mushroom body defect), in order to favor the oblique position of the spindle (Figure 3d). JNK-induced phosphorylation of Wdr62 and repression of Kif1A therefore interfere with this process and promote together the planar alignment of the mitotic spindle. This molecular action favors symmetric division during diet-induced adaptive growth, but also during stress response and aging (see below). In mice, we described above that it is rather the LKB1-AMPK pathway that controls the nutrient-driven switch between the two division modes [44], but it is not known whether it acts directly or indirectly on the mitotic spindle and whether the JNK pathway is involved as in *Drosophila* (Table 1).

4. Stress and Aging on ISC Division Modes

4.1. Stress-Modulated Switch between Symmetric and Asymmetric Divisions

The symmetric/asymmetric division ratio allows the epithelium to adapt to the nutrient needs, as seen above, but also to face stressful and damaging conditions. In mice, when normal homeostasis is disrupted by inflammation or oncogenic mutations, excessive proliferation is compensated by a switch in favor of asymmetric division to restrain the number of Lgr5 + ISC [62]. This is achieved through a feedforward loop involving *miR-34a*, Numb, and Notch (Table 1). In *Drosophila*, the JNK signaling pathway promotes the symmetric outcome of ISC divisions during intestinal growth after refeeding, as discussed above, but also after paraquat treatment [61] (Figure 4). However, bacterial stress with the gram-negative *Erwinia carotovora carotovora 15 (Ecc15)* bacterium has no effect on spindle orientation, suggesting that not all the stresses can realign the spindle [61]. This is, however, in contradiction with another study, showing that pairs of DI-positive cells increase upon *Ecc15* infection, likely reflecting a shift towards ISC symmetric divisions [63]. In the same way, the DNA-damaging agent bleomycin or infection with another gram-negative bacterium, *Pseudomonas entomophila*, drives ISC expansion by promoting their symmetric division, but not the chemical dextran sulfate sodium that increases only ISC proliferation rate [64]. Moreover, ISC partial loss does not trigger any compensatory mechanism (increased division rate and/or mode) to recover the ISC pool [65]. These studies therefore indicate that the stress response does not systematically trigger the symmetric/asymmetric division switch.

In the study of Zhai and colleagues (2017), *Ecc15* infection favors the ratio of DI+/DI+ pairs (ISC-ISC) to the detriment of the ratio of DI+/Notch+ pairs (ISC-enteroblast). In addition, strong cell contact mediated by the cell adhesion molecules E-Cadherin and Connectin ensures a high level of Notch signaling in one of the daughter cells. Acting in parallel to Notch, a signaling cascade of JAK/STAT-Sox21a-GATAe-Dpp/BMP cooperates to accelerate the differentiation step between the enteroblast and the enterocyte. These two mechanisms therefore seem to trigger an increase in symmetric divisions and a fast production of enterocytes, leading to a rapid recovery of the intestine upon aggression. It is interesting to note, however, that this study also showed that Dpp/BMP signaling, GATAe, and E-cadherin/Connectin are not critical for enteroblast differentiation during homeostasis.

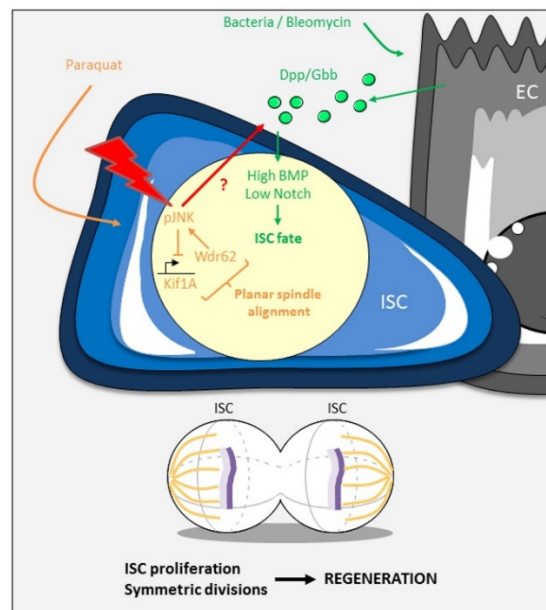


Figure 4. Stress-response of the gut by increased symmetric divisions. JNK-induced orientation of the mitotic spindle, Dpp/BMP-driven ISC fate and fast enteroblast differentiation through strong adhesion allow the gut to produce more ISC and differentiated cells to compensate for the loss of damaged cells. JNK signaling might be the central stress sensor (red flash). Activated JNK can then act directly on the planar spindle alignment and also could induce the expression of the Dpp/BMP ligands (red arrow). See the main text for details.

Stress induced by bleomycin feeding or bacterial infection increases the expression of the ligands Dpp and Gbb in enterocytes, resulting in a high level of Dpp/BMP signaling activity in both daughter cells [64] (Figure 4). As the Dpp/BMP pathway antagonizes Notch signaling, which is important for enteroblast specification, the two daughter cells keep their stem cell state, leading to an expansion of the ISC pool size [64]. Therefore, Dpp/BMP signaling does not directly act on the division mode, but rather instructs cell identity, and it is likely that JNK signaling is also activated to orient the mitotic spindle parallel to the basement membrane. Interestingly, a high level of BMP activity in enterocytes also triggers the downregulation of *dpp* and *gbb* gene expression. This negative feedback loop in enterocytes is important to reduce ISC population size (by favoring enteroblast-enteroblast symmetric duplication) and to restore homeostasis after tissue regeneration.

What could be the stress-induced signal initiating the symmetric/asymmetric division switch? The JNK pathway is a good candidate to fulfill this function, as (i) it directly controls the spindle orientation, (ii) it is a notorious stress response pathway, and (iii) it has been described as an activator of *dpp* expression [61,66] (Figure 4). The level and/or the timing of JNK activation might be the signal that triggers the switch. For example, mild stress would cause only a small, transient, JNK response, leading to an increased division rate with conservation of the asymmetric mode to replace the affected differentiated cells. In response to robust stress, more ISC are required and could be obtained by high, sustained, JNK activity, which switches the mode in favor of symmetric divisions both by controlling the orientation of the mitotic spindle (through Wdr62 and Kif1A) and by inducing expression of the Dpp/BMP ligands. This model would explain the discrepancies obtained with *Ecc15* infection, which could trigger different responses according to the experimental procedures. In support of this model, it has been shown that a low amount of opportunistic bacteria induces mild early stress response and JNK activation, whereas a high level triggers a prolonged response [67]. Further work is required to definitely decipher the molecular mechanisms involved in stress-induced symmetric/asymmetric ISC division modes and the role of the JNK pathway in this process.

4.2. ISC Division Fate during Aging

In both mammals and insects, aging of the intestine involves microbial dysbiosis, barrier dysfunction, and inflammation. However, whereas studies in mice, though still conflictual, suggest that ISC proliferate less with age [68–71], studies in *Drosophila* have clearly shown that ISC accelerate their proliferation rate [69,72–75]. In old mice, a reduced capacity of the Lgr5+ ISC to proliferate is a consequence of increased mTORC1 signaling, which triggers the decline of Wnt/Wg signaling through the production of the extracellular Wnt inhibitor Notum [68,70] (Table 1). In aged *Drosophila*, loss of acidity in the lumen, induced by metaplasia in the acidic region of the midgut, and immuno-senescence provoke dysbiosis, which in turn triggers chronic elevation of ROS (reactive oxygen species) level in a DUOX- and Keap1/Nrf2-dependent manner [72,74–77]. High ROS level then activates several signaling pathways, among those JNK [72–74]. These signals increase ISC proliferation, but also lead to their mis-differentiation, promoting general gut dysplasia (Figure 5). The progressive loss of cell junctions in enterocytes also contributes to dysplasia formation in a JNK-dependent manner and reduces gut integrity [78,79]. A previous study showed that loss of the βv integrin subunit in enterocytes leads to premature aging of the gut, along with increased JNK activation and ISC symmetric divisions [46]. In addition, in aged flies, the majority of mitotic spindles in dividing ISC are in the planar plane, which is due to high JNK signaling [61]. Restoring the apico-basal orientation of the spindle in aged flies by manipulating the level of JNK, Wdr62, or Kif1A promotes the asymmetric cell fate, delays loss of barrier function, and extends lifespan. All these results indicate that JNK activity increases with age in an ROS-dependent manner, both in enterocytes and in ISC and, along with other signaling pathways, promotes ISC proliferation and mis-differentiation (Figure 5). In addition, JNK in ISC induces the alignment of mitotic spindles in the planar plane, which makes ISC symmetric division a hallmark of aging contributing to the loss of tissue homeostasis in old animals.

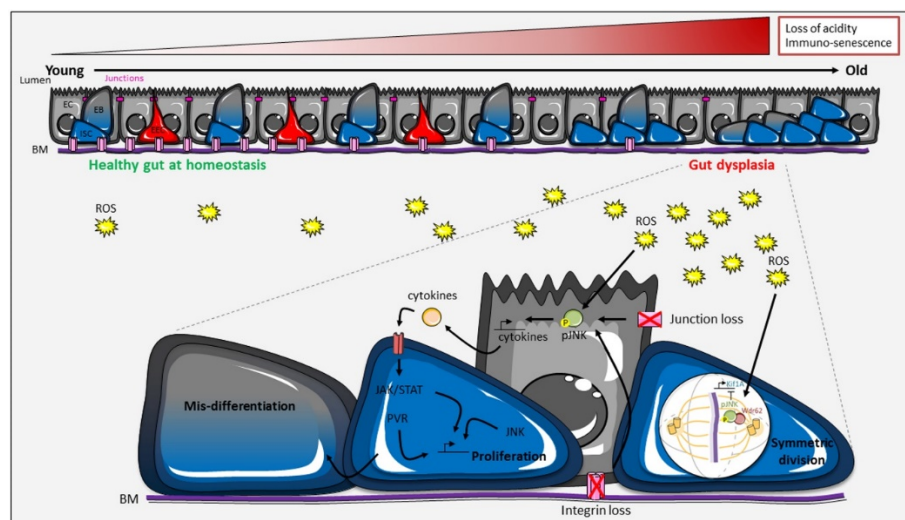


Figure 5. An increase in symmetrical divisions contributes to the aging of the *Drosophila* intestine. Aging is accompanied by loss of lumen acidity and epithelial immuno-senescence, leading to dysbiosis. A rise of reactive oxygen species (ROS) level, as well as the progressive disappearance of cellular junctions and integrins, trigger the activation of several signaling pathways, including JNK. JNK participates in hyper-proliferation of the ISC and increases symmetric divisions by orienting the mitotic spindle parallel to the basement membrane (BM). See the main text for details.

5. Conclusions and Outlooks

In *Drosophila*, ISC division mode, driving two stem cells (symmetric) or one stem cell and one precursor (asymmetric), is a key component in adapting the needs of the gut, whether during homeostasis, adaptive growth, stress-induced regeneration, or aging. The process leading to asymmetric division originates at the cell membrane and is mediated by integrins and polarity complexes,

which promote an oblique orientation of the mitotic spindle with respect to the basement membrane. The Dl/Notch and Dpp/BMP signaling pathways then act to instruct a specific cell fate in each of the daughter cells. During gut homeostasis, 80% of the divisions are asymmetric, and the remaining 20% are symmetric. In the latter case, JNK signaling counteracts the cortical polarity complexes to re-orient the mitotic spindle parallel to the basement membrane. How the precise repartition of the two division modes is maintained is an important, still open, question, but could rely on the Dl/Notch-mediated lateral inhibition. In response to environmental cues, ISC increase their rate of symmetric divisions. This is driven by the IIS and JNK pathways during nutrient-induced growth of the intestine, and the JNK and Dpp/BMP pathways after bacterial or chemical-induced damages. The molecular connections between JNK and the other pathways remain to be established in each condition. During aging, JNK contributes to dysplasia by forcing ISC to increase their symmetric division rate. All these data indicate that JNK signaling is a core molecular determinant of fly gut adaptation through its direct effect on spindle orientation (Table 1). In the mouse small intestine, switching of ISC division modes has been linked to nutrient-induced growth, inflammation, and tumorigenesis. The signaling pathways are starting to be well described (Table 1), but in general, fewer detailed studies on the molecular mechanisms have been carried out. It will be interesting to analyze whether JNK signaling could also be an important regulator of symmetric/asymmetric division modes in mice. In turn, it would also certainly be beneficial to examine in *Drosophila* if the pathways described in the mouse could be involved in the symmetric/asymmetric switch of ISC divisions. Further study of the mechanisms controlling the modes of ISC division is crucial to better understand how the intestine, and tissues in general, adapt to extrinsic signals, as well as how their deregulation can lead to the appearance of pathologies, in particular dysplasia and cancer.

Funding: A.J. is supported by the “Ligue nationale contre le cancer” (LNCC doctoral grant 2018). R.R. is supported by the “Centre national de la recherche scientifique” (CNRS). Our projects are funded by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”, grant number 20171206145 and by the PNR-EST ANSES & ECOPHYTO II (2017). We also receive support from the French government, through the UCAJEDI Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR) with the reference number ANR-15-IDEX-01.

Acknowledgments: We would like to thank all the members of our team “Bioinsecticides, Environment and Health” for fruitful scientific exchanges. We are grateful to Ditte Andersen and Armel Gallet for critical reading of our review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
aPKC	Protein kinase C
AstC	Allatostatin C
BM	Basement membrane
BMP	Bone morphogenetic protein
dILP	<i>Drosophila</i> insulin-like peptide
Dl	Delta
Dpp	Decapentaplegic
DUOX	Dual oxidase
EB	Enteroblast
EC	Enterocytes
<i>Ecc15</i>	<i>Erwinia carotovora carotovora 15</i>
EEC	Enteroendocrine cells
EEP	Enteroendocrine precursor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Esg	Escargot
FMRP	Fragile X mental retardation protein
Gbb	Glass bottom boat
Hh	Hedgehog

Hpo	Hippo
IIS	Insulin/insulin-like growth factor signaling
InR	Insulin receptor
ISC	Intestinal stem cells
JAK	Janus kinases
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kif1A	kinesin family member 1A
Lgl	Lethal (2) giant larvae
Lgr5	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LKB1	Liver kinase B1
Mud	Mushroom body defect
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
N	Notch
NiGFP	Notch intracellular domain fused with GFP
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Pins	Partner of inscuteable
PPAR- δ	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
Pros	Prospero
PVR	Platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor receptor
ROS	Reactive oxygen species
Ser	Serrate
SIRT1	Sirtuin 1
STAT	Signal transducers and activators of transcription
Su(H)	Suppressor of Hairless
Su(H)GBE	Suppressor of Hairless and Grainyhead binding elements
TA	Transit-amplifying precursors
TGF β	Transforming growth factors β
Tk	Tachykinin
TOR	Target or rapamycin
Wdr62	tryptophan-aspartic acid repeat domain 62
Wg	Wingless
Wnt	Wingless integration
Yki	Yorkie

References

1. Tian, H.; Biehs, B.; Warming, S.; Leong, K.G.; Rangell, L.; Klein, O.D.; de Sauvage, F.J. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* **2011**, *478*, 255–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bankaitis, E.D.; Ha, A.; Kuo, C.J.; Magness, S.T. Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 1348–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Buczacki, S.J.A.; Zecchini, H.I.; Nicholson, A.M.; Russell, R.; Vermeulen, L.; Kemp, R.; Winton, D.J. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* **2013**, *495*, 65–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jadhav, U.; Saxena, M.; O'Neill, N.K.; Saadatpour, A.; Yuan, G.-C.; Herbert, Z.; Murata, K.; Shivdasani, R.A. Dynamic reorganization of chromatin accessibility signatures during dedifferentiation of secretory precursors into Lgr5+ intestinal stem cells Graphical Abstract HHS Public Access. *Cell Stem Cell* **2017**, *21*, 65–77. [[CrossRef](#)]
5. Krndija, D.; El Marjou, F.; Guirao, B.; Richon, S.; Leroy, O.; Bellaiche, Y.; Hannezo, E.; Matic Vignjevic, D. Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. *Science* **2019**, *365*, 705–710. [[CrossRef](#)]
6. Li, H.; Jasper, H. Gastrointestinal stem cells in health and disease: From flies to humans. *Dis. Model. Mech.* **2016**, *9*, 487–499. [[CrossRef](#)]
7. Haber, A.L.; Biton, M.; Rogel, N.; Herbst, R.H.; Shekhar, K.; Smillie, C.; Burgin, G.; Delorey, T.M.; Howitt, M.R.; Katz, Y.; et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* **2017**, *551*, 333–339. [[CrossRef](#)]

8. Hung, R.-J.; Hu, Y.; Kirchner, R.; Liu, Y.; Xu, C.; Comjean, A.; Tattikota, S.G.; Li, F.; Song, W.; Ho Sui, S.; et al. A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 1514–1523. [[CrossRef](#)]
9. Micchelli, C.A.; Perrimon, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* **2006**, *439*, 475–479. [[CrossRef](#)]
10. Ohlstein, B.; Spradling, A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **2006**, *439*, 470–474. [[CrossRef](#)]
11. Biteau, B.; Jasper, H. Slit/Robo Signaling Regulates Cell Fate Decisions in the Intestinal Stem Cell Lineage of *Drosophila*. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1867–1875. [[CrossRef](#)]
12. Zeng, X.; Hou, S.X. Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut. *Development* **2015**, *142*, 644–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Guo, Z.; Ohlstein, B. Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science* **2015**, *350*, aab0988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. He, L.; Si, G.; Huang, J.; Samuel, A.D.T.; Perrimon, N. Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel. *Nature* **2018**, *555*, 103–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. He, L.; Binari, R.; Huang, J.; Faló-Sanjuan, J.; Perrimon, N. In vivo study of gene expression with an enhanced dual-color fluorescent transcriptional timer. *eLife* **2019**, *8*, e46181. [[CrossRef](#)]
16. Beehler-Evans, R.; Micchelli, C.A. Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* **2015**, *142*, 654–664. [[CrossRef](#)]
17. Chen, J.; Kim, S.-M.; Kwon, J.Y. A Systematic Analysis of *Drosophila* Regulatory Peptide Expression in Enteroendocrine Cells. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 358–366.
18. Guo, X.; Yin, C.; Yang, F.; Zhang, Y.; Huang, H.; Wang, J.; Deng, B.; Cai, T.; Rao, Y.; Xi, R. The Cellular Diversity and Transcription Factor Code of *Drosophila* Enteroendocrine Cells. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4172–4185. [[CrossRef](#)]
19. Chen, J.; Xu, N.; Wang, C.; Huang, P.; Huang, H.; Jin, Z.; Yu, Z.; Cai, T.; Jiao, R.; Xi, R. Erratum to: Transient Scute activation via a self-stimulatory loop directs enteroendocrine cell pair specification from self-renewing intestinal stem cells. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 991. [[CrossRef](#)]
20. Bertalan, Z.; Zapperi, S.; La Porta, C.A.M. Modeling mechanical control of spindle orientation of intestinal crypt stem cells. *J. Theor. Biol.* **2017**, *430*, 103–108. [[CrossRef](#)]
21. Itzkovitz, S.; Blat, I.C.; Jacks, T.; Clevers, H.; Van Oudenaarden, A. Optimality in the development of intestinal crypts. *Cell* **2012**, *148*, 608–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Snippert, H.J.; van der Flier, L.G.; Sato, T.; van Es, J.H.; van den Born, M.; Kroon-Veenboer, C.; Barker, N.; Klein, A.M.; van Rheenen, J.; Simons, B.D.; et al. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **2010**, *143*, 134–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lopez-Garcia, C.; Klein, A.M.; Simons, B.D.; Winton, D.J. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* **2010**, *330*, 822–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Barker, N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 19–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sei, Y.; Feng, J.; Chow, C.C.; Wank, S.A. Asymmetric cell division-dominant neutral drift model for normal intestinal stem cell homeostasis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2019**, *316*, G64–G74. [[CrossRef](#)]
26. de Navascués, J.; Perdigoto, C.N.; Bian, Y.; Schneider, M.H.; Bardin, A.J.; Martínez-Arias, A.; Simons, B.D. *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. *EMBO J.* **2012**, *31*, 2473–2485. [[CrossRef](#)]
27. O'Brien, L.E.; Soliman, S.S.; Li, X.; Bilder, D. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* **2011**, *147*, 603–614. [[CrossRef](#)]
28. Goulas, S.; Conder, R.; Knoblich, J.A. The par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 529–540. [[CrossRef](#)]
29. Foronda, D.; Weng, R.; Verma, P.; Chen, Y.W.; Cohen, S.M. Coordination of insulin and notch pathway activities by microRNA miR-305 mediates adaptive homeostasis in the intestinal stem cells of the *Drosophila* gut. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 2421–2431. [[CrossRef](#)]
30. Tian, A.; Jiang, J. Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife* **2014**, *3*, 1857. [[CrossRef](#)]
31. Guisoni, N.; Martínez-Corral, R.; García-Ojalvo, J.; de Navascués, J. Diversity of fate outcomes in cell pairs under lateral inhibition. *Development* **2017**, *144*, 1177–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Perdigoto, C.N.; Schweisguth, F.; Bardin, A.J. Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* **2011**, *138*, 4585–4595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sallé, J.; Gervais, L.; Boumard, B.; Stefanutti, M.; Siudeja, K.; Bardin, A.J. Intrinsic regulation of enteroendocrine fate by Numb. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1928–1945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kohlmaier, A.; Fassnacht, C.; Jin, Y.; Reuter, H.; Begum, J.; Dutta, D.; Edgar, B.A. Src kinase function controls progenitor cell pools during regeneration and tumor onset in the *Drosophila* intestine. *Oncogene* **2015**, *34*, 2371–2384. [[CrossRef](#)]
35. Koch, U.; Lehal, R.; Radtke, F. Stem cells living with a Notch. *Development* **2013**, *140*, 689–704. [[CrossRef](#)]
36. Ohlstein, B.; Spradling, A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* **2007**, *315*, 988–992. [[CrossRef](#)]
37. Montagne, C.; Gonzalez-Gaitan, M. Sara endosomes and the asymmetric division of intestinal stem cells. *Development* **2014**, *141*, 2014–2023. [[CrossRef](#)]
38. Maeda, K.; Takemura, M.; Umemori, M.; Adachi-Yamada, T. E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes Cells* **2008**, *13*, 1219–1227. [[CrossRef](#)]
39. Choi, N.H.; Lucchetta, E.; Ohlstein, B. Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18702–18707. [[CrossRef](#)]
40. Guo, Z.; Driver, I.; Ohlstein, B. Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 945–961. [[CrossRef](#)]
41. Li, Z.; Zhang, Y.; Han, L.; Shi, L.; Lin, X. Article Trachea-Derived Dpp Controls Adult Midgut Homeostasis in *Drosophila*. *Dev. Cell* **2013**, *24*, 133–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Morrison, S.J.; Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **2006**, *441*, 1068–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Venkei, Z.G.; Yamashita, Y.M. Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J. Cell Biol* **2018**, *217*, 3785–3795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Blackmore, K.; Zhou, W.; Dailey, M.J. LKB1-AMPK modulates nutrient-induced changes in the mode of division of intestinal epithelial crypt cells in mice. *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 1490–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lu, M.S.; Johnston, C.A. Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* **2013**, *140*, 1843–1856. [[CrossRef](#)]
46. Okumura, T.; Takeda, K.; Taniguchi, K.; Adachi-Yamada, T. β v integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in *Drosophila* adult midgut. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lin, G.; Zhang, X.; Ren, J.; Pang, Z.; Wang, C.; Xu, N.; Xi, R. Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **2013**, *377*, 177–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Biteau, B.; Hochmuth, C.E.; Jasper, H. Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 402–411. [[CrossRef](#)]
49. Buchon, N.; Broderick, N.A.; Kuraishi, T.; Lemaitre, B. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* **2010**, *8*, 152. [[CrossRef](#)]
50. Jiang, H.; Patel, P.H.; Kohlmaier, A.; Grenley, M.O.; McEwen, D.G.; Edgar, B.A. Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* **2009**, *137*, 1343–1355. [[CrossRef](#)]
51. Jiang, H.; Grenley, M.O.; Bravo, M.-J.; Blumhagen, R.Z.; Edgar, B.A. EGFR/Ras/MAPK Signaling Mediates Adult Midgut Epithelial Homeostasis and Regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 84–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chen, C.-H.; Luhur, A.; Sokol, N. Lin-28 promotes symmetric stem cell division and drives adaptive growth in the adult *Drosophila* intestine. *Development* **2015**, *142*, 3478–3487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Luhur, A.; Buddika, K.; Ariyapala, I.S.; Chen, S.; Sokol, N.S. Opposing Post-transcriptional Control of InR by FMRP and LIN-28 Adjusts Stem Cell-Based Tissue Growth. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2671–2677. [[CrossRef](#)]
54. Yilmaz, Ö.H.; Katajisto, P.; Lamming, D.W.; Gültekin, Y.; Bauer-Rowe, K.E.; Sengupta, S.; Birsoy, K.; Dursun, A.; Onur Yilmaz, V.; Selig, M.; et al. MTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* **2012**, *486*, 490–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Beyaz, S.; Mana, M.D.; Roper, J.; Kedrin, D.; Saadatpour, A.; Hong, S.J.; Bauer-Rowe, K.E.; Xifaras, M.E.; Akkad, A.; Arias, E.; et al. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature* **2016**, *531*, 53–58. [[CrossRef](#)]

56. Igarashi, M.; Guarente, L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell* **2016**, *166*, 436–450. [[CrossRef](#)]
57. Mah, A.T.; Van Landeghem, L.; Gavin, H.E.; Magness, S.T.; Lund, P.K. Impact of Diet-Induced Obesity on Intestinal Stem Cells: Hyperproliferation but Impaired Intrinsic Function That Requires Insulin/IGF1. *Endocrinology* **2014**, *155*, 3302–3314. [[CrossRef](#)]
58. Richmond, C.A.; Shah, M.S.; Deary, L.T.; Trotier, D.C.; Thomas, H.; Ambruzs, D.M.; Jiang, L.; Whiles, B.B.; Rickner, H.D.; Montgomery, R.K.; et al. Dormant Intestinal Stem Cells Are Regulated by PTEN and Nutritional Status. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2403–2411. [[CrossRef](#)]
59. Yousefi, M.; Nakauka-Ddamba, A.; Berry, C.T.; Li, N.; Schoenberger, J.; Simeonov, K.P.; Cedeno, R.J.; Yu, Z.; Lengner, C.J. Calorie Restriction Governs Intestinal Epithelial Regeneration through Cell-Autonomous Regulation of mTORC1 in Reserve Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 703–711. [[CrossRef](#)]
60. Martin, J.L.; Sanders, E.N.; Moreno-Roman, P.; Koyama, L.A.J.; Balachandra, S.; Du, X.; O'brien, L.E. Long-term live imaging of the drosophila adult midgut reveals real-time dynamics of division, differentiation and loss. *Elife* **2018**, *7*, e36248. [[CrossRef](#)]
61. Hu, D.J.-K.; Jasper, H. Control of Intestinal Cell Fate by Dynamic Mitotic Spindle Repositioning Influences Epithelial Homeostasis and Longevity. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 2807–2823. [[CrossRef](#)]
62. Bu, P.; Wang, L.; Chen, K.Y.; Srinivasan, T.; Murthy, P.K.L.; Tung, K.L.; Varanko, A.K.; Chen, H.J.; Ai, Y.; King, S.; et al. A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 189–202. [[CrossRef](#)]
63. Zhai, Z.; Boquete, J.P.; Lemaitre, B. A genetic framework controlling the differentiation of intestinal stem cells during regeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tian, A.; Wang, B.; Jiang, J. Injury-stimulated and self-restrained BMP signaling dynamically regulates stem cell pool size during *Drosophila* midgut regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E2699–E2708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Jin, Y.; Patel, P.H.; Kohlmaier, A.; Pavlovic, B.; Zhang, C.; Edgar, B.A. Intestinal Stem Cell Pool Regulation in *Drosophila*. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 4–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Stronach, B.E.; Perrimon, N. Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* **1999**, *18*, 6172–6182. [[CrossRef](#)]
67. Loudhaief, R.; Brun-Barale, A.; Benguetat, O.; Nawrot-Esposito, M.-P.; Pauron, D.; Amichot, M.; Gallet, A. Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development* **2017**, *144*, 808–819. [[CrossRef](#)]
68. Jasper, H. Intestinal Stem Cell Aging: Origins and Interventions. *Annu. Rev. Physiol.* **2020**, *82*, 203–226. [[CrossRef](#)]
69. Nalapareddy, K.; Nattamai, K.J.; Kumar, R.S.; Karns, R.; Wikenheiser-Brokamp, K.A.; Sampson, L.L.; Mahe, M.M.; Sundaram, N.; Yacyshyn, M.B.; Yacyshyn, B.; et al. Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2608–2621. [[CrossRef](#)]
70. Pentinmikko, N.; Iqbal, S.; Mana, M.; Andersson, S.; Cognetta, A.B.; Suci, R.M.; Roper, J.; Luopajarvi, K.; Markelin, E.; Gopalakrishnan, S.; et al. Notum produced by Paneth cells attenuates regeneration of aged intestinal epithelium. *Nature* **2019**, *571*, 398–402. [[CrossRef](#)]
71. He, D.; Wu, H.; Xiang, J.; Ruan, X.; Peng, P.; Ruan, Y.; Chen, Y.G.; Wang, Y.; Yu, Q.; Zhang, H.; et al. Gut stem cell aging is driven by mTORC1 via a p38 MAPK-p53 pathway. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Biteau, B.; Hochmuth, C.E.; Jasper, H. JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 442–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Choi, N.H.; Kim, J.G.; Yang, D.J.; Kim, Y.S.; Yoo, M.A. Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* **2008**, *7*, 318–334. [[CrossRef](#)]
74. Buchon, N.; Broderick, N.A.; Chakrabarti, S.; Lemaitre, B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2333–2344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Hochmuth, C.E.; Biteau, B.; Bohmann, D.; Jasper, H. Redox regulation by keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 188–199. [[CrossRef](#)]
76. Guo, L.; Karpac, J.; Tran, S.L.; Jasper, H. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell* **2014**, *156*, 109–122. [[CrossRef](#)]

77. Li, H.; Qi, Y.; Jasper, H. Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 240–253. [[CrossRef](#)]
78. Resnik-Docampo, M.; Koehler, C.L.; Clark, R.I.; Schinaman, J.M.; Sauer, V.; Wong, D.M.; Lewis, S.; D'Alterio, C.; Walker, D.W.; Jones, D.L. Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behaviour to maintain homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 52–59. [[CrossRef](#)]
79. Salazar, A.M.; Resnik-Docampo, M.; Ulgherait, M.; Clark, R.I.; Shirasu-Hiza, M.; Jones, D.L.; Walker, D.W. Intestinal Snakeskin Limits Microbial Dysbiosis during Aging and Promotes Longevity. *iScience* **2018**, *9*, 229–243. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANNEXE II : L'intestin de la drosophile comme modèle d'étude : les outils puissants utilisés.

Généralités

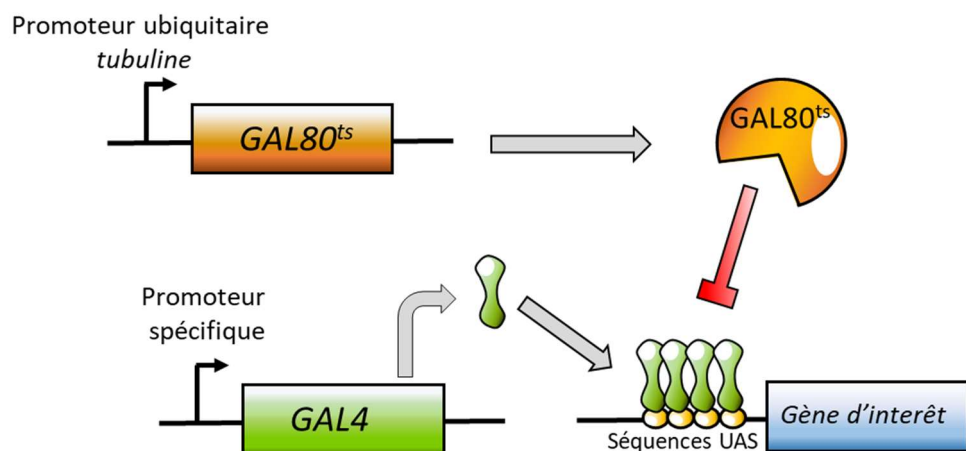
La drosophile est un insecte de quelques millimètres appartenant à l'ordre des Diptères de la famille des *Drosophilidae*. Communément appelée « mouche du vinaigre » ou encore « mouche des fruits » (en anglais « *fruit fly* »), elle est connue pour pondre dans les fruits. En 1933, Thomas Hunt Morgan (embryologiste et généticien américain) reçoit le prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses travaux sur l'implication des chromosomes de *Drosophila melanogaster* dans l'hérédité. Dès lors, la drosophile devient un organisme modèle d'étude en génétique et en développement. Sa petite taille et son cycle de vie rapide (10 jours à 25°C et 3 semaines à 18°C) rend son élevage très facile dans le but d'obtenir un grand nombre d'individus permettant l'usage de statistiques robustes. Son génome étant entièrement séquencé et annoté depuis 2000 (Adams et al., 2000; Myers et al., 2000; Reese et al., 2000), sa génétique est très bien connue et maîtrisée. Un total d'environ 180 Mb et 13,600 gènes s'organisent en 4 paires de chromosomes. Une paire de chromosomes sexuels X/Y, et 3 paires d'autosomes nommées 2, 3 et 4. La 4^{ème} paire étant si petite (quelques mégabases) et majoritairement composée d'hétérochromatine qu'elle est bien souvent omise (Sun et al., 2000). Au-delà de la génétique, la biologie des cellules, la physiologie et les mécanismes moléculaires sont très conservés chez la majorité des animaux, notamment chez l'Humain. De nos jours, des bases de données très enrichies et constamment mises à jour permettent d'utiliser et d'analyser des données génétiques et d'interactions variées ouvrant de grandes possibilités de recherches grâce à la drosophile (Flybase.org). De très nombreux outils génétiques ont été développés, et les lignées de drosophiles sont à disposition dans des centres de stocks comme le *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC) et le *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) (Hales KG 2015 ; Osterwalder T 2001). Ainsi, l'intestin de la drosophile a servi de modèle puissant et génétiquement accessible pour l'étude de nombreux mécanismes comme la régénération de l'intestin et la biologie des cellules souches épithéliales (Ayyaz et al., 2019b; Benoit Biteau et al., 2011; Jasper, 2020; H. Li & Jasper, 2016a; Miguel-Aliaga et al., 2018).

Système UAS/GAL4

Initialement présent chez la levure, ce système est très largement utilisé chez la drosophile depuis 1993 (Brand & Perrimon, 1993). Il s'agit d'un système à deux composantes permettant d'exprimer un gène d'intérêt de façon tissu ou cellule spécifique. La protéine **GAL4** de levure est un activateur de la transcription qui se fixe sur des séquences spécifiques, les **UAS** (*Upstream Activation Sequences*), pour activer l'expression de gènes en aval. Ainsi, en contrôlant l'expression de la protéine GAL4 à l'aide d'un promoteur tissu ou cellule spécifique, on peut y faire exprimer un transgène d'intérêt placé en aval de séquences UAS. Un très grand nombre de lignées de drosophiles sont disponibles dans des centres de stocks comme celui de Bloomington ou de Vienne. On y trouve notamment des lignées contrôlant l'expression de GAL4 par de nombreux promoteurs, et des lignées transgéniques ou RNAi diverses sous le contrôle de séquences UAS. En croisant ces lignées, les possibilités sont gigantesques.

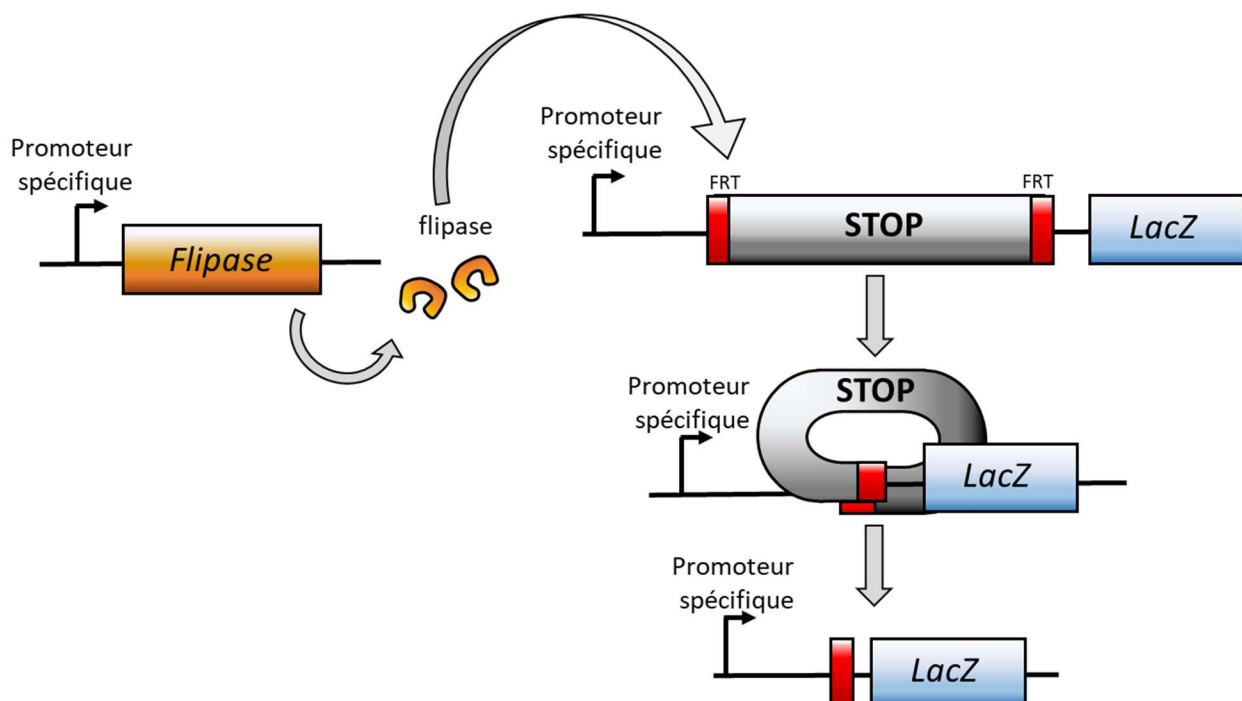
Système TARGET

La protéine **GAL80** est un répresseur de la protéine GAL4. Sous l'influence d'un promoteur, Gal80 peut éteindre le système **UAS/GAL4**. Une forme thermosensible de la protéine GAL80 ($GAL80^{ts}$) permet de contrôler son action temporellement en fonction de la température. A 18°C, la protéine est capable de réprimer le système GAL4, tandis qu'elle ne l'est plus à 25°C, et encore moins à 29°C. Cela permet notamment d'utiliser une mutation létale durant l'embryogénèse chez l'adulte.



Système Flp-out

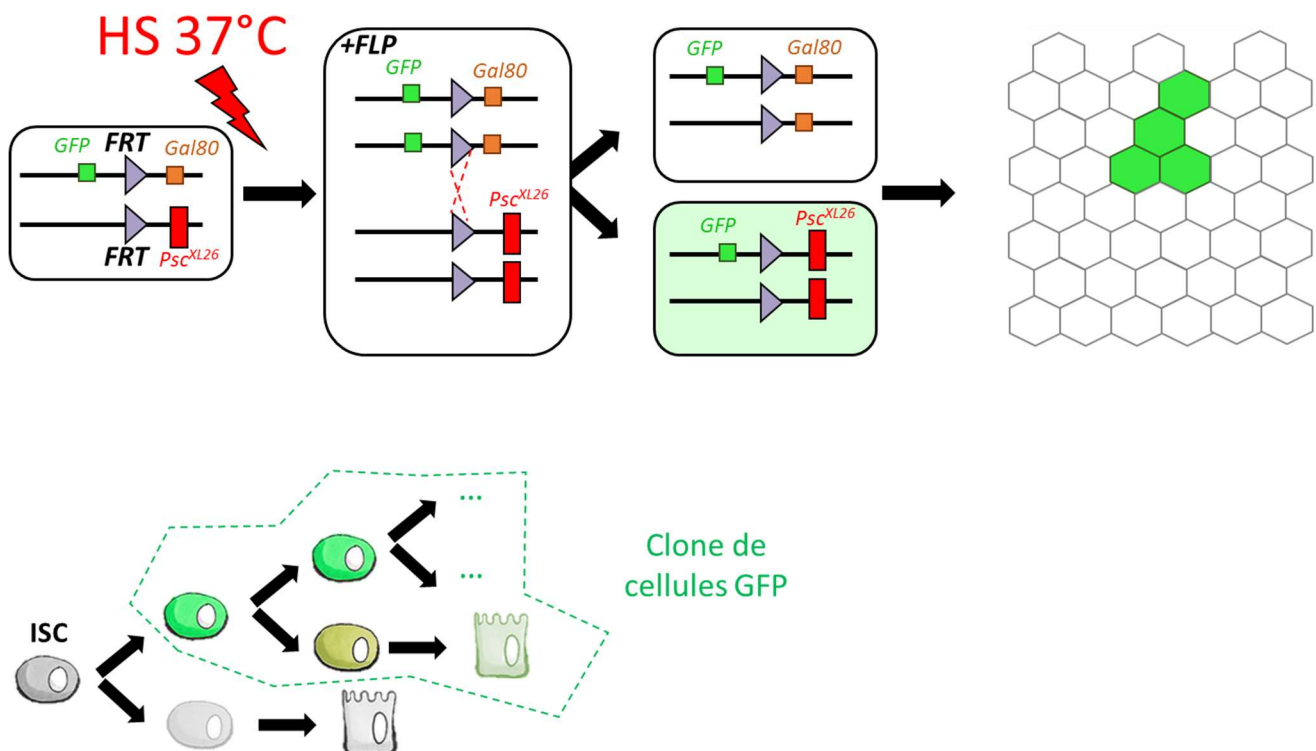
Provenant également de la levure, il s'agit d'un autre système permettant le contrôle spatio-temporel d'un transgène (Golic & Lindquist, 1989). La recombinase de levure nommée **Flipase (Flp)** reconnaît des sites spécifiques, les **FRT**, afin d'effectuer un événement de recombinaison entre ces sites. De cette façon, il est possible d'activer l'expression d'un transgène initialement réprimé par un signal d'arrêt transcriptionnel (cassette **STOP**) flanqué de sites FRT, pouvant être éliminés par l'expression de la Flp (Bischof & Basler, 2008; Golic & Lindquist, 1989). La Flp peut être placée sous le contrôle d'un promoteur défini pour piloter spatialement son expression, mais également temporellement par un choc thermique grâce à un promoteur de choc thermique utilisé pour contrôler son expression (*hs-FLP*). La Flp peut également être utilisée pour enlever l'expression d'un facteur GAL80 et ajouter un niveau de contrôle supplémentaire au système GAL4/UAS.



Système MARCM

Le système MARCM (*Mosaic analysis with a repressible cell marker*) permet de marquer des cellules ou des groupes de cellules de même lignée, d'y générer des mutations homozygotes et d'exprimer un gène de choix (T. Lee & Luo, 1999). Ici, il est utilisé pour étudier le comportement d'un groupe de cellules homozygotes mutantes dans un tissu hétérozygote sauvage en utilisant le système hsFlp-FRT inducible par choc thermique. La protéine GAL80 sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire réprime l'activité de GAL4 et empêche l'expression d'un rapporteur associé à la membrane (UAS-CD8::GFP). Des sites FRT sont placés à proximité de la mutation dans un bras chromosomique et à proximité de GAL80 dans le bras chromosomique homologue. La recombinaison mitotique induite par le choc thermique génère des clones mutants homozygotes qui ont perdu le GAL80 répressif et qui sont donc marqués par l'expression de la GFP.

L'ensemble de ces systèmes ont fait l'objet d'une revue très bien expliquée (Del Valle Rodríguez et al., 2012).



ANNEXE III : REVUE 2 - Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin. *A. Joly, J. Soltys, A. Gallet, R. Rousset. Médecine/sciences, 2020.*

L'intestin moyen de drosophile comme modèle d'étude

L'intestin est un organe vital qui, en plus de remplir les fonctions de digestion et d'absorption des nutriments, constitue la principale barrière face aux agresseurs ingérés avec la nourriture. Ceux-ci peuvent être de différente nature, comme par exemple des agents biologiques pathogènes (virus, bactéries, toxines) ou des produits chimiques (médicaments, pesticides, polluants). Il est crucial pour l'organisme que cet organe, malgré son activité quotidienne intense et les attaques qu'il subit, demeure intègre. L'intestin a ainsi développé une capacité phénoménale de renouvellement, qui est de quelques jours chez les mammifères et de deux semaines environ chez les insectes. Il est pourvu pour cela de cellules souches intestinales (*intestinal stem cells* ou ISC) qui sont par définition indifférenciées et qui résident au sein même du tissu. Ces ISC adaptent leur prolifération et leur différenciation afin de renouveler les cellules endommagées ou mortes de l'intestin, tout en limitant le risque de développer des cancers. De par ses similitudes structurelles et fonctionnelles avec celui des vertébrés, l'intestin de drosophile sert de modèle pour l'étude des processus d'homéostasie (équilibre cellulaire et physiologique en condition normale) et de régénération [1]. Son extrémité antérieure est l'équivalent de l'œsophage des mammifères, l'intestin moyen correspond à l'intestin grêle et la partie postérieure au colon (Figure 1A). L'intestin moyen/grêle fait l'objet de nombreuses études du fait de son rôle crucial dans l'absorption des nutriments et la réponse immunitaire. Il est colonisé par un ensemble de bactéries composant le microbiote intestinal, avec lequel il entretient une relation mutualistique où chacune des deux parties en tire des bénéfices. Malgré des similitudes morphologiques et fonctionnelles, quelques différences subsistent entre l'intestin moyen de la drosophile et l'intestin grêle des mammifères. Alors que l'épithélium de l'intestin grêle s'organise en cryptes et en villosités, l'épithélium intestinal de drosophile est plat (Figure 1A). Ce dernier ne produit pas de mucus,

Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin

Aurélia Joly, Julie Soltys, Armel Gallet, Raphaël Rousset



Équipe « Bioinsecticides, Environnement et Santé », Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, France.
aurelia.joly@etu.univ-cotedazur.fr
julie.soltys@inrae.fr
armel.gallet@univ-cotedazur.fr
raphael.rousset@univ-cotedazur.fr

mais, comme chez tous les insectes, possède à la place une membrane péritrophique. Les ISC se divisent en fonction des besoins de façon symétrique, pour générer deux ISC ou deux précurseurs, ou asymétrique pour donner une ISC et un précurseur. Il existe deux types de lignées de cellules différenciées issues de la division des ISC : la lignée des entérocytes (EC) et celle des cellules sécrétrices (Figure 1B). Alors que les EC sont responsables principalement de la production des enzymes digestives et l'absorption des nutriments, les cellules sécrétrices se distinguent par différentes fonctions chez les mammifères : la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, la sécrétion de mucus par les cellules goblet, la sécrétion d'interleukines par les cellules tuft et la sécrétion d'hormones par les cellules entéroendocrines (EEC). Chez la drosophile, les cellules de Paneth, goblet et tuft sont absentes et leurs fonctions sont en grande partie assurées par les EC et EEC. Cependant, certaines fonctions précises sont assurées par d'autres cellules. Ainsi, les cellules du proventricule, situées à l'extrémité antérieure de l'intestin moyen, sécrètent des molécules (mucines) de la membrane péritrophique qui sont similaires à celles du mucus sécrétées par les cellules goblet chez les mammifères. Plusieurs voies de signalisation conservées (Wnt/Wg, *Wingless integration/Wingless* ; BMP, *Bone Morphogenetic Pathway* ; TNF- α , *Tumor Necrosis Factor alpha* ; JNK, *c-Jun N-terminal Kinase* ; JAK/STAT, *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription* ; Notch ; EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor* ; Hippo/Yorkie) régulent l'homéostasie et la régénération de l'épithélium intestinal en contrôlant la prolifération, la différenciation, l'inflammation et la mort cellulaire [1]. La dérégulation de ces voies est très souvent impliquée dans le développement de pathologies inflammatoires et tumorales (Figure 2).



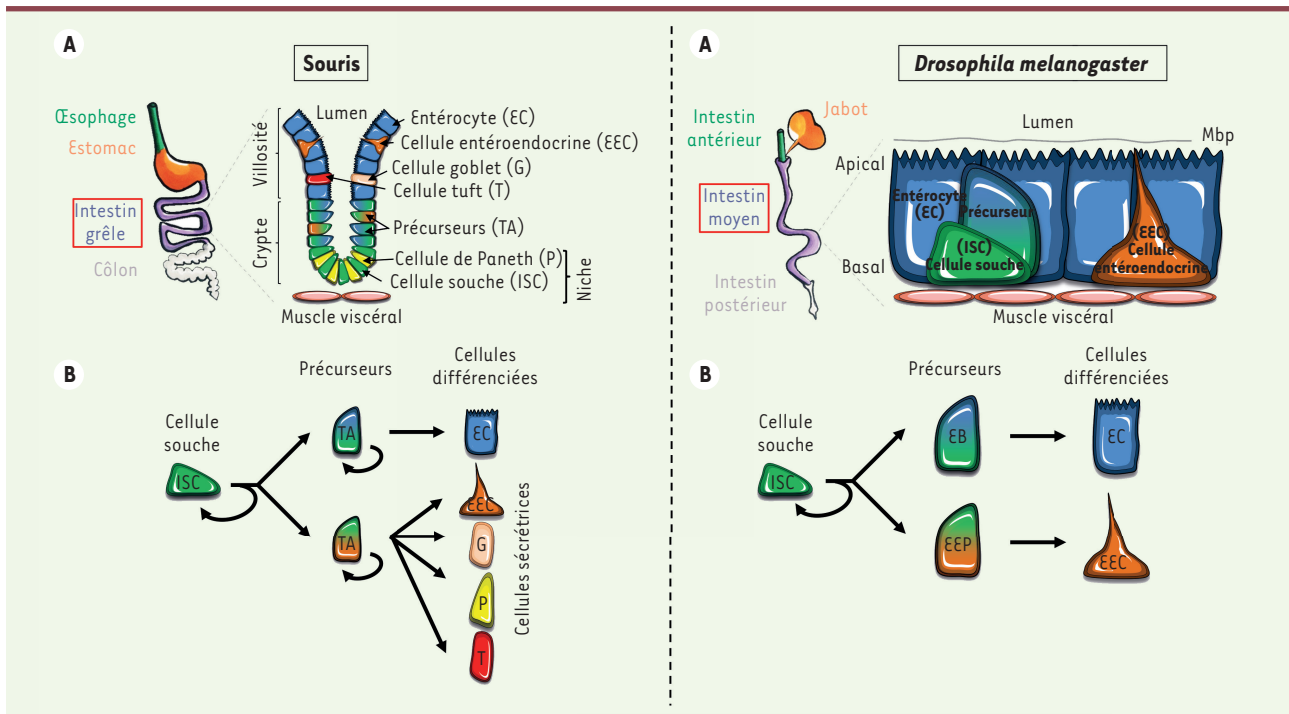


Figure 1. Organisation tissulaire et cellulaire (A) et lignage issu des cellules souches (B) de l'intestin grêle de souris (à gauche) et de l'intestin moyen de drosophile (à droite). A. L'intestin grêle chez la souris est organisé en une succession de cryptes et villosités. Les ISC sont localisées à la base des cryptes, qui fournit tous les signaux nécessaires au bon fonctionnement des cellules souches (niche). Les cellules différenciées issues de la division des ISC migrent au sommet des villosités, à l'exception des cellules de Paneth qui restent dans la crypte. Chez la drosophile, l'intestin moyen est plat. Les ISC restent cependant localisées au niveau basal. B. La division asymétrique des ISC permet un renouvellement de la cellule souche pour maintenir un pool constant (flèche de retour), et la génération d'un précurseur, soit de la lignée entérocyte, soit de la lignée entéroendocrine. Les précurseurs TA de mammifères possèdent également des capacités prolifératives (flèches de retour). Voir le texte principal pour les détails. ISC : Intestinal Stem Cell ; TA : Transit-Amplifying cells ; EC : entérocyte ; EEC : cellule entéroendocrine ; G : cellule goblet ; P : cellule de Paneth ; T : cellule tuft ; EB : entéroblaste ; EEP : précurseur EEC ; mbp : membrane péritrophique.

L'activation de la voie du TNF- α est ainsi un facteur important dans l'apparition des maladies inflammatoires de l'intestin (colite ulcéreuse, maladie de Crohn) [2]. Des mutations du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) dans la voie Wnt/Wg, de Ras dans la voie de l'EGFR et de p53 sont les plus fréquentes et mènent au développement de tumeurs de l'intestin, notamment la polypose adénomateuse familiale (qui précède le développement tumoral dans la quasi-totalité des cas) et le cancer colorectal [3]. Il a été montré à la fois chez la souris et la drosophile que les cellules qui sont à l'origine de cette tumorigenèse sont les ISC [4,5]. L'inflammation est un élément clé au développement de cancers, permettant sa progression de la dysplasie à la tumorigenèse (Figure 2). Il s'avère donc important de contrôler les mécanismes inflammatoires afin qu'ils ne deviennent pas chroniques. Lors d'infections, la présence dans l'intestin de bactéries allochtones (provenant de l'extérieur et n'appartenant pas au microbiote intestinal) est rapidement détectée, ce qui conduit à la mise en place d'une réaction immunitaire inflammatoire transitoire qui est bénéfique afin de se débarrasser de l'agresseur (Figure 2). Il est désormais bien établi que cette inflammation augmente le risque de cancers, comme en témoigne la bactérie *Helicobacter pylori* dans le cadre de cancers gastriques [6]. Une étude a par ailleurs montré

que l'infection par la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* (retrouvée chez l'homme) de drosophiles possédant une forme latente de l'oncogène Ras induisait une dysplasie de l'intestin, révélant une synergie entre infection bactérienne et prédisposition génétique [7]. Chez la drosophile, la dysplasie est un dysfonctionnement provoqué par une augmentation de l'activité de la voie JNK, se caractérisant par une hyper-prolifération des ISC et leur mauvaise différenciation [8]. Le développement de dysplasies de l'intestin devient fréquent avec l'âge. En effet, lors du vieillissement, apparaît une perte de diversité du microbiote, notamment de bactéries bénéfiques, ce qui provoque un déséquilibre (dysbiose) en faveur de bactéries pro-inflammatoires. Cette dysbiose entraîne une activation chronique de plusieurs voies de signalisation inflammatoires, notamment les voies NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et JNK [9]. Ainsi, bactéries, inflammation, dysplasie et cancer sont étroitement liés, mettant en lumière l'importance de l'équilibre cellulaire et physiologique des cellules intestinales.

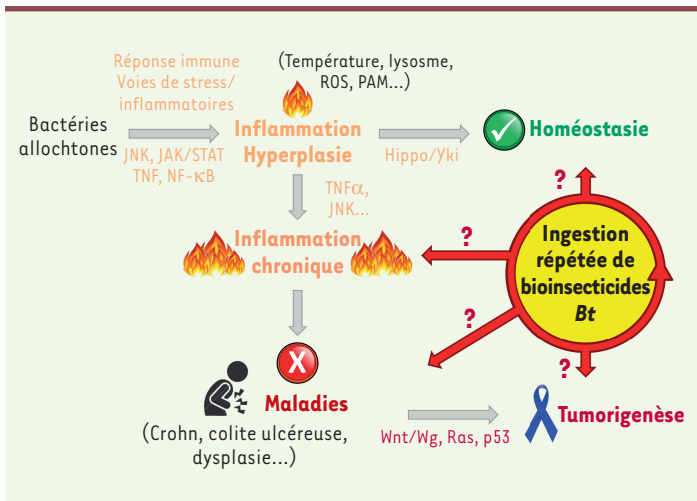


Figure 2. Réponse intestinale à des infections bactériennes. L'intestin met en place une réaction inflammatoire transitoire afin de combattre les bactéries allochtones. Dans certains cas, une inflammation chronique se développe, qui débouche sur des maladies intestinales (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, dysplasie, etc.), voire des cancers. Notre projet est d'évaluer si l'ingestion chronique de bioinsecticides à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pourrait déclencher ou renforcer cette voie pathologique. Voir le texte principal pour les détails. ROS : espèces réactives d'oxygène ; PAM : peptides antimicrobiens.

Les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis*

Face aux incitations à réduire l'utilisation des pesticides chimiques (tel que le plan EcoPhyto II en France¹), celle des bioinsecticides ne cesse de croître en compensation pour lutter contre les nuisibles. Parmi eux, ceux à base de spores de la bactérie allochtone *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) représentent le second insecticide le plus vendu (75% des bioinsecticides et 4% du marché global des insecticides en 2018, représentant plus de 32 000 tonnes/an). Ces produits permettent de lutter notamment contre les larves de la famille des lépidoptères (chenilles de papillons) qui attaquent les cultures maraîchères (choux, tomates, maïs etc.). *Bt* est une bactérie Gram-positif sporulante appartenant au groupe *B. cereus*, *Bt* et *B. cereus* étant très proches génétiquement. À l'instar de *B. cereus*, *Bt* possède les mêmes gènes codant les entérotoxines responsables des syndromes diarrhéiques [10]. *Bt* se distingue de *B. cereus* par son pouvoir entomopathogène dû à la présence dans la spore, forme résistante qu'adopte la bactérie en condition défavorable, d'un corps d'inclusion cristallin contenant des toxines appelées Cry. La cible des bioinsecticides *Bt*, composés de la bactérie sous forme de spores et des cristaux Cry, est le tube intestinal des ravageurs. Après ingestion, les cristaux sont solubilisés, libérant les toxines Cry dans l'intestin. Une fois activées par des enzymes protéolytiques digestives, elles se lient à des récepteurs de types cadhérines, amino-peptidases, phosphatases alcalines et transporteurs à « ATP Binding Cassette » (également appelés « transporteurs ABC »). Ces interactions spécifiques entraînent

la formation de pores dans l'épithélium intestinal. Les bactéries *Bt* végétatives qui ont germé peuvent alors traverser la barrière intestinale pour se multiplier dans le milieu intérieur, ce qui provoque une septicémie. Après son ingestion, *Bt* tue le ravageur, appelé alors sensible ou cible, en deux à trois jours.

L'accroissement actuel de l'utilisation des bioinsecticides augmente la présence des spores de *Bt* dans l'environnement et dans l'alimentation. Bien que des études aient montré l'innocuité de *Bt* pour des organismes non-cibles (insectes non-sensibles et vertébrés) sur une courte période (toxicité aiguë) [11], les effets indésirables potentiels d'une exposition à long terme (toxicité chronique) ne sont pas connus. Le groupe *B. cereus* est responsable de nombreuses intoxications alimentaires, qui sont largement attribuées à *B. cereus* lui-même. Cependant, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses ; Saisine n° 2013-SA-0039) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA ; EFSA-Q-2015-00254) soulignent le manque d'études sur les effets à long terme de *Bt* et sur la probable sous-estimation de l'implication de *Bt* dans des toxi-infections alimentaires. Une étude récente vient de montrer que plusieurs souches *Bt* provenant de biopesticides commerciaux ont été retrouvées dans des aliments associés à des intoxications humaines [10]. Deux études de cohortes de grande envergure (623 080 femmes au Royaume-Uni, et 68 946 femmes/hommes en France) se sont attachées à estimer l'impact de la nourriture issue de l'agriculture biologique (« bio ») sur la santé humaine [12, 13]. Les deux études ont trouvé une baisse de l'incidence des lymphomes non-hodgkiniens, pour lesquels les pesticides sont un facteur à risque. L'étude d'outre-Manche a montré de plus une augmentation de l'incidence du cancer du sein (post-ménopausé) associée à la consommation « bio ». En revanche, manger de la nourriture « bio », plutôt que des aliments traités en agriculture conventionnelle (avec pesticides), n'induit pas d'amélioration sur le développement du cancer colorectal. Cela soulève donc la question quant à l'effet potentiellement néfaste de l'exposition aux biopesticides sur ce type de cancers. Ces résultats souffrent cependant de la limite des études épidémiologiques impliquant une multiplicité des facteurs et de leurs interactions possibles. Par exemple, le style/condition de vie et la qualité nutritionnelle ne sont pas les mêmes pour les consommateurs de produits « bio » par rapport à la population générale, rendant difficile les conclusions quant au facteur véritablement déterminant. Une autre étude a utilisé le modèle drosophile

¹ <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>

pour évaluer l'effet de la nourriture « bio » sur la santé, et a montré un bénéfice pour certains critères de vie tels que la longévité et la fertilité [14]. Cependant, tout comme les deux études épidémiologiques décrites ci-dessus, le traitement d'origine des produits n'est pas contrôlé. De plus, les mouches ont été élevées sur des milieux contenant exclusivement des extraits de fruits/légumes « bio » ou conventionnels, c'est-à-dire sans complément nutritif additionnel, ce qui ne correspond pas à une nourriture optimale de la mouche (notamment au niveau protéique). Ainsi, mêmes les mouches nourries avec des fruits ou légumes conventionnels montrent une durée de vie limitée et une fertilité réduite par rapport à des mouches élevées sur un milieu traditionnel de laboratoire. Toutes ces études présentent donc une certaine limite, et il apparaît nécessaire de développer un modèle d'étude qui permette d'évaluer de manière contrôlée l'impact à long terme des bioinsecticides, notamment ceux à base de *Bt* qui sont largement majoritaires.

Notre projet de recherche

Notre projet de recherche est d'étudier les impacts d'une prise alimentaire quotidienne de spores de *Bt* (bioinsecticides commerciaux) sur le développement de maladies inflammatoires et de cancers de l'intestin grâce à la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Figure 2). Ce modèle « insecte » présente l'avantage de ne pas être sensible à la toxicité aiguë des spores de *Bt* et de ses toxines, ce qui nous permet d'analyser les effets de l'exposition chronique à long terme. Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'ingestion ponctuelle de faibles quantités de bactéries *Bt* végétatives (forme proliférative) induisait, via les voies de signalisation JNK, JAK/STAT et Hippo/Yorkie, une augmentation transitoire du nombre de cellules (hyperplasie), compromettant la physiologie de l'intestin adulte [15]. Afin de mimer au mieux une exposition naturelle, notre équipe a développé un protocole d'intoxication chronique utilisant une dose de bioinsecticides commerciaux qui correspond à la quantité de spores *Bt* retrouvée sur les légumes après traitement (dose environnementale d'épandage). Nous utilisons ce protocole pour évaluer l'impact de l'ingestion chronique des bioinsecticides *Bt* sur la longévité et la physiologie intestinale des mouches, en focalisant notre étude sur des drosophiles adultes matures, mais également sur des drosophiles fragiles, c'est-à-dire nouvellement écloses (mouches immatures), âgées ou encore ayant des prédispositions génétiques à développer des pathologies intestinales, puisque ces facteurs pourraient se révéler aggravant pour l'intoxication par *Bt*. Nous étudions à partir de ces différentes populations si l'ingestion chronique de *Bt* avec la nourriture affecte leur durée de vie, ainsi que la morphologie et la physiologie de leur intestin. Grâce à des techniques de biologie cellulaire, nous regardons après dissection des intestins si la structure, la composition cellulaire et l'organisation intercellulaire au sein du tissu sont affectées, et si oui quels peuvent en être les mécanismes.

L'utilisation de la drosophile permettra d'aborder cette problématique d'un point de vue génétique, moléculaire, cellulaire et physiologique. La conservation des mécanismes régissant l'homéostasie, l'inflammation et la réponse immunitaire de l'intestin suggère que, si impact il y a, *Bt*

pourrait avoir un effet semblable chez les mammifères, dont l'homme. Il sera ainsi intéressant d'analyser les effets des produits *Bt* chez d'autres modèles animaux tels que la souris. Ces travaux permettront à terme de déterminer si une inflammation induite de façon persistante par l'ingestion répétée de *Bt* via l'alimentation pourrait favoriser et/ou accélérer le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin, voire des cancers (Figure 2). Si tel est le cas, il sera important à l'avenir d'établir un seuil de quantité de *Bt* par gramme de fruits/légumes au-dessus duquel l'aliment serait impropre à la consommation afin d'optimiser les conditions d'usage des bioinsecticides *Bt* (dose d'épandage, nombre de traitements) et de consommation des denrées traitées (méthodes de lavage). De plus, il pourrait être préconisé aux personnes fragiles présentant déjà des pathologies inflammatoires intestinales d'être particulièrement attentives à la consommation de ces produits alimentaires « bio ». Enfin, nos travaux permettront également de renforcer les connaissances fondamentales sur la relation entre les bactéries allochtones, l'inflammation et le développement de tumeurs. ♦

Impact of *Bacillus thuringiensis*-based bioinsecticides on the development of intestinal cancers

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les membres de notre équipe « Bioinsecticides, Environnement et Santé » pour leur aide et pour les échanges scientifiques fructueux sur notre projet.

FINANCEMENTS

Ce projet est soutenu par la Ligue Nationale Contre le Cancer (allocation doctorale d'Aurélia Joly, appel à projets 2018), par le PNR-EST ANSES & ECOPHYTO II (2017) et par la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (contrat N°20171206145). Ce travail bénéficie également d'une aide du gouvernement français, gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du projet Investissements d'Avenir UCAJEDI portant la référence n° ANR-15-IDEX-01.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Li H, Jasper H. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Dis Model Mech* 2016 ; 9 : 487-99.
2. Ruder B, Atreya R, Becker C. Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. *Int J Mol Sci* 2019 ; 20.
3. Poulin EJ, Haigis KM. No back seat for a progression event - K-RAS as a therapeutic target in CRC. *Genes Dev* 2017 ; 31 : 333-5.
4. Barker N, Ridgway RA, Es JH Van, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009 ; 457 : 608-11.
5. Lee WC, Beebe K, Sudmeier L, et al. Adenomatous polyposis coli regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation. *Development* 2009 ; 136 : 2255-64.
6. Martel C de, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009 ; 70 : 183-94.

RÉFÉRENCES

7. Apidianakis Y, Pitsouli C, Perrimon N, *et al.* Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 20883-8.
8. Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H. JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* 2008 ; 3 : 442-55.
9. Jasper H. Intestinal stem cell aging: origins and interventions. *Annu Rev Physiol* 2020 ; 82 : 203-26.
10. Johler S, Kalbhenn EM, Heini N, *et al.* Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 1915.
11. Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J Appl Toxicol* 2016 ; 36 : 630-48.
12. Bradbury KE, Balkwill A, Spencer EA, *et al.* Organic food consumption and the incidence of cancer in a large prospective study of women in the United Kingdom. *Br J Cancer* 2014 ; 110 : 2321-6.
13. Baudry J, Assmann KE, Touvier M, *et al.* Association of frequency of organic food consumption with cancer risk: findings from the NutriNet-Santé prospective cohort study. *JAMA Intern Med* 2018 ; 178 : 1597-606.
14. Chhabra R, Kolli S, Bauer JH. Organically grown food provides health benefits to *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2013 ; 8.
15. Loudhaief R, Brun-Barale A, Benguetat O, *et al.* Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development* 2017 ; 144 : 808-19.

TIRÉS À PART

A. Joly



/ Lieu privilégié d'écriture pour des chercheurs et cliniciens-chercheurs reconnus au plan international..., mais aussi pour les jeunes scientifiques et médecins en formation.

/ Éditoriaux, Synthèses, Nouvelles et Dossiers techniques : une information scientifique et médicale intelligible, précise et mise en perspective.

/ Des analyses et débats sur l'Histoire de la médecine et de la biologie, un regard critique sur les retombées diagnostiques et thérapeutiques des dernières avancées et leurs dimensions éthiques dans les Forums, Chroniques et Perspective/Horizons.

/ Un panorama clair et concis de l'actualité scientifique : des schémas et tableaux synthétiques et lisibles, des données chiffrées, une bibliographie utile, afin qu'aucun fait biologique et médical ne vous échappe.

médecine/sciences est indexé dans PubMed/Medline, Current Contents, série Life Sciences, EMBASE/Excerpta Medica PASCAL CABS BIOSIS

Avec *m/s*, vivez en direct les progrès et débats de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE *M/S*
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Pour recevoir un numéro de *m/s* gratuitement inscrivez-vous sur www.medecinesciences.org



BIBLIOGRAPHIE

- Achour, C., & Aguilo, F. (2018). Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer biology. In *Frontiers in Bioscience - Landmark* (Vol. 23, Issue 11, pp. 2106–2132). Frontiers in Bioscience. <https://doi.org/10.2741/4693>
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461, pp. 2185–2195). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., & Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Developmental Cell*, 5(3), 441–450. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00244-2)
- Alfieri, C., Gambetta, M. C., Matos, R., Glatt, S., Sehr, P., Fraterman, S., Wilm, M., Müller, J., & Müller, C. W. (2013). Structural basis for targeting the chromatin repressor Sfinb to Polycomb response elements. *Genes & Development*, 27(21), 2367–2379. <https://doi.org/10.1101/GAD.226621.113>
- Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fern Andez Esc Amez, P. S., Giron, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Ricci, A., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Kuile, B. Ter, ... Sanchis, V. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7), e04524. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4524>
- Almeida, M., Bowness, J. S., & Brockdorff, N. (2020a). The many faces of Polycomb regulation by RNA. *Current Opinion in Genetics & Development*, 61, 53–61. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2020.02.023>
- Almeida, M., Bowness, J. S., & Brockdorff, N. (2020b). The many faces of Polycomb regulation by RNA. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 61, pp. 53–61). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.02.023>
- Almeida, M., Pintacuda, G., Masui, O., Koseki, Y., Gdula, M., Cerase, A., Brown, D., Mould, A., Innocent, C., Nakayama, M., Schermelleh, L., Nesterova, T. B., Koseki, H., & Brockdorff, N. (2017). PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), 1081–1084. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL2512>
- Alonso, A. G. D. A., Gutiérrez, L., Fritsch, C., Papp, B., Beuchle, D., & Müller, J. (2007). A genetic screen identifies novel polycomb group genes in *Drosophila*. *Genetics*, 176(4), 2099–2108. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.075739>
- Althobiti, M., Muftah, A. A., Aleskandarany, M. A., Joseph, C., Toss, M. S., Green, A., & Rakha, E. (2020). The prognostic significance of BMI1 expression in invasive breast cancer is dependent on its molecular subtypes. *Breast Cancer Research and Treatment*, 182(3), 581–589. <https://doi.org/10.1007/S10549-020-05719-X>

- Andersen, D. S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., Toggweiler, J., Basler, K., Mapelli, M., Hueber, A. O., & Léopold, P. (2015). The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature*, *522*(7557), 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature14298>
- Andriatsilavo, M., Gervais, L., Fons, C., & Bardin, A. J. (2013). [The Drosophila midgut as a model to study adult stem cells]. *Medecine Sciences : M/S*, *29*(1), 75–81. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2013291016>
- Antonello, Z. A., Reiff, T., & Dominguez, M. (2015). Mesenchymal to epithelial transition during tissue homeostasis and regeneration: Patching up the Drosophila midgut epithelium. *Fly*, *9*(3), 132–137. <https://doi.org/10.1080/19336934.2016.1140709>
- Argyridou, E., & Parsch, J. (2018). Regulation of the X chromosome in the germline and soma of drosophila melanogaster males. *Genes*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/genes9050242>
- Arthur, J. C., & Jobin, C. (2011). The struggle within: Microbial influences on colorectal cancer. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 17, Issue 1, pp. 396–409). Inflamm Bowel Dis. <https://doi.org/10.1002/ibd.21354>
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*(3), 343–346. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-343>
- Ashktorab, H., Belgrave, K., Hosseinkhah, F., Brim, H., Nouraie, M., Takkikto, M., Hewitt, S., Lee, E. L., Dashwood, R. H., & Smoot, D. (2009). Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, *54*(10), 2109–2117. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0601-7>
- Ashton-Beaucage, D., Lemieux, C., Udell, C. M., Sahmi, M., Rochette, S., & Therrien, M. (2016). The Deubiquitinase USP47 Stabilizes MAPK by Counteracting the Function of the N-end Rule ligase POE/UBR4 in Drosophila. *PLOS Biology*, *14*(8), e1002539. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002539>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019521>
- Augui, S., & Heard, E. (2008). [Inactivation of X chromosome: cells know how to count two X chromosomes]. *Medecine Sciences : M/S*, *24*(6–7), 584–585. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20082467584>
- Ayyaz, A., Kumar, S., Sangiorgi, B., Ghoshal, B., Gosio, J., Ouladan, S., Fink, M., Barutcu, S., Trcka, D., Shen, J., Chan, K., Wrana, J. L., & Gregorieff, A. (2019a). Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell. *Nature*, *569*(7754), 121–125. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1154-y>
- Ayyaz, A., Kumar, S., Sangiorgi, B., Ghoshal, B., Gosio, J., Ouladan, S., Fink, M., Barutcu, S., Trcka, D., Shen, J., Chan, K., Wrana, J. L., & Gregorieff, A. (2019b). Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell. *Nature*, *569*(7754), 121–125. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1154-y>
- Ayyaz, A., Li, H., & Jasper, H. (2015). Haemocytes control stem cell activity in the Drosophila intestine.

Nature Cell Biology, 17(6), 736–748. <https://doi.org/10.1038/NCB3174>

- Babin, A., Nawrot-Esposito, M. P., Gallet, A., Gatti, J. L., & Poirié, M. (2020). Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73145-6>
- Bankaitis, E. D., Ha, A., Kuo, C. J., & Magness, S. T. (2018). Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury. In *Gastroenterology* (Vol. 155, Issue 5, pp. 1348–1361). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.016>
- Barber, T. D., McManus, K., Yuen, K. W. Y., Reis, M., Parmigiani, G., Shen, D., Barrett, I., Nouhi, Y., Spencer, F., Markowitz, S., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lengauer, C., & Hieter, P. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3443–3448. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712384105>
- Barbour, H., Daou, S., Hendzel, M., & Affar, E. B. (2020). Polycomb group-mediated histone H2A monoubiquitination in epigenome regulation and nuclear processes. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19722-9>
- Bardet, P. L. (2009). [Developmental control of organ growth by the Hippo pathway]. *Medecine Sciences : M/S*, 25(3), 253–257. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2009253253>
- Bardin, A. J., Perdogoto, C. N., Southall, T. D., Brand, A. H., & Schweisguth, F. (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development*, 137(5), 705–714. <https://doi.org/10.1242/dev.039404>
- Barker, N. (2008). The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 468, 5–15. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6_1
- 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., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/NATURE06196>
- Barker, N., Van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2012). Identifying the stem cell of the intestinal crypt: Strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell*, 11(4), 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.009>
- Bausek, N. (2013). JAK-STAT signaling in stem cells and their niches in *Drosophila*. *JAK-STAT*, 2(3), e25686. <https://doi.org/10.4161/JKST.25686>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019505>
- Beebe, K., Lee, W. C., & Micchelli, C. A. (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology*, 338(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.045>
- Beehler-Evans, R., & Micchelli, C. A. (2015). Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development (Cambridge)*, 142(4), 654–664. <https://doi.org/10.1242/dev.114959>
- Behrens, A., Van Deursen, J. M., Rudolph, K. L., & Schumacher, B. (2014). Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. In *Nature Cell Biology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 201–207). Nature

Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncb2928>

- Beisel, C., & Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature Reviews. Genetics*, *12*(2), 123–135. <https://doi.org/10.1038/NRG2932>
- Bel, Y., Ferré, J., & Hernández-Martínez, P. (2020). Bacillus thuringiensis Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. *Toxins*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12120785>
- Ben-Saadon, R., Zaaroor, D., Ziv, T., & Ciechanover, A. (2006). The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Molecular Cell*, *24*(5), 701–711. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2006.10.022>
- Benguettat, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D., & Gallet, A. (2018). The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathogens*, *14*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279>
- Bergink, S., Salomons, F. A., Hoogstraten, D., Groothuis, T. A. M., De Waard, H., Wu, J., Yuan, L., Citterio, E., Houtsmuller, A. B., Neeffjes, J., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., & Dantuma, N. P. (2006). DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes & Development*, *20*(10), 1343–1352. <https://doi.org/10.1101/GAD.373706>
- Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of Bacillus thuringiensis-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *32*(2), 156–173. <https://doi.org/10.1006/rtph.2000.1426>
- Beumer, J., & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(1), 39–53. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0278-0>
- Bezsonova, I., Walker, J. R., Bacik, J. P., Duan, S., Dhe-Paganon, S., & Arrowsmith, C. H. (2009). Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins. *Biochemistry*, *48*(44), 10542–10548. <https://doi.org/10.1021/BI901131U>
- Biggel, M., Etter, D., Corti, S., Brodmann, P., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., & Johler, S. (2022). Whole Genome Sequencing Reveals Biopesticidal Origin of Bacillus thuringiensis in Foods. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.775669>
- Biggel, M., Jessberger, N., Kovac, J., & Johler, S. (2022). Recent paradigm shifts in the perception of the role of Bacillus thuringiensis in foodborne disease. In *Food Microbiology* (Vol. 105). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104025>
- Bischof, J., & Basler, K. (2008). Recombinases and their use in gene activation, gene inactivation, and transgenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *420*, 175–195. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_10
- Biteau, Benoit, Hochmuth, C. E., & Jasper, H. (2011). Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell*, *9*(5), 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.004>
- Biteau, Benoît, Hochmuth, C. E., & Jasper, H. (2008). JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging Drosophila Gut. *Cell Stem Cell*, *3*(4), 442–455. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.024>

- Biteau, Benoît, & Jasper, H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, *138*(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1242/DEV.056671>
- Biteau, Benoît, & Jasper, H. (2014). Slit/Robo Signaling Regulates Cell Fate Decisions in the Intestinal Stem Cell Lineage of *Drosophila*. *Cell Reports*, *7*(6), 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.024>
- Biteau, Benoît, Karpac, J., Supoyo, S., DeGennaro, M., Lehmann, R., & Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *6*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001159>
- Blackledge, N. P., & Klose, R. J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 12, pp. 815–833). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00398-y>
- Bond, D., & Foley, E. (2012). Autocrine platelet-derived growth factor-vascular endothelial growth factor receptor-related (Pvr) pathway activity controls intestinal stem cell proliferation in the adult *Drosophila* midgut. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(33), 27359–27370. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.378018>
- Bonfini, A., Liu, X., & Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Developmental and Comparative Immunology*, *64*, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.008>
- Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., Radomski, N., Duboisset, A., Arar, C., Sarda, X., Vial, G., Mistou, M. Y., Firmesse, O., Hennekinne, J. A., & Herbin, S. (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. *PLOS ONE*, *16*(2), e0246885. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0246885>
- Boulangé, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. In *Genome Medicine* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* *2006* *441*:7091, *441*(7091), 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature04733>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401–415. <https://doi.org/10.1101/lm.1331809>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *49*(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.11.022>
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2011.02.006>
- Bray, S., Musisi, H., & Bienz, M. (2005). Bre1 is required for Notch signaling and histone modification.

- Developmental Cell*, 8(2), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.11.020>
- Broderick, N. A., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2014). Microbiota-induced changes in *Drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *MBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01117-14>
- Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2012). Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. In *Gut Microbes* (Vol. 3, Issue 4). Gut Microbes. <https://doi.org/10.4161/gmic.19896>
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L., & Kassis, J. A. (1998). The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Molecular Cell*, 1(7), 1057–1064. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80106-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80106-9)
- Brühl, C. A., Després, L., Frör, O., Patil, C. D., Poulin, B., Tetreau, G., & Allgeier, S. (2020). Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Science of The Total Environment*, 724, 137800. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137800>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., & Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development*, 23(19), 2333–2344. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., & Lemaitre, B. (2009b). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development*, 23(19), 2333–2344. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host and Microbe*, 5(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Buchon, N., Broderick, N. a, Kuraishi, T., & Lemaitre, B. (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, 8, 152. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-152>
- Buchon, N., Osman, D., David, F. P. A., Yu Fang, H., Boquete, J.-P., Deplancke, B., & Lemaitre, B. (2013). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports*, 3(5), 1725–1738. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.04.001>
- Buttó, L. F., & Haller, D. (2016). Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 306, Issue 5, pp. 302–309). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.02.010>
- Cai, J., Xi, J., & Wei, Y. (2020). Measuring crop motility and food passaging in *drosophila*. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(159). <https://doi.org/10.3791/61181>
- Cairnie, A. B., Lamerton, L. F., & Steel, G. G. (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat: I. Determination of the kinetic parameters. *Experimental Cell Research*, 39(2–3), 528–538. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90055-8)
- Cao, R., Wang, H., He, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2008). Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1862–1872. <https://doi.org/10.1128/MCB.01589-07>
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y.

- (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science (New York, N. Y.)*, 298(5595), 1039–1043. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1076997>
- Cao, R., & Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2004.02.001>
- Capo, F., Wilson, A., & Di Cara, F. (2019). The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7090336>
- Carroll, L. M., Cheng, R. A., & Kovac, J. (2020). No Assembly Required: Using BType3 to Assess the Congruency of a Proposed Taxonomic Framework for the *Bacillus cereus* Group With Historical Typing Methods. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2285. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.580691/BIBTEX>
- Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2021). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>
- Casida, J. E., & Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicology Research*, 6(6), 755. <https://doi.org/10.1039/C7TX00198C>
- Cavalli, G., & Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489–499. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1411-0>
- Cenik, B. K., & Shilatifard, A. (2021). COMPASS and SWI/SNF complexes in development and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 22(1), 38–58. <https://doi.org/10.1038/S41576-020-0278-0>
- Cha, T. L., Zhou, B. P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C. C., Chen, C. Te, Ping, B., Otte, A. P., & Hung, M. C. (2005). Molecular biology: Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science*, 310(5746), 306–310. <https://doi.org/10.1126/science.1118947>
- Chen, Ji, Kim, S.-M., & Kwon, J. Y. (2016). A Systematic Analysis of *Drosophila* Regulatory Peptide Expression in Enteroendocrine Cells. *Mol. Cells*, 39(4), 358–366. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0014>
- Chen, Jia, Sayadian, A.-C., Lowe, N., Lovegrove, H. E., & St Johnston, D. (2018a). An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLOS Biology*, 16(10), e3000041. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000041>
- Chen, Jia, Sayadian, A. C., Lowe, N., Lovegrove, H. E., & St Johnston, D. (2018b). An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLOS Biology*, 16(10), e3000041. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000041>
- Chen, Jun, Xu, N., Wang, C., Huang, P., Huang, H., Jin, Z., Yu, Z., Cai, T., Jiao, R., & Xi, R. (2018). Erratum to: Transient Scute activation via a self-stimulatory loop directs enteroendocrine cell pair specification from self-renewing intestinal stem cells. In *Nature Cell Biology* (Vol. 20, Issue 8, p. 991). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0053-z>
- Chen, Y. nan, Hou, S. qiang, Jiang, R., Sun, J. long, Cheng, C. dong, & Qian, Z. run. (2021). EZH2 is a potential prognostic predictor of glioma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(2), 925–936. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16149>

- Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 537–561. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001410407>
- Chiacchiera, F., & Pasini, D. (2017). Control of adult intestinal identity by the Polycomb repressive machinery. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *16*(3), 243–244. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1252582>
- Chiacchiera, F., Rossi, A., Jammula, S., Piunti, A., Scelfo, A., Ordóñez-Morán, P., Huelsken, J., Koseki, H., & Pasini, D. (2016). Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/ β -Catenin Transcriptional Activity. *Cell Stem Cell*, *18*(1), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.019>
- Chiacchiera, F., Rossi, A., Jammula, S., Zanotti, M., & Pasini, D. (2016). PRC2 preserves intestinal progenitors and restricts secretory lineage commitment. *The EMBO Journal*, *35*(21), 2301–2314. <https://doi.org/10.15252/embj.201694550>
- Chittenden, T. W., Howe, E. A., Culhane, A. C., Sultana, R., Taylor, J. M., Holmes, C., & Quackenbush, J. (2008). Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics*, *91*(6), 508–511. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.03.002>
- Choi, N. H., Kim, J. G., Yang, D. J., Kim, Y. S., & Yoo, M. A. (2008). Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell*, *7*(3), 318–334. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00380.x>
- Choi, N. H., Lucchetta, E., & Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(46), 18702–18707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109348108>
- Clark, R. I., Salazar, A., Yamada, R., Fitz-Gibbon, S., Morselli, M., Alcaraz, J., Rana, A., Rera, M., Pellegrini, M., Ja, W. W., & Walker, D. W. (2015). Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Reports*, *12*(10), 1656–1667. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.004>
- Classen, A.-K., Bunker, B. D., Harvey, K. F., Vaccari, T., & Bilder, D. (2009). A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nature Genetics*, *41*(10), 1150–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.445>
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. In *Cell* (Vol. 148, Issue 6, pp. 1258–1270). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, *154*(2), 274. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.07.004>
- Cohen, I., Bar, C., & Ezhkova, E. (2020). Activity of PRC1 and Histone H2AK119 Monoubiquitination: Revising Popular Misconceptions. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *42*(5). <https://doi.org/10.1002/BIES.201900192>
- Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N. P., DeMarco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., Heger, A., & Brockdorff, N. (2014). Targeting polycomb to

- pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Reports*, 7(5), 1456–1470. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.04.012>
- Cordero, J. B., & Sansom, O. J. (2012). Wnt signalling and its role in stem cell-driven intestinal regeneration and hyperplasia. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 204(1), 137–143. <https://doi.org/10.1111/J.1748-1716.2011.02288.X>
- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107438>
- Czernin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., & Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, 111(2), 185–196. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00975-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00975-3)
- D'Angelo, V., Iannotta, A., Ramaglia, M., Lombardi, A., Zarone, M. R., Desiderio, V., Affinita, M. C., Pecoraro, G., Di Martino, M., Indolfi, P., Casale, F., & Caraglia, M. (2015). EZH2 is increased in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and is a suitable molecular target in combination treatment approaches. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-015-0191-0>
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., & Jørgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology*, 23(3), 146–150. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.1996.TB00051.X>
- Darnell, J. E. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5332.1630>
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Genet.37.110801.143042*, 37, 409–433. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.37.110801.143042>
- de Napoles, M., Mermoud, J. E., Wakao, R., Tang, Y. A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T. B., Silva, J., Otte, A. P., Vidal, M., Koseki, H., & Brockdorff, N. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Developmental Cell*, 7(5), 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.10.005>
- Del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., & Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nature Methods*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1800>
- Derrien, T., & Guigó, R. (2011). [Long non-coding RNAs with enhancer-like function in human cells]. *Medicine Sciences : M/S*, 27(4), 359–361. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2011274009>
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16s rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11), 2383–2400. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1186/GB-2005-6-8-227>
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A., & Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila*

- and Mammals. *Cell*, 130(6), 1120–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.019>
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60, pp. 17–34). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>
- Douglas, A. E. (2019). Simple animal models for microbiome research. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 12, pp. 764–775). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0242-1>
- Dubois, R. N. (2014). Role of inflammation and inflammatory mediators in colorectal cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25125751/>
- Duchet, C., Tetreau, G., Marie, A., Rey, D., Besnard, G., Perrin, Y., Paris, M., David, J. P., Lagneau, C., & Després, L. (2014). Persistence and recycling of bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* spores in contrasting environments: evidence from field monitoring and laboratory experiments. *Microbial Ecology*, 67(3), 576–586. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0360-7>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–184. <https://doi.org/10.1038/NATURE10137>
- Durkin, S. G., Ragland, R. L., Arlt, M. F., Mülle, J. G., Warren, S. T., & Glover, T. W. (2008). Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHIT/FRA3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 246–251. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708097105>
- Durkin, Sandra G., & Glover, T. W. (2007). Chromosome fragile sites. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 41, pp. 169–192). Annu Rev Genet. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.165900>
- Dutta, D., Buchon, N., Xiang, J., & Edgar, B. A. (2015). Regional Cell Specific RNA Expression Profiling of FACS Isolated *Drosophila* Intestinal Cell Populations. In *Current Protocols in Stem Cell Biology* (Vol. 34, Issue 1, pp. 2F.2.1-2F.2.14). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02f02s34>
- Eagen, K. P., Aiden, E. L., & Kornberg, R. D. (2017). Polycomb-mediated chromatin loops revealed by a subkilobase-resolution chromatin interaction map. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(33), 8764–8769. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1701291114>
- EFSA. (2018). Reply to the article “In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—a response to EFSA.” In *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 94, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX171>
- Ehling-Schulz, M., Koehler, T. M., & Lereclus, D. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0032-2018>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K.,

- Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boultonwood, J., Grand, F. H., & Cross, N. C. P. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics* 42:8, 42(8), 722–726. <https://doi.org/10.1038/ng.621>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/NRG3074>
- Facchino, S. (2010). *Rôle du gène Polycomb BMI1 dans le maintien et la radiorésistance des cellules souches cancéreuses*. <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/4921>
- Fan, Xiaolan, Liang, Q., Lian, T., Wu, Q., Gaur, U., Li, D., Yang, D., Mao, X., Jin, Z., Li, Y., Yang, M., Fan, X., Liang, Q., Lian, T., Wu, Q., Gaur, U., Li, D., Yang, D., Mao, X., ... Yang, M. (2015). Rapamycin preserves gut homeostasis during *Drosophila* aging. *Oncotarget*, 6(34), 35274–35283. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5895>
- Fan, Xiaoyan, Jin, Y., Chen, G., Ma, X., & Zhang, L. (2021). Gut Microbiota Dysbiosis Drives the Development of Colorectal Cancer. In *Digestion* (Vol. 102, Issue 4, pp. 508–515). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000508328>
- Fasano, C. A., Dimos, J. T., Ivanova, N. B., Lowry, N., Lemischka, I. R., & Temple, S. (2007). shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell*, 1(1), 87–99. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2007.04.001>
- Fast, D., Kostiuk, B., Foley, E., & Pukatzki, S. (2018). Commensal pathogen competition impacts host viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(27), 7099–7104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802165115>
- Feng, Siqian, Huang, J., & Wang, J. (2011). Loss of the Polycomb group gene polyhomeotic induces non-autonomous cell overproliferation. *EMBO Reports*, 12(2), 157–163. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2010.188>
- Feng, Siqian, Thomas, S., & Wang, J. (2012). Diverse tumor pathology due to distinctive patterns of JAK/STAT pathway activation caused by different *Drosophila* polyhomeotic alleles. *Genetics*, 190(1), 279–282. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.135442>
- Feng, Suhua, Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P. Y., Bostick, M., Goll, M. G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S. H., Halpern, M. E., Ukomadu, C., Sadler, K. C., Pradhan, S., Pellegrini, M., & Jacobsen, S. E. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8689–8694. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1002720107/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201002720SI.PDF>
- Fernandez-Luna, M. T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., & Miranda-Rios, J. (2010). An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Microbiology*, 12(3), 746–757. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.02117.X>
- Ferrari, F., Alekseyenko, A. A., Park, P. J., & Kuroda, M. I. (2014). Transcriptional control of a whole chromosome: emerging models for dosage compensation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(2), 118–125. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2763>
- Fitieh, A., Locke, A. J., Motamedi, M., & Ismail, I. H. (2021). The role of polycomb group protein BMI1 in DNA repair and genomic stability. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol.

22, Issue 6, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22062976>

- Flack, J. E., Mieszczanek, J., Novcic, N., & Bienz, M. (2017). Wnt-Dependent Inactivation of the Groucho/TLE Co-repressor by the HECT E3 Ubiquitin Ligase Hyd/UBR5. *Molecular Cell*, *67*(2), 181–193.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.009>
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *357*(6348). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL2380>
- Flora, P., Dalal, G., Cohen, I., & Ezhkova, E. (2021). Polycomb repressive complex(Es) and their role in adult stem cells. In *Genes* (Vol. 12, Issue 10, p. 1485). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes12101485>
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. Á., Ahn, N., ... Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, *37*(4), 391–400. <https://doi.org/10.1038/ng1531>
- Frangini, A., Sjöberg, M., Roman-Trufero, M., Dharmalingam, G., Haberle, V., Bartke, T., Lenhard, B., Malumbres, M., Vidal, M., & Dillon, N. (2013). The aurora B kinase and the polycomb protein ring1B combine to regulate active promoters in quiescent lymphocytes. *Molecular Cell*, *51*(5), 647–661. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.08.022>
- Frey, F., Sheahan, T., Finkl, K., Stoehr, G., Mann, M., Benda, C., & Müller, J. (2016). Molecular basis of PRC1 targeting to polycomb response elements by PhoRC. *Genes and Development*, *30*(9), 1116–1127. <https://doi.org/10.1101/GAD.279141.116/-/DC1>
- Fritsch, C., Beuchle, D., & Müller, J. (2003). Molecular and genetic analysis of the Polycomb group gene Sex combs extra/Ring in Drosophila. *Mechanisms of Development*, *120*(8), 949–954. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00083-2)
- Fursova, N. A., Blackledge, N. P., Nakayama, M., Ito, S., Koseki, Y., Farcas, A. M., King, H. W., Koseki, H., & Klose, R. J. (2019). Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene Repression. *Molecular Cell*, *74*(5), 1020–1036.e8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.03.024>
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.-A., Pezet, D., & Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(2), 501–518. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>
- Gaillard, H., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *15*(5), 276–280. <https://doi.org/10.1038/NRC3916>
- Gambetta, M. C., Oktaba, K., & Müller, J. (2009). Essential role of the glycosyltransferase sxc/Ogt in polycomb repression. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(5936), 93–96. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1169727>
- Gao, Z., Lee, P., Stafford, J. M., Schimmelman, M. Von, Schaefer, A., & Reinberg, D. (2014). An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature*, *516*(7531), 349–354. <https://doi.org/10.1038/NATURE13921>
- Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., & Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes.

- Molecular Cell*, 45(3), 344–356. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.01.002>
- Garcia, A. M., Calder, R. B., Dollé, M. E. T., Lundell, M., Kapahi, P., & Vijg, J. (2010). Age- and temperature-dependent somatic mutation accumulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 6(5), 27. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000950>
- Gargalionis, A. N., Piperi, C., Adamopoulos, C., & Papavassiliou, A. G. (2012). Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(8), 1276–1289. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2012.05.002>
- Gaviria Rivera, A. M., Granum, P. E., & Priest, F. G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 151–155. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2000.TB09278.X>
- Gelbart, M. E., Larschan, E., Peng, S., Park, P. J., & Kuroda, M. I. (2009). *Drosophila* MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(8), 825–832. <https://doi.org/10.1038/NSMB.1644>
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., & Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 2016 529:7585, 529(7585), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Gervais, L., van den Beek, M., Josserand, M., Sallé, J., Stefanutti, M., Perdigoto, C. N., Skorski, P., Mazouni, K., Marshall, O. J., Brand, A. H., Schweisguth, F., & Bardin, A. J. (2019). Stem Cell Proliferation Is Kept in Check by the Chromatin Regulators Kismet/CHD7/CHD8 and Trr/MLL3/4. *Developmental Cell*, 49(4), 556–573.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.033>
- Giner-Laguarda, N., & Vidal, M. (2020). Functions of Polycomb Proteins on Active Targets. *Epigenomes*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/EPIGENOMES4030017>
- Gladyshev, V. N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(4), 727–731. <https://doi.org/10.1089/ARS.2013.5228>
- Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 59(3), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90033-0)
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01474-7>
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., & Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, 513(2–3), 242–246. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02321-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02321-9)
- Gonda, T. A., Tu, S., & Wang, T. C. (2009). Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. In *Cell Cycle* (Vol. 8, Issue 13, pp. 2005–2013). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8985>
- González, I., Simón, R., & Busturia, A. (2009). The Polyhomeotic protein induces hyperplastic tissue overgrowth through the activation of the JAK/STAT pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*,

8(24), 4103–4111. <https://doi.org/10.4161/CC.8.24.10212>

- Gonzalez, J. M., Brown, B. J., & Carlton, B. C. (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(22 I), 6951–6955. <https://doi.org/10.1073/PNAS.79.22.6951>
- Goulas, S., Conder, R., & Knoblich, J. A. (2012). The par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell*, 11(4), 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.017>
- Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.07.076>
- Graham, C., Stefanatos, R., Yek, A. E. H., Spriggs, R. V., Loh, S. H. Y., Uribe, A. H., Zhang, T., Martins, L. M., Maddocks, O. D. K., Scialo, F., & Sanz, A. (2022). Mitochondrial ROS signalling requires uninterrupted electron flow and is lost during ageing in flies. *GeroScience*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00555-x>
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.2007.S110>
- Griego, V. M., & Spence, K. D. (1978). Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(5), 906–910. <https://doi.org/10.1128/AEM.35.5.906-910.1978>
- Grimaud, C., Nègre, N., & Cavalli, G. (2006). From genetics to epigenetics: The tale of Polycomb group and trithorax group genes. In *Chromosome Research* (Vol. 14, Issue 4, pp. 363–375). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1069-y>
- Grimm, C., Matos, R., Ly-Hartig, N., Steuerwald, U., Lindner, D., Rybin, V., Müller, J., & Müller, C. W. (2009). Molecular recognition of histone lysine methylation by the Polycomb group repressor dSfmbt. *The EMBO Journal*, 28(13), 1965–1977. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.147>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 447–464. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1995.0630>
- Groussin, M., & Mazel, F. (2017). Évolution des microbiotes intestinaux de mammifères et ses conséquences sur la santé humaine. *Médecine/Sciences*, 33(12), 1038–1042. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173312007>
- Gultekin, Y., & Steller, H. (2019). Axin proteolysis by iduna is required for the regulation of stem cell proliferation and intestinal homeostasis in *Drosophila*. *Development (Cambridge)*, 146(6). <https://doi.org/10.1242/dev.169284>
- Guo, L., Karpac, J., Tran, S. L., & Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell*, 156(1–2), 109–122.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.018>

- Guo, W. J., Datta, S., Band, V., & Dimri, G. P. (2007). Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(2), 536–546. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-05-0447>
- Guo, X., Huang, H., Yang, Z., Cai, T., & Xi, R. (2019). *Stem Cell Reports Article Division of Labor: Roles of Groucho and CtBP in Notch-Mediated Lateral Inhibition that Controls Intestinal Stem Cell Differentiation in Drosophila*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.03.005>
- Guo, X., Yin, C., Yang, F., Zhang, Y., Huang, H., Wang, J., Deng, B., Cai, T., Rao, Y., & Xi, R. (2019). The Cellular Diversity and Transcription Factor Code of Drosophila Enteroendocrine Cells. *Cell Reports*, *29*(12), 4172–4185.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.048>
- Guo, Z., & Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates Drosophila intestinal stem cell multipotency. *Science*, *350*(6263), aab0988. <https://doi.org/10.1126/science.aab0988>
- Guo, Zheng, Driver, I., & Ohlstein, B. (2013). Injury-induced BMP signaling negatively regulates Drosophila midgut homeostasis. *Journal of Cell Biology*, *201*(6), 945–961. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302049>
- Guo, Zheng, & Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates Drosophila intestinal stem cell multipotency. *Science*, *350*(6263), 927. <https://doi.org/10.1126/science.aab0988>
- Ha, E. M., Lee, K. A., Seo, Y. Y., Kim, S. H., Lim, J. H., Oh, B. H., Kim, J., & Lee, W. J. (2009). Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature Immunology*, *10*(9), 949–957. <https://doi.org/10.1038/ni.1765>
- Haber, A. L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R. H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T. M., Howitt, M. R., Katz, Y., Tirosh, I., Beyaz, S., Dionne, D., Zhang, M., Raychowdhury, R., Garrett, W. S., Rozenblatt-Rosen, O., Shi, H. N., Yilmaz, O., ... Regev, A. (2017). A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*, *551*(7680), 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature24489>
- Hachfi, S., Benguettat, O., & Gallet, A. (2019). Hypochlorous Acid Staining with R19-S in the Drosophila Intestine upon Ingestion of Opportunistic Bacteria. *BIO-PROTOCOL*, *9*(10). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3246>
- Hägg, S., & Jylhävä, J. (2021). Sex differences in biological aging with a focus on human studies. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.63425>
- Haller, S., Kapuria, S., Riley, R. R., O’Leary, M. N., Schreiber, K. H., Andersen, J. K., Melov, S., Que, J., Rando, T. A., Rock, J., Kennedy, B. K., Rodgers, J. T., & Jasper, H. (2017). mTORC1 Activation during Repeated Regeneration Impairs Somatic Stem Cell Maintenance. *Cell Stem Cell*, *21*(6), 806–818.e5. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.11.008>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Haran, J. P., & McCormick, B. A. (2021). Aging, Frailty, and the Microbiome—How Dysbiosis Influences Human Aging and Disease. *Gastroenterology*, *160*(2), 507–523. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.060>
- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., & Perrimon, N. (1998). Drosophila unpaired

- encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes & Development*, 12(20), 3252–3263. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.20.3252>
- Hashimoto, T., Yamakawa, M., Kimura, S., Usuba, O., & Toyono, M. (2013). Expression of acetylated and Dimethylated Histone h3 in colorectal cancer. *Digestive Surgery*, 30(3), 249–258. <https://doi.org/10.1159/000351444>
- Haupt, Y., Bath, M. L., Harris, A. W., & Adams, J. M. (1993). bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*, 8(11), 3161–3164. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8414519/>
- He, L., Si, G., Huang, J., Samuel, A. D. T., & Perrimon, N. (2018). Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel. *Nature*, 555(7694), 103–106. <https://doi.org/10.1038/nature25744>
- Heckel, D. G. (2020). How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(2). <https://doi.org/10.1002/ARCH.21673>
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., & Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627–2630. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000>
- Herrera, S. C., & Bach, E. A. (2019). JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: From drosophila to vertebrates. *Development (Cambridge)*, 146(2). <https://doi.org/10.1242/DEV.167643/20523>
- Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2009). NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 6). Cold Spring Harb Perspect Biol. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000232>
- Hochmuth, C. E., Biteau, B., Bohmann, D., & Jasper, H. (2011). Redox regulation by keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in drosophila. *Cell Stem Cell*, 8(2), 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.006>
- Hosseini, S. A., Horton, S., Saldivar, J. C., Miuma, S., Stampfer, M. R., Heerema, N. A., & Huebner, K. (2013). Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and *FHIT/FRA3B* loss-induced global genome instability. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52(11), 1017–1029. <https://doi.org/10.1002/gcc.22097>
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D., & Garrett, W. S. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351(6279), 1329–1333. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF1648/SUPPL_FILE/AAF1648-HOWITT-SM.PDF
- Hu, D. J.-K., & Jasper, H. (2019). Control of Intestinal Cell Fate by Dynamic Mitotic Spindle Repositioning Influences Epithelial Homeostasis and Longevity. *Cell Reports*, 28(11), 2807–2823.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.014>
- Hung, R.-J., Hu, Y., Kirchner, R., Liu, Y., Xu, C., Comjean, A., Tattikota, S. G., Li, F., Song, W., Ho Sui, S., & Perrimon, N. (2020). A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(3), 1514–1523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916820117>
- Hung, T. P., Truong, L. Van, Binh, N. D., Frutos, R., Quiquampoix, H., & Staunton, S. (2016). Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation. *Pest Management Science*, 72(12), 2247–2253. <https://doi.org/10.1002/ps.4262>
- Iatsenko, I., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. (2018). Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens *Drosophila* Lifespan. *Immunity*, 49(5), 929–942.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.017>
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., & Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO Journal*, 21(12), 3009–3018. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf306>
- Ignoffo, C. M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 217(1), 141–164. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1973.tb32756.x>
- Imajo, M., Miyatake, K., Imura, A., Miyamoto, A., & Nishida, E. (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *The EMBO Journal*, 31(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.487>
- Ishibashi, F., Shimizu, H., Nakata, T., Fujii, S., Suzuki, K., Kawamoto, A., Anzai, S., Kuno, R., Nagata, S., Ito, G., Murano, T., Mizutani, T., Oshima, S., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Watanabe, M., & Okamoto, R. (2018). Contribution of ATOH1 + Cells to the Homeostasis, Repair, and Tumorigenesis of the Colonic Epithelium. *Stem Cell Reports*, 10(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2017.11.006>
- Ismail, H., Andrin, C., McDonald, D., & Hendzel, M. J. (2010). BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *Journal of Cell Biology*, 191(1), 45–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003034>
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., ... Kyrpides, N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423(6935), 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature01582>
- Jacobs, J. L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A., & Van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature*, 397(6715), 164–168. <https://doi.org/10.1038/16476>
- Jadhav, U., Manieri, E., Nalapareddy, K., Madha, S., Chakrabarti, S., Wucherpfennig, K., Barefoot, M., & Shivdasani, R. A. (2020). Replicational Dilution of H3K27me3 in Mammalian Cells and the Role of Poised Promoters. *Molecular Cell*, 78(1), 141–151.e5. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.01.017/ATTACHMENT/94545057-45C9-47B6-97B8-074FB120634A/MMC2.XLSX>
- Jadhav, U., Saxena, M., O'Neill, N. K., Saadatpour, A., Yuan, G.-C., Herbert, Z., Murata, K., & Shivdasani, R. A. (2017). Dynamic reorganization of chromatin accessibility signatures during dedifferentiation of secretory precursors into *Lgr5*⁺ intestinal stem cells. *Cell Stem Cell*, 21(1), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.05.001>

- Jalali, E., Maghsoudi, S., & Noroozian, E. (2020). Ultraviolet protection of *Bacillus thuringiensis* through microencapsulation with Pickering emulsion method. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-77721-8>
- Jasper, H. (2020). Intestinal Stem Cell Aging: Origins and Interventions. *Annual Review of Physiology*, *82*(1), 203–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034359>
- Jensen, G. B., Larsen, P., Jacobsen, B. L., Madsen, B., Smidt, L., & Andrup, L. (2002). *Bacillus thuringiensis* in Fecal Samples from Greenhouse Workers after Exposure to *B. thuringiensis*-Based Pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 4900. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4900-4905.2002>
- Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M.-J., Blumhagen, R. Z., & Edgar, B. A. (2011). EGFR/Ras/MAPK Signaling Mediates Adult Midgut Epithelial Homeostasis and Regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*, *8*(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.026>
- Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G., & Edgar, B. A. (2009). Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell*, *137*(7), 1343–1355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.014>
- Jiang, Q., Li, F., Cheng, Z., Kong, Y., & Chen, C. (2020). The role of E3 ubiquitin ligase HECTD3 in cancer and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *77*(8), 1483–1495. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03339-3>
- Jneid, R., Loudhaief, R., Zucchini-Pascal, N., Nawrot-Esposito, M.-P., Fichant, A., Rousset, R., Bonis, M., Osman, D., & Gallet, A. (2022). *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins divert progenitor cells toward enteroendocrine fate by decreasing cell adhesion with intestinal stem cells. *BioRxiv*, 2022.04.13.488147. <https://doi.org/10.1101/2022.04.13.488147>
- Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., & Ehling-Schulz, M. (2018a). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01915>
- Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., & Ehling-Schulz, M. (2018b). Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01915>
- Joly, A., & Rousset, R. (2020). Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176362>
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *17*(2), 111–130. <https://doi.org/10.1038/S41575-019-0230-Y>
- Jurat-Fuentes, J. L., & Crickmore, N. (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. *Journal of Invertebrate Pathology*, *142*, 5–10. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2016.07.018>
- Kaelin, P., Morel, P., & Gadani, F. (1994). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(1), 19–25.

<https://doi.org/10.1128/AEM.60.1.19-25.1994>

- Kalderon, D. (2022). Investigating Adult Stem Cells Through Lineage analyses. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(1), 2–22. <https://doi.org/10.1007/S12015-021-10282-Z>
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. In *Nature Immunology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 685–690). Nat Immunol. <https://doi.org/10.1038/ni.2608>
- Kamada, N., & Núñez, G. (2014). Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*, 146(6), 1477–1488. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.01.060>
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 321–335). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., & Miura, M. (2002). Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for eiger signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28372–28375. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200324200>
- Kang, H., McElroy, K. A., Jung, Y. L., Alekseyenko, A. A., Zee, B. M., Park, P. J., & Kuroda, M. I. (2015). Sex comb on midleg (Scm) is a functional link between PcG-repressive complexes in Drosophila. *Genes & Development*, 29(11), 1136–1150. <https://doi.org/10.1101/GAD.260562.115>
- Kapitanović, S., Čačev, T., Lončar, B., Ivković, T. C., Križanac, Š., & Pavelić, K. (2014). Reduced FHIT expression is associated with tumor progression in sporadic colon adenocarcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.12.005>
- Karczmariski, J., Rubel, T., Paziewska, A., Mikula, M., Bujko, M., Kober, P., Dadlez, M., & Ostrowski, J. (2014). Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clinical Proteomics*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-24>
- Karpowicz, P., Perez, J., & Perrimon, N. (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 137(24), 4135–4145. <https://doi.org/10.1242/dev.060483>
- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory bowel disease. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 28, pp. 573–621). Annu Rev Immunol. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kassis, J. A., & Brown, J. L. (2013). Polycomb Group Response Elements in Drosophila and Vertebrates. In *Advances in Genetics* (Vol. 81, pp. 83–118). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00003-8>
- Kassis, J. A., Kennison, J. A., & Tamkun, J. W. (2017). Polycomb and trithorax group genes in drosophila. *Genetics*, 206(4), 1699–1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>
- Keller, C. I., & Akhtar, A. (2015). The MSL complex: juggling RNA-protein interactions for dosage compensation and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development*, 31, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2015.03.007>
- Kelley, R. L., & Kuroda, M. I. (2000). Noncoding RNA Genes in Dosage Compensation and Imprinting. *Cell*, 103(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00099-4)

- Kennison, J. A., & Tamkun, J. W. (1988). Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(21), 8136–8140. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.8136>
- Kennison, James A. (1995). The polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: Trans-regulators of homeotic gene function. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 29, pp. 289–303). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001445>
- Kerppola, T. K. (2009). Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends in Cell Biology*, *19*(12), 692–704. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2009.10.001>
- Ketel, C. S., Andersen, E. F., Vargas, M. L., Suh, J., Strome, S., & Simon, J. A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(16), 6857–6868. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.6857-6868.2005>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D. R., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., Van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(28), 11667–11672. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0904715106>
- Kim, C. A., Gingery, M., Pilpa, R. M., & Bowie, J. U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nature Structural Biology*, *9*(6), 453–457. <https://doi.org/10.1038/NSB802>
- Kim, D., Zeng, M. Y., & Núñez, G. (2017). The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(5), e339. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.24>
- Kirkwood, T. B. L., & Kowald, A. (2012). The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive: Modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *BioEssays*, *34*(8), 692–700. <https://doi.org/10.1002/bies.201200014>
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., & Müller, J. (2006). A polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes and Development*, *20*(9), 1110–1122. <https://doi.org/10.1101/gad.377406>
- Koch, U., Lehal, R., & Radtke, F. (2013). Stem cells living with a Notch. In *Development (Cambridge)* (Vol. 140, Issue 4, pp. 689–704). Oxford University Press for The Company of Biologists Limited. <https://doi.org/10.1242/dev.080614>
- Kondo, T., Isono, K., Kondo, K., Endo, T. A., Itohara, S., Vidal, M., & Koseki, H. (2014). Polycomb potentiates meis2 activation in midbrain by mediating interaction of the promoter with a tissue-specific enhancer. *Developmental Cell*, *28*(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2013.11.021>
- Konecka, E., Baranek, J., Bielińska, I., Tadeja, A., & Kaznowski, A. (2014). Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. *Science of the Total Environment*, *472*, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.077>
- Kong, R., Zhang, E. B., Yin, D. D., You, L. H., Xu, T. P., Chen, W. M., Xia, R., Wan, L., Sun, M., Wang, Z. X., De, W., & Zhang, Z. hong. (2015). Long noncoding RNA PVT1 indicates a poor

prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation through epigenetically regulating p15 and p16. *Molecular Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0355-8>

- Koppens, M. A. J., Bounova, G., Gargiulo, G., Tanger, E., Janssen, H., Cornelissen-Steijger, P., Blom, M., Song, J. Y., Wessels, L. F. A., & van Lohuizen, M. (2016). Deletion of Polycomb Repressive Complex 2 From Mouse Intestine Causes Loss of Stem Cells. *Gastroenterology*, 151(4), 684–697.e12. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.06.020/ATTACHMENT/88A0CFDA-BCB7-4C6A-A6C9-C97742688252/MMC3.XLSX>
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Kling Bäckhed, H., Gonzalez, A., Werner, J. J., Angenent, L. T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S., & Ley, R. E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>
- Kramer, J. M., Turnbull, P. C. B., Munshi, G., & Gilbert, R. J. (1982). *Identification and characterization of Bacillus cereus and other Bacillus species associated with foods and food poisoning*. Technical Series - Society for Applied Bacteriology. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302578012>
- Krndija, D., El Marjou, F., Guirao, B., Richon, S., Leroy, O., Bellaiche, Y., Hannezo, E., & Matic Vignjevic, D. (2019). Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6454), 705–710. <https://doi.org/10.1126/science.aau3429>
- Ku, M., Koche, R. P., Rheinbay, E., Mendenhall, E. M., Endoh, M., Mikkelsen, T. S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A. S., Adli, M., Kasif, S., Ptaszek, L. M., Cowan, C. A., Lander, E. S., Koseki, H., & Bernstein, B. E. (2008). Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000242. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000242>
- Kuadkitkan, A., Smith, D. R., & Berry, C. (2012). Investigation of the Cry4B-prohibitin interaction in *Aedes aegypti* cells. *Current Microbiology*, 65(4), 446–454. <https://doi.org/10.1007/S00284-012-0178-4>
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 15966–15971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105994108>
- La Marca, J. E., & Richardson, H. E. (2020). Two-Faced: Roles of JNK Signalling During Tumourigenesis in the *Drosophila* Model. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00042>
- Lagarou, A., Mohd-Sarip, A., Moshkin, Y. M., Chalkley, G. E., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. A., & Verrijzer, C. P. (2008). dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes & Development*, 22(20), 2799–2810. <https://doi.org/10.1101/gad.484208>
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianesi, M., Márquez, V. E., & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205–212. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.10.022>

- Lakatos, P. L., & Lakatos, L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 25, pp. 3937–3947). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3937>
- Lakhotia, S. C. (2021). Dosage compensation in *Drosophila* in the 1960s: a personal historical perspective. *Journal of Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01322>
- Landman, C., & Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. In *Revue de Medecine Interne* (Vol. 37, Issue 6, pp. 418–423). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.12.012>
- Le Borgne, R., Bardin, A., & Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. In *Development* (Vol. 132, Issue 8, pp. 1751–1762). Development. <https://doi.org/10.1242/dev.01789>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 160–168). Curr Opin Biotechnol. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lecona, E., Rojas, L. A., Bonasio, R., Johnston, A., Fernández-Capetillo, O., & Reinberg, D. (2013). Polycomb protein SCML2 regulates the cell cycle by binding and modulating CDK/CYCLIN/p21 complexes. *PLoS Biology*, *11*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001737>
- Lee, J. H., Lee, K. A., & Lee, W. J. (2020). *Drosophila* as a model system for deciphering the ‘host physiology–nutrition–microbiome’ axis. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 41, pp. 112–119). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.005>
- Lee, J. Y., & Kong, G. (2015). MEL-18, a tumor suppressor for aggressive breast cancer. *Oncotarget*, *6*(18), 15710–15711. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4565>
- Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *drosophila*. *Cell*, *153*(4), 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., & Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature*, *438*(7065), 234–237. <https://doi.org/10.1038/nature04120>
- Lee, T., & Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, *22*(3), 451–461. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80701-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80701-1)
- Lee, W.-C., Beebe, K., Sudmeier, L., & Micchelli, C. A. (2009). Adenomatous polyposis coli regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation. *Development*, *136*(13), 2255–2264. <https://doi.org/10.1242/dev.035196>
- Leitão-Gonçalves, R., Carvalho-Santos, Z., Francisco, A. P., Fioreze, G. T., Anjos, M., Baltazar, C., Elias, A. P., Itskov, P. M., Piper, M. D. W., & Ribeiro, C. (2017). Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biology*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000862>
- Lemaitre, B. (1999). *Drosophila*: A model for the understanding of innate immunity. *Medecine/Sciences*, *15*(1), 15–22. <https://doi.org/10.4267/10608/1191>

- Lennicke, C., & Cochemé, H. M. (2020). Redox signalling and ageing: Insights from *Drosophila*. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 48, Issue 2, pp. 367–377). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20190052>
- Lennicke, C., & Cochemé, H. M. (2021). Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. In *Molecular Cell* (Vol. 81, Issue 18, pp. 3691–3707). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>
- Lesperance, D. N., & Broderick, N. A. (2020). Microbiomes as modulators of *Drosophila melanogaster* homeostasis and disease. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 39, pp. 84–90). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.003>
- Lessard, J., & Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, *423*(6937), 255–260. <https://doi.org/10.1038/NATURE01572>
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M., & Marino, S. (2004). Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*, *428*(6980), 337–341. <https://doi.org/10.1038/nature02385>
- Léveillé, N., & Vermeulen, L. (2016). Polycomb complex PRC1 as gatekeeper of intestinal stem cell identity. *Stem Cell Investigation*, *3*(JUN). <https://doi.org/10.21037/SCI.2016.06.03>
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. In *Nature* (Vol. 276, Issue 5688, pp. 565–570). Nature. <https://doi.org/10.1038/276565a0>
- Lewis, P. H. (1947). *Lewis, P.H. New mutant report 1947, D. I. S. 21: 69.* <http://flybase.org/reports/FBBrf0063645.html>
- Lhocine, N., Ribeiro, P. S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaitre, B., Gstaiger, M., Meier, P., & Leulier, F. (2008). PIMS Modulates Immune Tolerance by Negatively Regulating *Drosophila* Innate Immune Signaling. *Cell Host and Microbe*, *4*(2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.004>
- Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B. E., & Reinberg, D. (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development*, *24*(4), 368–380. <https://doi.org/10.1101/GAD.1886410>
- Li, H., & Jasper, H. (2016a). Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(5), 487–499. <https://doi.org/10.1242/dmm.024232>
- Li, H., & Jasper, H. (2016b). Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(5), 487–499. <https://doi.org/10.1242/dmm.024232>
- Li, H., Qi, Y., & Jasper, H. (2016). Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. *Cell Host & Microbe*, *19*(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.008>
- Li, X., Han, Y., & Xi, R. (2010). Polycomb group genes Psc and Su(z)2 restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes & Development*, *24*(9), 933–946. <https://doi.org/10.1101/gad.1901510>
- Li, Xinghua, Han, Y., & Xi, R. (2010). Polycomb group genes Psc and Su(z)2 restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes & Development*, *24*(9), 933–946. <https://doi.org/10.1101/gad.1901510>

- Li, Y., De Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, M. M., Smits, R., Xia, B., Kuipers, E. J., & Van Janneke Der Woude, C. (2010). Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*, *59*(2), 227–235. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.184176>
- Li, Y., Deuring, J., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., & van der Woude, C. J. (2012). IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis*, *33*(10), 1889–1896. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs214>
- Li, Zhongwei, Wang, D., Lu, J., Huang, B., Wang, Y., Dong, M., Fan, D., Li, H., Gao, Y., Hou, P., Li, M., Liu, H., Pan, Z. Q., Zheng, J., & Bai, J. (2020). Methylation of EZH2 by PRMT1 regulates its stability and promotes breast cancer metastasis. *Cell Death and Differentiation*, *27*(12), 3226–3242. <https://doi.org/10.1038/S41418-020-00615-9>
- Li, Zhouhua, Zhang, Y., Han, L., Shi, L., & Lin, X. (2013). Article Trachea-Derived Dpp Controls Adult Midgut Homeostasis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *24*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.010>
- Lin, G., Xu, N., & Xi, R. (2010). Paracrine Unpaired Signaling through the JAK/STAT Pathway Controls Self-renewal and Lineage Differentiation of *Drosophila* Intestinal Stem Cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, *2*(1), 37–49. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp028>
- Liu, L., & Rando, T. A. (2011). Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *The Journal of Cell Biology*, *193*(2), 257–266. <https://doi.org/10.1083/JCB.201010131>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 2, p. 17023). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Xi, Hodgson, J. J., & Buchon, N. (2017). *Drosophila* as a model for homeostatic, antibacterial, and antiviral mechanisms in the gut A conserved midgut structure from fly to human. 10–17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006277>
- Liu, Xicheng, Wei, W., Li, X., Shen, P., Ju, D., Wang, Z., Zhang, R., Yang, F., Chen, C., Cao, K., Zhu, G., Chen, H., Chen, L., Sui, J., Zhang, E., Wu, K., Wang, F., Zhao, L., & Xi, R. (2017). BMI1 and MEL18 Promote Colitis-Associated Cancer in Mice via REG3B and STAT3. *Gastroenterology*, *153*(6), 1607–1620. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.044>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/SREP14082>
- Lo, S. M., Ahuja, N. K., & Francis, N. J. (2009). Polycomb group protein Suppressor 2 of zeste is a functional homolog of Posterior Sex Combs. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(2), 515–525. <https://doi.org/10.1128/MCB.01044-08>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- Loubiere, V., Papadopoulos, G. L., Szabo, Q., Martinez, A. M., & Cavalli, G. (2020). Widespread activation of developmental gene expression characterized by PRC1-dependent chromatin looping. *Science Advances*, *6*(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4001>

- Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguettat, O., Nawrot-Esposito, M.-P., Pauron, D., Amichot, M., & Gallet, A. (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development (Cambridge, England)*, *144*(5), 808–819. <https://doi.org/10.1242/dev.142539>
- Lu, M. S., & Johnston, C. A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development (Cambridge, England)*, *140*(9), 1843–1856. <https://doi.org/10.1242/dev.087627>
- Lucchetta, E. M., & Ohlstein, B. (2012). The *Drosophila* midgut: a model for stem cell driven tissue regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *1*(5), 781–788. <https://doi.org/10.1002/WDEV.51>
- Lucchetta, E. M., & Ohlstein, B. (2017). Amitosis of Polyploid Cells Regenerates Functional Stem Cells in the *Drosophila* Intestine. *Cell Stem Cell*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.012>
- Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, *190*(4773), 372–373. <https://doi.org/10.1038/190372A0>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.06.016>
- Maezawa, S., Hasegawa, K., Yukawa, M., Sakashita, A., Alavattam, K. G., Andreassen, P. R., Vidal, M., Koseki, H., Barski, A., & Namekawa, S. H. (2017). Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis. *Genes & Development*, *31*(16), 1693–1703. <https://doi.org/10.1101/GAD.302000.117>
- Mager, J., Montgomery, N. D., De Villena, F. P. M., & Magnuson, T. (2003). Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nature Genetics*, *33*(4), 502–507. <https://doi.org/10.1038/NG1125>
- Mah, A. T., Yan, K. S., & Kuo, C. J. (2016). Wnt pathway regulation of intestinal stem cells. *The Journal of Physiology*, *594*(17), 4837–4847. <https://doi.org/10.1113/JP271754>
- Malki, A., Elruz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010130>
- Marchese, F. P., & Huarte, M. (2014). Long non-coding RNAs and chromatin modifiers: their place in the epigenetic code. *Epigenetics*, *9*(1), 21–26. <https://doi.org/10.4161/EPI.27472>
- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Marelja, Z., Leimkühler, S., & Missirlis, F. (2018). Iron sulfur and molybdenum cofactor enzymes regulate the *Drosophila* life cycle by controlling cell metabolism. *Frontiers in Physiology*, *9*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00050>
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury, W. J., Voigt, P., Martin, S. R., Taylor, W. R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D., & Gamblin, S. J. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*, *461*(7265), 762–767. <https://doi.org/10.1038/NATURE08398>
- Marianes, A., & Spradling, A. C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the

- Drosophila midgut*. *ELife*, 2(2). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.00886>
- Marshman, E., Booth, C., & Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(1), 91–98. <https://doi.org/10.1002/BIES.10028>
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437–2442. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Martínez-Romero, C., Rومان, I., Skoudy, A., Guerra, C., Molero, X., González, A., Iglesias, M., Lobato, T., Bosch, A., Barbacid, M., Real, F. X., & Hernández-Muñoz, I. (2009). The epigenetic regulators *Bmi1* and *Ring1B* are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of Pathology*, 219(2), 205–213. <https://doi.org/10.1002/PATH.2585>
- Martinez, A.-M., & Cavalli, G. (2006). The role of Polycomb Group Proteins in Cell Cycle Regulation During Development. *Cell Cycle*, 5(11), 1189–1197. <https://doi.org/10.4161/cc.5.11.2781>
- Martinez, A.-M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C., & Cavalli, G. (2009). *Polyhomeotic* has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. <https://doi.org/10.1038/ng.414>
- McClintock, J. T., Schaffer, C. R., & Sjoblad, R. D. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. In *Pesticide Science* (Vol. 45, Issue 2, pp. 95–105). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.2780450202>
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J. L., & Naseby, D. C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7451. <https://doi.org/10.1128/AEM.01284-08>
- ME, V.-L., SW, B., & M, van L. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, 118(4), 70–71. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.08.005>
- Micchelli, C. A., & Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, 439(7075), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
- Miguel-Aliaga, I., Jasper, H., & Lemaitre, B. (2018). *Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of Drosophila melanogaster*. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300224>
- Mochizuki-Kashio, M., Aoyama, K., Sashida, G., Oshima, M., Tomioka, T., Muto, T., Wang, C., & Iwama, A. (2015). *Ezh2* loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an *Ezh1*-dependent manner. *Blood*, 126(10), 1172–1183. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-03-634428>
- Mohd-Sarip, A., Lagarou, A., Doyen, C. M., Van Der Knaap, J. A., Aslan, Ü., Bezstarosti, K., Yassin, Y., Brock, H. W., Demmers, J. A. A., & Verrijzer, C. P. (2012). Transcription-independent function of Polycomb group protein *PSC* in cell cycle control. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6082), 744–747. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1215927>
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G. E., & Verrijzer, C. P. (2002). Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Molecular and Cellular Biology*, 22(21), 7473–7483. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7473-7483.2002>

- Molofsky, A. V., He, S., Bydon, M., Morrison, S. J., & Pardal, R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19 Arf senescence pathways. *Genes and Development*, *19*(12), 1432–1437. <https://doi.org/10.1101/gad.1299505>
- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E. G., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., Fogli, L. K., Algra, S., & Breault, D. T. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 179–184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013004108>
- Moreno, E., Yan, M., & Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Current Biology*, *12*(14), 1263–1268. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00954-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00954-5)
- Morey, L., & Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 6, pp. 323–332). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.02.009>
- Morillo Prado, J. R., Chen, X., & Fuller, M. T. (2012a). Polycomb Group Genes Psc and Su(z)2 Maintain Somatic Stem Cell Identity and Activity in *Drosophila*. *PLoS ONE*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052892>
- Morillo Prado, J. R., Chen, X., & Fuller, M. T. (2012b). Polycomb Group Genes Psc and Su(z)2 Maintain Somatic Stem Cell Identity and Activity in *Drosophila*. *PLoS ONE*, *7*(12), e52892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052892>
- Morris, O., Liu, X., Domingues, C., Runchel, C., Chai, A., Basith, S., Tenev, T., Chen, H., Choi, S., Pennetta, G., Buchon, N., & Meier, P. (2016). Signal Integration by the IκB Protein Pickle Shapes *Drosophila* Innate Host Defense. *Cell Host and Microbe*, *20*(3), 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.003>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, *441*(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Müller, H. A. J. (2018). More diversity in epithelial cell polarity: A fruit flies' gut feeling. In *PLoS Biology* (Vol. 16, Issue 12). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000082>
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E., & Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell*, *111*(2), 197–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00976-5)
- Müller, J., & Kassis, J. A. (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, *16*(5), 476–484. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2006.08.005>
- Muyle, A., Bachtrog, D., Marais, G. A. B., & Turner, J. M. A. (2021). Epigenetics drive the evolution of sex chromosomes in animals and plants. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 376, Issue 1826). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0124>
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A.,

- Mobarry, C. M., Reinert, K. H. J., Remington, K. A., Anson, E. L., Bolanos, R. A., Chou, H. H., Jordan, C. M., Halpern, A. L., Lonardi, S., Beasley, E. M., Brandon, R. C., Chen, L., ... Venter, J. C. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461, pp. 2196–2204). Science. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2196>
- Nakanishi, R., Shimizu, T., Kumagai, K., Takai, A., & Marusawa, H. (2021). Genetic Pathogenesis of Inflammation-Associated Cancers in Digestive Organs. *Pathogens*, *10*(4), 453. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040453>
- Nawrot-Esposito, M.-P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J.-L., & Gallet, A. (2020). *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticides Induce Developmental Defects in Non-Target *Drosophila melanogaster* Larvae. *Insects*, *MDPI*, *2020*(10), 697. <https://doi.org/10.3390/insects11100697i>
- Nègre, N., Lavrov, S., Hennetin, J., Bellis, M., & Cavalli, G. (2006). Mapping the Distribution of Chromatin Proteins by ChIP on Chip. In *Methods in Enzymology* (Vol. 410, pp. 316–341). Methods Enzymol. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)10015-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)10015-4)
- Nekrasov, M., Wild, B., & Müller, J. (2005). Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of *Drosophila* PRC2. *EMBO Reports*, *6*(4), 348–353. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400376>
- Nikoloski, G., Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R. L. T. M., Van Der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenberghe, P., De Witte, T., Van Der Reijden, B. A., & Jansen, J. H. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, *42*(8), 665–667. <https://doi.org/10.1038/NG.620>
- O'Brien, L. E., Soliman, S. S., Li, X., & Bilder, D. (2011). Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell*, *147*(3), 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.048>
- O'Meara, M. M., & Simon, J. A. (2012). Inner workings and regulatory inputs that control Polycomb repressive complex 2. *Chromosoma*, *121*(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S00412-012-0361-1>
- Oguro, H., Yuan, J., Tanaka, S., Miyagi, S., Mochizuki-Kashio, M., Ichikawa, H., Yamazaki, S., Koseki, H., Nakauchi, H., & Iwama, A. (2012). Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(3), 445–454. <https://doi.org/10.1084/JEM.20111709>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, *439*(7075), 470–474. <https://doi.org/10.1038/nature04333>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*, *315*(5814), 988–992. <https://doi.org/10.1126/science.1136606>
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M. G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., Croce, C. M., & Huebner, K. (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, *84*(4), 587–597. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81034-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81034-X)
- Ohuchi, M., Sakamoto, Y., Tokunaga, R., Kiyozumi, Y., Nakamura, K., Izumi, D., Kosumi, K., Harada, K., Kurashige, J., Iwatsuki, M., Baba, Y., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Shono, T., Naoe, H., Sasaki, Y., & Baba, H. (2018). Increased *EZH2* expression during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Oncology Letters*, *16*(4), 5275–5281. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.9240>

- Okamoto, I., Otte, A. P., Allis, C. D., Reinberg, D., & Heard, E. (2004). Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5658), 644–649. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1092727>
- Oktaba, K., Gutiérrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. M., & Müller, J. (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *15*(6), 877–889. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.10.005>
- Okugawa, Y., Grady, W. M., & Goel, A. (2015). Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*, *149*(5), 1204–1225.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.011>
- Ørom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., Lai, F., Zytnicki, M., Notredame, C., Huang, Q., Guigo, R., & Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, *143*(1), 46–58. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.09.001>
- Owen, B. M., & Davidovich, C. (2022). DNA binding by polycomb-group proteins: searching for the link to CpG islands. *Nucleic Acids Research*, *50*(9), 4813–4839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac290>
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S., & Banerjee, U. (2008). Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nature Genetics*, *40*(3), 356–361. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.50>
- Owusu-Darko, R., Allam, M., Ismail, A., Ferreira, C. A. S., de Oliveira, S. D., & Buys, E. M. (2020). Comparative Genome Analysis of *Bacillus sporothermodurans* with Its Closest Phylogenetic Neighbor, *Bacillus oleronius*, and *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* Groups. *Microorganisms*, *8*(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081185>
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(47), 32750–32757. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.024968>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, *6*(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/TOXINS6123296>
- Pan, M. R., Peng, G., Hungs, W. C., & Lin, S. Y. (2011). Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 28599–28607. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.256297/ATTACHMENT/7A928516-7E44-4BC5-9624-FEA695948B16/MMC1.PDF>
- Panday, S., Talreja, R., & Kavdia, M. (2020). The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*, *131*. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104010>
- Panning, B. (2010). Fine-tuning silencing. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 3–4. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.12.013>

- Parreno, V., Martinez, A.-M., & Cavalli, G. (2022). Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer. *Cell Research*, 32(3), 231–253. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00606-6>
- Pasco, M. Y., Loudhaief, R., & Gallet, A. (2015). The cellular homeostasis of the gut: What the Drosophila model points out. In *Histology and Histopathology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 277–292). Histology and Histopathology. <https://doi.org/10.14670/HH-30.277>
- Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M., & Helin, K. (2007). The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3769–3779. <https://doi.org/10.1128/MCB.01432-06>
- Pasini, D., & Di Croce, L. (2016). Emerging roles for Polycomb proteins in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 36, 50–58. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2016.03.013>
- Perdigoto, C. N., Schweisguth, F., & Bardin, A. J. (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*, 138(21), 4585–4595. <https://doi.org/10.1242/dev.065292>
- Peterson, A. J., Kyba, M., Bornemann, D., Morgan, K., Brock, H. W., & Simon, J. (1997). A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 17(11), 6683–6692. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6683>
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological Reviews*, 94(4), 1287–1312. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00005.2014>
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 71(2), 255–281. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
- Piunti, A., & Shilatifard, A. (2021). The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 5, pp. 326–345). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00341-1>
- Post, Y., & Clevers, H. (2019). Defining Adult Stem Cell Function at Its Simplest: The Ability to Replace Lost Cells through Mitosis. *Cell Stem Cell*, 25(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2019.07.002>
- Potten, C. S., Kovacs, L., & Hamilton, E. (1974). CONTINUOUS LABELLING STUDIES ON MOUSE SKIN AND INTESTINE. *Cell Proliferation*, 7(3), 271–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1974.tb00907.x>
- Potten, C. S., Owen, G., & Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *Journal of Cell Science*, 115(11), 2381–2388.
- Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., Higginbotham, J. N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S. E., Guo, Y., Shyr, Y., Aronow, B. J., Haigis, K. M., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2012). The pan-ErbB negative regulator lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, 149(1), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.042>
- Qi, H., Yang, H., Xu, G., Ren, J., Hua, W., Shi, Y., Torsvik, M., Florholmen, J., & Cui, G. (2015). Therapeutic efficacy of IL-17A antibody injection in preventing the development of colitis

- associated carcinogenesis in mice. *Immunobiology*, 220(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.002>
- Qin, J., Wen, B., Liang, Y., Yu, W., & Li, H. (2020). Histone Modifications and their Role in Colorectal Cancer (Review). In *Pathology and Oncology Research* (Vol. 26, Issue 4, pp. 2023–2033). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00663-8>
- Rao, C. V., & Yamada, H. Y. (2013). Genomic instability and colon carcinogenesis: From the perspective of genes. In *Frontiers in Oncology: Vol. 3 MAY* (p. 130). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00130>
- Rathinam, V. A. K., & Chan, F. K. M. (2018). Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 24, Issue 3, pp. 304–318). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.01.004>
- Raymond, B., & Federici, B. A. (2017a). In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 84. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix084>
- Raymond, B., & Federici, B. A. (2017b). In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(7). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX084>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–194. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2010.02.006>
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/35020506>
- Reese, M. G., Hartzell, G., Harris, N. L., Ohler, U., Abril, J. F., & Lewis, S. E. (2000). Genome annotation assessment in *Drosophila melanogaster*. In *Genome Research* (Vol. 10, Issue 4, pp. 483–501). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.483>
- Regan, J. C., Khericha, M., Dobson, A. J., Bolukbasi, E., Rattanavirotkul, N., & Partridge, L. (2016). Sex difference in pathology of the ageing gut mediates the greater response of female lifespan to dietary restriction. *eLife*, 5(FEBRUARY2016), 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.10956>
- Reinig, J., Ruge, F., Howard, M., & Ringrose, L. (2020). A theoretical model of Polycomb/Trithorax action unites stable epigenetic memory and dynamic regulation. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18507-4>
- Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.-Y., Ip, Y. T., & Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21064–21069. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012759107>
- Rera, M., Clark, R. I., & Walker, D. W. (2012). Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 21528–21533. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215849110/->

- Resnik-Docampo, M., Koehler, C. L., Clark, R. I., Schinaman, J. M., Sauer, V., Wong, D. M., Lewis, S., D'Alterio, C., Walker, D. W., & Jones, D. L. (2017). Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behaviour to maintain homeostasis. *Nature Cell Biology*, *19*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1038/ncb3454>
- Rhodes, J. D. P., Feldmann, A., Hernández-Rodríguez, B., Díaz, N., Brown, J. M., Fursova, N. A., Blackledge, N. P., Prathapan, P., Dobrinic, P., Huseyin, M. K., Szczurek, A., Kruse, K., Nasmyth, K. A., Buckle, V. J., Vaquerizas, J. M., & Klose, R. J. (2020). Cohesin Disrupts Polycomb-Dependent Chromosome Interactions in Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, *30*(3), 820-835.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.12.057>
- Ringrose, L., & Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development (Cambridge, England)*, *134*(2), 223–232. <https://doi.org/10.1242/DEV.02723>
- Rinke, J., Chase, A., Cross, N. C. P., Hochhaus, A., & Ernst, T. (2020). EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS9071639>
- Robinson, A. K., Leal, B. Z., Chadwell, L. V., Wang, R., Ilangovan, U., Kaur, Y., Junco, S. E., Schirf, V., Osmulski, P. A., Gaczynska, M., Hinck, A. P., Demeler, B., McEwen, D. G., & Kim, C. A. (2012). The growth-suppressive function of the polycomb group protein polyhomeotic is mediated by polymerization of its sterile alpha motif (SAM) domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(12), 8702–8713. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.336115>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, *26*(0). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S. R., Jensen, G. B., & Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters*, *250*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.06.054>
- Roumengous, S., Rousset, R., & Noselli, S. (2017). Polycomb and Hox Genes Control JNK-Induced Remodeling of the Segment Boundary during *Drosophila* Morphogenesis. *Cell Reports*, *19*(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.033>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(5), 313–323. <https://doi.org/10.1038/NRI2515>
- Ryu, J. H., Ha, E. M., Oh, C. T., Seol, J. H., Brey, P. T., Jin, I., Lee, D. G., Kim, J., Lee, D., & Lee, W. J. (2006). An essential complementary role of NF- κ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO Journal*, *25*(15), 3693–3701. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601233>
- Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, H. Y., Jin, Y. B., Nam, Y. Do, Bae, J. W., Dong, G. L., Seung, C. S., Ha, E. M., & Lee, W. J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, *319*(5864), 777–782. <https://doi.org/10.1126/science.1149357>
- Saladi, S., Cheedipudi, S. M., Scott, R. P., Kango-Singh, M., Snigdha, K., Gangwani, K. S., Lalalikar,

- G. V., & Singh, A. (2019). *Hippo Signaling in Cancer: Lessons From Drosophila Models*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00085>
- Salazar, A. M., Resnik-Docampo, M., Ulgherait, M., Clark, R. I., Shirasu-Hiza, M., Jones, D. L., & Walker, D. W. (2018). Intestinal Snakeskin Limits Microbial Dysbiosis during Aging and Promotes Longevity. *ISCIENCE*, *9*, 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.022>
- Sallé, J., Gervais, L., Boumard, B., Stefanutti, M., Siudeja, K., & Bardin, A. J. (2017). Intrinsic regulation of enteroendocrine fate by Numb. *The EMBO Journal*, *36*(13), 1928–1945. <https://doi.org/10.15252/embj.201695622>
- Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Bevins, C. L., Williams, C. B., & Bos, N. A. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature Immunology*, *11*(1), 76–83. <https://doi.org/10.1038/ni.1825>
- Sanchez, A., De Vivo, A., Uprety, N., Kim, J., Stevens, S. M., & Kee, Y. (2016). BMI1-UBR5 axis regulates transcriptional repression at damaged chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(40), 11243–11248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610735113>
- Sanchis, V. (2011). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* *2010 31:1*, *31*(1), 217–231. <https://doi.org/10.1051/AGRO/2010027>
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, *40*(7), 915–920. <https://doi.org/10.1038/ng.165>
- Sanli, I., Lalevée, S., Cammisa, M., Perrin, A., Rage, F., Llères, D., Riccio, A., Bertrand, E., & Feil, R. (2018). Meg3 Non-coding RNA Expression Controls Imprinting by Preventing Transcriptional Upregulation in cis. *Cell Reports*, *23*(2), 337–348. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.03.044>
- Sarma, K., Margueron, R., Ivanov, A., Pirrotta, V., & Reinberg, D. (2008). Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(8), 2718–2731. <https://doi.org/10.1128/MCB.02017-07>
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- Savla, U., Benes, J., Zhang, J., & Jones, R. S. (2008). Recruitment of Drosophila Polycomb-group proteins by Polycomblike, a component of a novel protein complex in larvae. *Development (Cambridge, England)*, *135*(5), 813–817. <https://doi.org/10.1242/DEV.016006>
- Schertzer, M. D., Bracerros, K. C. A., Starmer, J., Cherney, R. E., Lee, D. M., Salazar, G., Justice, M., Bischoff, S. R., Cowley, D. O., Ariel, P., Zylka, M. J., Downen, J. M., Magnuson, T., & Calabrese, J. M. (2019). lncRNA-Induced Spread of Polycomb Controlled by Genome Architecture, RNA Abundance, and CpG Island DNA. *Molecular Cell*, *75*(3), 523–537.e10. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.05.028>
- Scheuermann, J. C., De Ayala Alonso, A. G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R. K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T. W., & Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*, *465*(7295), 243–247.

<https://doi.org/10.1038/NATURE08966>

- Scheuermann, J. C., Gutiérrez, L., & Müller, J. (2012). Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression: the missing pieces of the puzzle. *Fly*, 6(3), 162–168. <https://doi.org/10.4161/FLY.20986>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. Van, Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Schroeder, M. C., & Halder, G. (2012). Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), 803–811. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2012.06.001>
- Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L., & Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171(1), 34–57. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.002>
- Schuettengruber, B., & Cavalli, G. (2010). The DUBle life of polycomb complexes. *Developmental Cell*, 18(6), 878–880. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.06.001>
- Schwabe, R. F., & Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 13, Issue 11, pp. 800–812). Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc3610>
- Schwartz, Y. B., & Cavalli, G. (2017). Three-Dimensional Genome Organization and Function in Drosophila. *Genetics*, 205(1), 5–24. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.185132>
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X. Y., Bourgon, R., Biggin, M., & Pirrotta, V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nature Genetics*, 38(6), 700–705. <https://doi.org/10.1038/ng1817>
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Stenberg, P., Ohno, K., Bourgon, R., & Pirrotta, V. (2010). Alternative epigenetic chromatin states of polycomb target genes. *PLoS Genetics*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000805>
- Schwartz, Y. B., & Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 266–273). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.002>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.01.013>
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W., & Kingston, R. E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*, 98(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80604-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80604-2)
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 20051–20056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009906107>
- Shaw, R. L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B. A., & Tapon, N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during Drosophila adult midgut regeneration.

Development, 137(24), 4147–4158. <https://doi.org/10.1242/dev.052506>

- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 10771–10778. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.23.10771>
- Shin, S. C., Kim, S. H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K. A., Yoon, J. H., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2011). Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056), 670–674. <https://doi.org/10.1126/science.1212782>
- Siegel, J. P. (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(1), 13–21. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.5000>
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2013). Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Molecular Cell*, 49(5), 808–824. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.02.013>
- Simons, B. D., & Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*, 145(6), 851–862. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.05.033>
- Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Lipshitz, H. D., & Cordes, S. P. (2009). A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell*, 138(5), 885–897. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.08.020>
- Siudeja, K., Nassari, S., Gervais, L., Skorski, P., Lameiras, S., Stolfa, D., Zande, M., Bernard, V., Frio, T. R., & Bardin, A. J. (2015). Frequent Somatic Mutation in Adult Intestinal Stem Cells Drives Neoplasia and Genetic Mosaicism during Aging. *Cell Stem Cell*, 17(6), 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.016>
- Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. In *Cell* (Vol. 179, Issue 5, pp. 1033–1055). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Slifer, E. H. (1942). A mutant stock of *Drosophila* with extra sex-combs. *Journal of Experimental Zoology*, 90(1), 31–40. <https://doi.org/10.1002/jez.1400900103>
- Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/S00018-008-8330-9>
- Sobhani, I. (2004). Helicobacter pylori et cancer gastrique. In *Medecine/Sciences* (Vol. 20, Issue 4, pp. 431–436). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004204431>
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., Gérard, C., van Nhieu, J. T., & Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016393>
- Son, J., Shen, S. S., Margueron, R., & Reinberg, D. (2013). Nucleosome-binding activities within JARID2 and EZH1 regulate the function of PRC2 on chromatin. *Genes & Development*, 27(24), 2663–2677. <https://doi.org/10.1101/GAD.225888.113>
- Sparmann, A., & Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 6, Issue 11, pp. 846–856). <https://doi.org/10.1038/nrc1991>
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. In *Science* (Vol. 257, Issue 5074, pp. 1220–1224). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1355616>

- Stillman, B. (2018). Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression. In *Cell* (Vol. 175, Issue 1, pp. 6–9). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.032>
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., & Leulier, F. (2011). Lactobacillus plantarum promotes drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metabolism*, *14*(3), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.012>
- Strand, M., & Micchelli, C. A. (2013). Regional control of Drosophila gut stem cell proliferation: EGF establishes GSSC proliferative set point & controls emergence from quiescence. *PLoS One*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080608>
- Sun, F. L., Cuaycong, M. H., Craig, C. A., Wallrath, L. L., Locke, J., & Elgin, S. C. R. (2000). The fourth chromosome of Drosophila melanogaster: Interspersed euchromatic and heterochromatic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(10), 5340–5345. <https://doi.org/10.1073/pnas.090530797>
- Syed, T., Askari, M., Meng, Z., Li, Y., Abid, M. A., Wei, Y., Guo, S., Liang, C., & Zhang, R. (2020). Current Insights on Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) as Next Generation Pest Killers. *Toxins*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12080522>
- Tafesh-Edwards, G., & Eleftherianos, I. (2020). JNK signaling in Drosophila immunity and homeostasis. *Immunology Letters*, *226*, 7–11. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2020.06.017>
- Takahashi, T., & Shiraishi, A. (2020). Stem cell signaling pathways in the small intestine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 6, p. 2032). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21062032>
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6061), 1420–1424. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1213214>
- Tamagawa, H., Oshima, T., Shiozawa, M., Morinaga, S., Nakamura, Y., Yoshihara, M., Sakuma, Y., Kameda, Y., Akaike, M., Masuda, M., Imada, T., & Miyagi, Y. (2012). The global histone modification pattern correlates with overall survival in metachronous liver metastasis of colorectal cancer. *Oncology Reports*, *27*(3), 637–642. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1547>
- Tamburri, S., Conway, E., & Pasini, D. (2022). Polycomb-dependent histone H2A ubiquitination links developmental disorders with cancer. In *Trends in Genetics* (Vol. 38, Issue 4, pp. 333–352). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.07.011>
- Tang, X., Zhao, Y., Buchon, N., & Engström, Y. (2018). The POU/Oct Transcription Factor Nubbin Controls the Balance of Intestinal Stem Cell Maintenance and Differentiation by Isoform-Specific Regulation. *Stem Cell Reports*, *10*(5), 1565. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2018.03.014>
- Tauc, H. M., Rodriguez-Fernandez, I. A., Hackney, J. A., Pawlak, M., Oron, T. R., Korzelius, J., Moussa, H. F., Chaudhuri, S., Modrusan, Z., Edgar, B. A., & Jasper, H. (2021). Age-related changes in polycomb gene regulation disrupt lineage fidelity in intestinal stem cells. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.62250>
- Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyasu, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M., & Kanno, M. (1998). mel-18 negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to c-myc/cdc25. *Immunity*, *9*(4), 439–448. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80627-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80627-5)

- Tetteh, P. W., Basak, O., Farin, H. F., Wiebrands, K., Kretschmar, K., Begthel, H., Van Den Born, M., Korving, J., De Sauvage, F., Van Es, J. H., Van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell*, *18*(2), 203–213. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.01.001>
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. In *Nature* (Vol. 535, Issue 7610, pp. 65–74). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature18847>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal*, *474*(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tian, Ai, Benchabane, H., Wang, Z., & Ahmed, Y. (2016). Regulation of Stem Cell Proliferation and Cell Fate Specification by Wingless/Wnt Signaling Gradients Enriched at Adult Intestinal Compartment Boundaries. *PLoS Genetics*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005822>
- Tian, Aiguo, & Jiang, J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife.Elifesciences.Org Tian and Jiang. ELife*, *3*, e01857. <https://doi.org/10.7554/eLife.01857>
- Tian, Aiguo, Wang, B., & Jiang, J. (2017). Injury-stimulated and self-restrained BMP signaling dynamically regulates stem cell pool size during *Drosophila* midgut regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(13), E2699–E2708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617790114>
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*(7368), 255–259. <https://doi.org/10.1038/nature10408>
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & De Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*(7368), 255–259. <https://doi.org/10.1038/NATURE10408>
- Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R., & Moschen, A. R. (2018). The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. In *Cancer Cell* (Vol. 33, Issue 6, pp. 954–964). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravel, P., Geremia, R. A., & Gury, J. (2008). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003432>
- Tolhuis, B., Muijers, I., De Wit, E., Teunissen, H., Talhout, W., Van Steensel, B., & Van Lohuizen, M. (2006). Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, *38*(6), 694–699. <https://doi.org/10.1038/ng1792>
- Tomic, G., Morrissey, E., Kozar, S., Ben-Moshe, S., Hoyle, A., Azzarelli, R., Kemp, R., Chilamakuri, C. S. R., Itzkovitz, S., Philpott, A., & Winton, D. J. (2018). Phospho-regulation of ATOH1 Is Required for Plasticity of Secretory Progenitors and Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell*, *23*(3), 436–443.e7. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.07.002>
- Tracy Cai, X., Li, H., Safyan, A., Gawlik, J., Pyrowolakis, G., & Jasper, H. (2019). AWD regulates timed activation of BMP signaling in intestinal stem cells to maintain tissue homeostasis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10926-2>

- Trotman, J. B., Bracerros, K. C. A., Cherney, R. E., Murvin, M. M., & Calabrese, J. M. (2021). The control of polycomb repressive complexes by long noncoding RNAs. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 6). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wrna.1657>
- Tsai, S. F., Liu, B. L., Liao, J. W., Wang, J. S., Hwang, J. S., Wang, S. C., Tzeng, Y. M., & Ho, S. P. (2003). Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, *186*(3), 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00744-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00744-8)
- Uckelmann, M., & Sixma, T. K. (2017). Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair*, *56*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2017.06.011>
- Ullman, T., Odze, R., & Farraye, F. A. (2009). Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 15, Issue 4, pp. 630–638). Inflamm Bowel Dis. <https://doi.org/10.1002/ibd.20766>
- Uronis, J. M., & Jobin, C. (2009). Microbes and colorectal cancer: Is there a relationship? In *Current Oncology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 22–24). Multimed Inc. <https://doi.org/10.3747/co.v16i4.472>
- Van Cuyk, S., Deshpande, A., Hollander, A., Duval, N., Ticknor, L., Layshock, J., Gallegos-Graves, L. V., & Omberg, K. M. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in Urban Environments following Spraying. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(22), 7954–7961. <https://doi.org/10.1128/AEM.05207-11>
- Van Der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 71, pp. 241–260). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- van der Heijden, M., & Vermeulen, L. (2019). Stem cells in homeostasis and cancer of the gut. *Molecular Cancer*, *18*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0962-x>
- Van Es, J. H., Sato, T., Van De Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., Van Den Born, M., Korving, J., Martens, A. C. M., Barker, N., Van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2012). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature Cell Biology*, *14*(10), 1099–1104. <https://doi.org/10.1038/NCB2581>
- Van Kruijsbergen, I., Hontelez, S., & Veenstra, G. J. C. (2015). Recruiting polycomb to chromatin. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 67, pp. 177–187). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.006>
- Vanuytsel, T., Senger, S., Fasano, A., & Shea-Donohue, T. (2013). Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*(2), 2410–2426. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.08.006>
- Venkei, Z. G., & Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J. Cell Biol*, *217*, 3785–3795. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807037>
- Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 53, Issue 6, pp. 673–687). <https://doi.org/10.1139/W07-029>
- Von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, *529*(7585), 221–225. <https://doi.org/10.1038/NATURE16161>

- Voncken, J. W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S., & Rapp, U. R. (2005). MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5178–5187. <https://doi.org/10.1074/JBC.M407155200>
- Waldner, M. J., Foersch, S., & Neurath, M. F. (2012). Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 8, Issue 9, pp. 1248–1253). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4614>
- Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2008). Cytokines in Colitis-associated cancer: Potential drug targets? *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 7(3), 187–194. <https://doi.org/10.2174/187152808785748137>
- Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J. C., Nagy, A., & Magnuson, T. (2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nature Genetics*, 28(4), 371–375. <https://doi.org/10.1038/NG574>
- Wang, Liangjun, Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A., & Jones, R. S. (2004). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Molecular Cell*, 14(5), 637–646. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.05.009>
- Wang, Lidong, Sun, X., He, J., & Liu, Z. (2021). Functions and Molecular Mechanisms of Deltex Family Ubiquitin E3 Ligases in Development and Disease. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9, p. 2355). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.706997>
- Wang, M. C., Li, C. L., Cui, J., Jiao, M., Wu, T., Jing, L., & Nan, K. J. (2015). BMI-1, a promising therapeutic target for human cancer. *Oncology Letters*, 10(2), 583–588. <https://doi.org/10.3892/OL.2015.3361>
- Wang, S., C. Ordonez-Rubiano, S., Dhiman, A., Jiao, G., Strohmier, B. P., Krusemark, C. J., & Dykhuizen, E. C. (2021). Polycomb group proteins in cancer: multifaceted functions and strategies for modulation. *NAR Cancer*, 3(4). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAB039>
- Wang, X., Wang, C., Zhang, X., Hua, R., Gan, L., Huang, M., Zhao, L., Ni, S., & Guo, W. (2016). Bmi-1 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via modulating miRNAs. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-016-0323-9>
- Wang, Z., Tacchelly-Benites, O., Noble, G. P., Johnson, M. K., Gagné, J.-P., Poirier, G. G., & Ahmed, Y. (2019). A Context-Dependent Role for the RNF146 Ubiquitin Ligase in Wingless/Wnt Signaling in *Drosophila*. *Genetics*, 211(3), 913–923. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301393>
- Ward, D., Montes Olivas, S., Fletcher, A., Homer, M., & Marucci, L. (2020). Cross-talk between Hippo and Wnt signalling pathways in intestinal crypts: Insights from an agent-based model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 230–240. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2019.12.015>
- Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 16, pp. 2959–2977). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>
- Wilcks, A., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., & Licht, T. R. (2006a). Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(1), 70–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574->

- Wilcks, A., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., & Licht, T. R. (2006b). Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *48*(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00169.x>
- Won, H. Y., Lee, J. Y., Shin, D. H., Park, J. H., Nam, J. S., Kim, H. C., & Kong, G. (2012). Loss of Mel-18 enhances breast cancer stem cell activity and tumorigenicity through activating Notch signaling mediated by the Wnt/TCF pathway. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(12), 5002–5013. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-209247>
- Wong, C. N. A., Ng, P., & Douglas, A. E. (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1889–1900. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02511.x>
- Wong, S. J., Gearhart, M. D., Taylor, A. B., Nanyes, D. R., Ha, D. J., Robinson, A. K., Artigas, J. A., Lee, O. J., Demeler, B., Hart, P. J., Bardwell, V. J., & Kim, C. A. (2016). KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure (London, England: 1993)*, *24*(10), 1795–1801. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2016.07.011>
- Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., ... Vogelstein, B. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, *318*(5853), 1108–1113. <https://doi.org/10.1126/science.1145720>
- Xin, Q., Kong, S., Yan, J., Qiu, J., He, B., Zhou, C., Ni, Z., Bao, H., Huang, L., Lu, J., Xia, G., Liu, X., Chen, Z. J., Wang, C., & Wang, H. (2018). Polycomb subunit BMI1 determines uterine progesterone responsiveness essential for normal embryo implantation. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(1), 175. <https://doi.org/10.1172/JCI92862>
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. In *Toxins* (Vol. 6, Issue 9, pp. 2732–2770). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Xu, N., Wang, S. Q., Tan, D., Gao, Y., Lin, G., & Xi, R. (2011). EGFR, Wntless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain *Drosophila* intestinal stem cells. *Developmental Biology*, *354*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.03.018>
- Yadav, T., Quivy, J. P., & Almouzni, G. (2018). Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity. In *Science* (Vol. 361, Issue 6409, pp. 1332–1336). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aat8950>
- Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S. C., Amieva, M. R., Sangiorgi, E., Capecchi, M. R., & Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2), 466–471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118857109>
- Yan, K. S., Gevaert, O., Zheng, G. X. Y., Anchang, B., Probert, C. S., Larkin, K. A., Davies, P. S., Cheng, Z., Kaddis, J. S., Han, A., Roelf, K., Calderon, R. I., Cynn, E., Hu, X., Mandleywala, K.,

- Wilhelmy, J., Grimes, S. M., Corney, D. C., Boutet, S. C., ... Kuo, C. J. (2017). Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell*, *21*(1), 78-90.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.014>
- Yang, C. C., Graves, H. K., Moya, I. M., Tao, C., Hamaratoglu, F., Gladden, A. B., & Halder, G. (2015). Differential regulation of the Hippo pathway by adherens junctions and apical-basal cell polarity modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(6), 1785–1790. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1420850112>
- Yousefi, M., Nakauka-Ddamba, A., Berry, C. T., Li, N., Schoenberger, J., Simeonov, K. P., Cedeno, R. J., Yu, Z., & Lengner, C. J. (2018). Calorie Restriction Governs Intestinal Epithelial Regeneration through Cell-Autonomous Regulation of mTORC1 in Reserve Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *10*(3), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.026>
- Yuan, H., Han, Y., Wang, X., Li, N., Liu, Q., Yin, Y., Wang, H., Pan, L., Li, L., Song, K., Qiu, T., Pan, Q., Chen, Q., Zhang, G., Zang, Y., Tan, M., Zhang, J., Li, Q., Wang, X., ... Qin, J. (2020). SETD2 Restricts Prostate Cancer Metastasis by Integrating EZH2 and AMPK Signaling Pathways. *Cancer Cell*, *38*(3), 350-365.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.05.022>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, *16*(1), 2–9. <https://doi.org/10.1038/NCB2897>
- Zeng, M. Y., Inohara, N., & Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*, *10*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.75>
- Zeng, X., Han, L., Singh, S. R., Liu, H., Neumüller, R. A., Yan, D., Hu, Y., Liu, Y., Liu, W., Lin, X., & Hou, S. X. (2015). Genome-wide RNAi Screen Identifies Networks Involved in Intestinal Stem Cell Regulation in Drosophila. *Cell Reports*, *10*(7), 1226–1238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.051>
- Zeng, X., & Hou, S. X. (2015). Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult drosophila posterior midgut. *Development (Cambridge)*, *142*(4), 644–653. <https://doi.org/10.1242/DEV.113357/-/DC1>
- Zhai, Z., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. (2017). A genetic framework controlling the differentiation of intestinal stem cells during regeneration in Drosophila. *PLoS Genetics*, *13*(6), e1006854. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006854>
- Zhang, Q., Hua, G., Bayyareddy, K., & Adang, M. J. (2013). Analyses of α -amylase and α -glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(10), 907–915. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2013.07.003>
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L., & Bulla, L. A. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, *12*(11), 1407–1416. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401675>
- Zhang, X. W., Sheng, Y. P., Li, Q., Qin, W., Lu, Y. W., Cheng, Y. F., Liu, B. Y., Zhang, F. C., Li, J., Dimri, G. P., & Guo, W. J. (2010). BMI1 and Mel-18 oppositely regulate carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Molecular Cancer*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-40>
- Zhang, Xuebin, Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006). A mechanism of cell death

- involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(26), 9897–9902. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0604017103>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, *21*(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/GAD.1602907>
- Zhao, J., Du, P., Cui, P., Qin, Y., Hu, C., Wu, J., Zhou, Z., Zhang, W., Qin, L., & Huang, G. (2018). LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene*, *37*(30), 4094–4109. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0250-z>
- Zhao, J., Ohsumi, T. K., Kung, J. T., Ogawa, Y., Grau, D. J., Sarma, K., Song, J. J., Kingston, R. E., Borowsky, M., & Lee, J. T. (2010). Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Molecular Cell*, *40*(6), 939–953. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.12.011>
- Zhao, W., Huang, Y., Zhang, J., Liu, M., Ji, H., Wang, C., Cao, N., Li, C., Xia, Y., Jiang, Q., & Qin, J. (2017). Polycomb group RING finger proteins 3/5 activate transcription via an interaction with the pluripotency factor Tex10 in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(52), 21527–21537. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.804054>
- Zhao, X., & Wu, X. (2021). Polycomb-group proteins in the initiation and progression of cancer. In *Journal of Genetics and Genomics* (Vol. 48, Issue 6, pp. 433–443). Institute of Genetics and Developmental Biology. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.013>
- Zhu, S., Zhao, D., Yan, L., Jiang, W., Kim, J. S., Gu, B., Liu, Q., Wang, R., Xia, B., Zhao, J. C., Song, G., Mi, W., Wang, R. F., Shi, X., Lam, H. M., Dong, X., Yu, J., Chen, K., & Cao, Q. (2018). BMI1 regulates androgen receptor in prostate cancer independently of the polycomb repressive complex 1. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-02863-3>
- Zhu, W., Winter, M. G., Byndloss, M. X., Spiga, L., Duerkop, B. A., Hughes, E. R., Büttner, L., De Lima Romão, E., Behrendt, C. L., Lopez, C. A., Sifuentes-Dominguez, L., Huff-Hardy, K., Wilson, R. P., Gillis, C. C., Tükel, Ç., Koh, A. Y., Burstein, E., Hooper, L. V., Bäuml, A. J., & Winter, S. E. (2018). Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*, *553*(7687), 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature25172>
- Żylicz, J. J., Bousard, A., Žumer, K., Dossin, F., Mohammad, E., da Rocha, S. T., Schwalb, B., Syx, L., Dingli, F., Loew, D., Cramer, P., & Heard, E. (2019). The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation. *Cell*, *176*(1–2), 182–197.e23. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.11.041>