université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

NNT: 2015SACLV036

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

PRÉPARÉE A L'UNIVERSITÉ DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

Ecole Doctorale N°577

ED - Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé

Présentée par :

Mlle Jessica PEROCHON

Étude des conséquences d'un stress chronique du Réticulum Endoplasmique (RE) chez *Drosophila melanogaster*

Thèse présentée et soutenue à l'UFR des Sciences de la Sante – Simone Veil, le 21 Octobre 2015 :

JURY:

Mme Anne-Marie PRÊT	Pr, CNRS	Président
Mme Allison BARDIN	CR, CNRS	Rapporteur
Mr Éric OGIER-DENIS	DR, INSERM	Rapporteur
Mme Frédérique PERONNET	DR, CNRS	Examinatrice
Mr Bernard MIGNOTTE	Pr, UVSQ	Directeur de thèse
Mr Sébastien GAUMER	MC, UVSQ	Co-directeur de thèse

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Titre: Étude des conséquences d'un stress chronique du RE chez *Drosophila melanogaster*

Mots clés: UPR, PERK, apoptose, homéostasie, Drosophila, disque imaginal d'aile

Résumé: Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite assurant de nombreuses fonctions cellulaires telles que la conformation et des modifications post-traductionnelles des protéines ou le maintien de l'homéostasie calcique. Cet organite est donc un site crucial pour réguler le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire des organismes multicellulaires. Des altérations de ses fonctions conduisent à l'accumulation de protéines mal-conformées qui sont observées dans de nombreuses pathologies humaines telles que des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques. Ce stress déclenche une réponse adaptative connue sous le nom de réponse aux protéines mal-conformées (UPR) qui permet à la cellule de supprimer ses sources et conséquences. Néanmoins, l'intensité et la chronicité du stress peuvent entrainer une modification de l'UPR qui conduit alors à l'élimination de la cellule par apoptose. A ce jour, les processus moléculaires qui permettent à l'UPR d'induire l'apoptose restent flous. De plus, l'implication de l'UPR dans la régulation de processus compensatoires n'a jamais été étudiée. Mes travaux de thèse apportent une meilleure compréhension de ces mécanismes à travers l'étude comparative de différents modèles de stress chronique du RE, qui dépendent d'une dérégulation de l'homéostasie protéique et/ou calcique. Ils soulignent également le rôle essentiel de la branche PERK/ATF4 de l'UPR dans l'induction de deux voies parallèles et indépendantes. D'une part, PERK promeut une apoptose dépendante des caspases *via* une répression de l'expression de *diap1*, et d'autre part, elle induit un retard de développement à travers une induction de l'expression de *dilp8* dépendante de la voie JNK. Mes données suggèrent également une spécificité tissulaire des signalisations déclenchées en réponse à un stress chronique du RE.

Title: Study of the consequences of a chronic ER stress in *Drosophila melanogaster*

Keywords: UPR, PERK, apoptosis, homeostasis, Drosophila, wing imaginal disc

Abstract: The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle which ensures various cellular functions such as protein maturation and folding or calcium homeostasis maintenance. That is why ER is a crucial site of cell and tissue homeostasis regulation in multicellular organisms. Disruption of ER functions leads to misfolded-protein accumulation and is observed in a great number of devastating human diseases. This ER stress triggers an adaptive response named Unfolded Protein Response (UPR) in order to attempt to resolve its sources and consequences. Nevertheless, the intensity and chronicity of ER stress can change this response and lead to the apoptosis of stressed cells. To this date, the molecular processes that regulate UPR-induced apoptosis remain unclear. Furthermore, the UPR contribution in the modulation of compensatory mechanisms in response to ER stress has never been studied. This work contributes to a better understanding of these processes through a comparative study of various chronic ER stresses, which depend on the disruption of proteostasis or calcium homeostasis. During my thesis, I have established the essential role of the PERK/ATF4 branch of the UPR in the induction of two parallel and independent pathways. One promotes apoptosis through the down-regulation of the *diap1* gene while the other interferes with the induction of a developmental delay though a JNK signaling-dependent *dilp8* expression. My results also suggest that chronic ER stress response is tissue specific.

REMERCIEMENTS

Nous y voilà! Ce chapitre fait désormais partie de mon histoire!

Une thèse est un travail acharné et de longue haleine, certainement un défi que l'on se lance à soi-même. Il m'a fallu du temps pour dessiner les contours de mon sujet, comprendre ce que j'observais, prendre du recul et accepter de ne pas toujours obtenir de réponses à mes questions scientifiques. Une chose est sûre, j'ai grandi en même temps que ce projet de recherche, qui m'a permis de progresser dans ce délicat processus "d'apprenti-chercheur"! Cette aventure est également une incroyable histoire de rencontres humaines et d'amitié qui ont rythmé et pimenté ces quatre dernières années!

En premier lieu, je tiens à remercier Allison Bardin, Eric Augier-Denis, Anne-Marie Prêt et Frédérique Peronnet pour l'intérêt porté à ce travail de recherche en acceptant de faire partie de ce jury.

Je remercie également Bernard Mignotte pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Si on reprend le fil de l'histoire, tout a débuté avec un TP de L3 au cours duquel j'ai rencontré et manipulé pour la première fois, des drosophiles. Cette expérience révélatrice, m'a rapidement donné envie de travailler avec ce petit organisme modèle. A cette époque, Sébastien Gaumer m'a donné l'opportunité de faire plusieurs stages au sein de son équipe (en fin de L3 et au cours de mon M2) qui bien entendu travaillait sur cette petite mouche. Une manip en entrainant une autre, tout ceci a débouché sur une thèse au sein de cette équipe. Je remercie donc Sébastien d'avoir été à l'origine de ce projet, de m'avoir accordé sa confiance, d'avoir été présent pour répondre à toutes mes questions et de m'avoir laissé beaucoup d'autonomie. S'il y a bien une chose que j'ai retenu à tes côtés, c'est que jusqu'à la dernière minute "on est large"! Avec le temps, j'ai fini par adopter cette philosophie et j'en ai fait mon leitmotiv quand les circonstances l'exigent, comme par exemple ces trois derniers mois intensifs.... Bien évidemment, je me dois également d'aborder le sujet de l'humour qui est si caractéristique des Sébs qui composent cette équipe et que j'ai finalement avec le temps, fini par comprendre et accepter! Petite transition qui me permet de remercier Sébastien Szuplewski (alias Séb Sup) qui a notamment été moteur dans l'initiation de différentes pistes d'études que j'ai suivi lorsque celles-ci s'avéraient prometteuses. J'ai apprécié les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Je tiens également à remercier Yohan Demay pour m'avoir appris les rudiments de l'expérimentation à la paillasse, Gérald Vinatier pour nos discussions philosophiques en pièce à mouche, Jean-Marc Corsi pour ses conseils savamment distillés tout au long de ces années et enfin, Benjamin Grandon pour sa bonne humeur. Mes remerciements envers mon équipe ne seraient pas complets, sans rendre hommage à Didier Contamine et Evelyne Maillet, deux figures au grand cœur qui malheureusement, nous ont quitté bien trop tôt.

Je tiens à remercier très chaleureusement l'ensemble des doctorants et post-doc qui sont passés par le labo et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, toujours dans la bonne humeur et l'entraide. Tout d'abord, merci à Caro, ma "geekette" préférée qui m'a toujours soutenue et accompagnée pendant ces années, je dois reconnaitre que tu sais toujours comment faire pour me donner le sourire surtout quand je suis "au bout de mon rouleau"! Probablement que ta petite tête y est pour quelque chose, à Vincent pour m'avoir fait tester des saveurs de chips improbables ! je dois

reconnaitre que c’est la classe de pouvoir faire sa thèse avec deux de ses meilleurs potes de fac ! Un grand merci également à Amandine pour notre complicité et nos papotages en tout genre, à Eli pour ses conseils et le covoiturage, à Angé pour nos marches vivifiantes, à Adrie pour son petit grain de folie en pièce à mouche! A Laurine pour sa gentillesse, à Marie pour sa douceur, à Sevasti pour ses cours de grecque à table ! A Fréd, mon coloc de bureau dont l'enthousiasme et les conseils ont été stimulants et rassurants pour ma recherche de postdoc!

Merci également à tous les autres membres du laboratoire avec qui il est agréable de travailler, de déjeuner et de partager des pauses goûter au quotidien: Isabelle, Aurore, Flore, Sylvina, Nathalie, Arnaud et Nadège.

Je tiens à faire une mention spéciale pour "Marcella *mi amor*", "Kiki *mi amor bis*" et Soso qui sont des personnes adorables. Merci Sophie de m'avoir toujours aidé pour les tâches administratives qui je dois bien l'admettre ne sont pas vraiment mon fort, Caro pourra le confirmer...et de m'avoir accordé une écoute bienveillante quand j'en avais besoin. Marcelle et Christine vous êtes mon binôme de choc! Avec vous, mes petites mouches ont été traitées comme des reines! Et me concernant, travailler à vos côtés a été un véritable bonheur, j’étais assurée d'avoir ma dose de fou rire quotidienne en pièce à mouches et en pièce dissection! Votre enthousiasme et votre soutien tout au long de cette aventure m'ont été très précieux.

Je souhaite remercier mes amis pour leur soutien et leurs propositions d'activité "extra-thèse" qui m'ont permis de me changer régulièrement les idées. Je tiens à remercier tout particulièrement Alix, Caro, Léa et Mag pour leur écoute et leurs adorables attentions.

Enfin, je remercie infiniment ma famille qui a toujours pris soin de moi. Je suis profondément reconnaissante envers mes parents qui m'ont toujours laissé libre de faire ce que je voulais, tout en me donnant les moyens d'y arriver. Vous êtes les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Votre soutien et votre amour inconditionnels me portent et me guident tous les jours. Je remercie aussi mes frères, Frank et Victor d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir conseillé et soutenu! Une petite mention spéciale pour Frank qui a apporté sa contribution dans la rédaction de ce manuscrit puisque je lui dois une partie de la liste des abréviations!! Je suis heureuse d'avoir partagé cette aventure avec vous et assurément qu'il y en aura d'autres à venir...

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 2
TABLE DES MATIÈRES 5
LISTE DES ABRÉVIATIONS 9
TABLE DES FIGURES 13
PRÉAMBULE 17
INTRODUCTION 19
I. MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE PROTÉIQUE AU SEIN DU RE 21
A. Homéostasie protéique dans la cellule 21
B. Le RE et ses fonctions 21
1. Synthèse lipidique 21
2. Synthèse protéique et voie de sécrétion 23
a. Translocation et modification post-traductionnelles 23
b. Le système de contrôle-qualité des protéines 25
3. Homéostasie calcique 27
a. Les protéines tampons 31
b. Les canaux calciques 31
(1) IP_3R 31
(2) RyR 32
c. La pompe SERCA 32
d. La préséniline 34
(1) Fonction protéasique dépendante de l'activité γ-sécrétase 34
(2) Fonction calcique indépendante de l'activité γ-sécrétase 36
C. Stress RE et réponses adaptatives 38
1. L'UPR 41
a. L'UPR et ses senseurs canoniques 41
(1) La branche IRE1 41
(2) La branche PERK 44
(3) La branche ATF6 47
b. L'UPR et d'autres senseurs de stress 49
2. L'UPR en condition de stress 50
a. Détection du stress 50
(1) Activation canonique de l'UPR dépendante de BIP 50
(2) Activation alternative de l'UPR 52
b. Réponses de l'UPR pour s'adapter au stress 53
(1) UPR et protéostasie 53

(2) UPR et ERAD 55
(3) UPR et autophagie 55
(4) UPR et biogenèse des membranes 58
(5) Réponses intégratives au stress 59
D. Conséquence de l'UPR en contexte de stress prolongé 59
1. La mort cellulaire par apoptose 59
a. Les différents types d'apoptose 60
(1) L'apoptose développementale 60
(2) L'apoptose accidentelle 60
b. Les caspases et leurs antagonistes les IAPs 60
c. La voie intrinsèque de l'apoptose 63
2. Les conséquences pro-apoptotiques de la branche PERK de l'UPR 69
a. Actions médiées par CHOP 69
b. Actions médiées par ATF4 70
3. Les conséquences pro-apoptotiques de la branche IRE1 de l'UPR 71
a. Rôle pro-apoptotique de RIDD 71
b. Rôle pro-apoptotique de la voie JNK 71
(1) La signalisation JNK 71
(2) Apoptose dépendante de la voie IRE1/JNK 75
4. Survie versus apoptose 76
E. UPR et pathologies humaines 76
1. Différentes pathologies associées au RE 76
2. L'ADRP 78
3. Le cancer colorectal (CRC) 81
II. Maintien de l'homéostasie tissulaire au cours du développement 85
A. Coordination de la croissance tissulaire au cours du développement 85
B. Régulation de la croissance tissulaire au sein d'un organisme 87
1. Contrôle environnemental 87
2. Contrôle hormonal 90
a. L'ecdysone 90
b. Régulation de la synthèse de l'ecdysone dans la PG 92
(1) La voie insuline/TOR 92
(2) La voie PTTH/MAPK et son antagoniste la JH 92
(3) La voie TGFβ/Activine 93
C. Quelques mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire 93
1. La prolifération compensatoire 95
a. Le modèle de cellule « undead » 97
b. Modèle de prolifération compensatoire en absence de p35 99

2. Le retard d'entrée en métamorphose 100
III. Situation du sujet 104
RÉSULTATS 106
I. ARTICLE 1 108
II. ARTICLE 2 111
III. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 113
A. Caractérisation de la voie de mort et de son impact dans le modèle de surexpression de *Rh-1*^{G69D} 113
B. Implication de l'autophagie dans les modèles Psn et Rh-1^{G69D} 115
C. Le modèle de croissance néoplasique : Vps23/TSG101 121
D. Implication de la voie JAK/STAT dans le modèle Psn 124
DISCUSSION 128
I. Le stress du RE provoqué par la surexpression de *Psn* est en partie dû à une dérégulation de l'homéostasie calcique 130
II. La voie de mort cellulaire induite dans nos modèles de stress du RE est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR. 133
III. L'expression de *dilp8* induit un retard de développement en réponse à l'activation de la voie Slpr-JNK par la branche PERK/ATF4 de l'UPR 134
IV. La déplétion de TSG101 est un modèle de stress du RE dans lequel le retard de développement est médiée par la voie Traf2-JNK-Dilp8 134
V. L'activation de la signalisation JAK/STAT, en amont de la voie JNK, semble intervenir dans la modulation de l'expression de *dilp8* dans le modèle *Psn* 135
VI. La formation des autophagosomes est au moins en partie dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR et des caspases 136
VII. CONCLUSION 138
MATÉRIELS ET MÉTHODES 141
I. Stocks 143
II. Immunohistochimie et microscopie. 143
III. Quantification de l'expression de *dilp8* et de la prolifération 144
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 145

LISTE DES ABRÉVIATIONS

20-E	20-hydroxyecdysone
AARE	Amino-Acid Response Element
AD	Alzheimer Disease
ADRP	Autosomal Dominant *Retinis Pigmentosa*
AIP	Apoptosis Induced Proliferation
AP-1	Adaptator protein complex-1
Apaf-1	Apoptotic protease activation factor 1
Apc	Adenomatous polyposis coli
Aph-1	Anterior pharynx defective - 1
APP	β-Amyloïde precursor protein
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messager
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
Atg	Autophagy related gene
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
BiP	Immunoglobulin binding protein
BIR	Baculovirus inhibitory repeat
Bsk	Basket
bZIP	basic leucine zipper motif
CA	Corpora Allata
CaMKII	Calmodulin-dependent protein kinase II
CARD	caspase activation and recruitment domain
Caspase	Cysteinyl aspartate cleaving protease
CCH	Croissance Cellulaire Hypertrophique
Cdc42	Cell division cycle 42
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CncC	Cap'n Collar
CNX	Calnexin
crc	cryptocephal
CRC	Colorectal Cancer
CRE	Creb Response Element
CRT	Calreticulin
CTF	C-Terminal Fragment
Damm	Death-associated molecule related to Mch2
Dark	Drosophila Apaf-1-related killer
Dask1	Drosophila Apoptosis signal-regulating kinase 1
dBruce	Drosophila BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
Dcp-1	Death caspase 1
dCYLD	*Drosophila* cylindromatosis
DD	Death Domain

Decay	Death executioner caspase related to apopain/Yama
Diap	Drosophila inhibitor of apoptosis protein
Dilp	Drosophila insulin-like peptide
Dilp8	Drosophila insulin-like peptide 8
dMekk1	Drosophila MAP/ERK kinase kinase 1
dpp	Decapentaplegic
Dredd	Death related ced-3/Nedd2-like
Drice	Drosophila ICE
Dronc	Drosophila Nedd-2-like caspase
Drp1	Dynamin related protein-1
dTak1	Drosophila TGF-β activated kinase 1
dTakl2	Drosophila Tak1-like 2
dTRAF	Drosophila TNF receptor associated factor
Duev1a	Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme variant 1a
Ecr	Ecdysone receptor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Eiger	Eda-like cell death trigger
elF2α	eukaryotic translation initiation Factor 2α
EMC	ER membrane protein complex
ERAD	ER-Associated Degradation
ERO1α	ER oxydase 1α
ERSE	ER Stress Response Element
ETH	Ecdysis triggering Hormone
FDS	Fat body-Derived Signal
FoxO	Forkhead box O
Fra	Fos-related antigen
Fz	Frizzled
Gadd34	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34
GFP	Green Fluorescent Protein
Gmr	Glass multimer reporter
GRP	Glucose Response Element
Grp78	Glucose-regulated protein 78
Grp94	Glucose-regulated protein 94
Hep	Hemipterous
Hh	Hedgehog
Hid	Head involution defective
IAP	Inhibitor apoptotis protein
IAP	Inhibitor of apoptotic protein
IEC	Intestinal Epithelium Cell
InR	Insulin Receptor
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R	Inositol 1,4,5-triphosphate
IPC	Insulin-Producting Cells
IRAK2	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase -2
IRE1	Inositol Requiring Enzyme-1

ISC	Intestinal Stem Cell
JH	Juvenil Hormone
JIK	c-Jun NH2-terminal inhibitory kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Jra	Jun related antigen
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MAM	Mitochondria-associated ER Membrane
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mkk4	MAP kinase kinase 4
MMP	Métalloprotéase matricielle
Msn	Misshapen
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin complex 1
Nct	Nicastrin
ninaE	neither inactivation nor afterpotential E
NOS	Nitric Oxide Synthase
Nrf2	Nuclear Factor (erythoid-derived 2)-like 2
NTF	N-Terminal Fragment
Nub	nubbin
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PEN-2	Presenilin Enhancer - 1
PERK	Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase
PG	Prothoracic Gland
PKC	Phosphokinase C
PS1	Préséniline 1 de mammifère
PS2	Préséniline 2 de mammifère
Psn	Préséniline de drosophile
PTP	Mitochondrial Permeability Transition
PTTH	Prothoracicotropic Hormone
Puc	puckered
PVF	Platelet vascular factor
PVR	PVF receptor
RE	Réticulum endoplamisque
REL	Réticulum Endoplasmique lisse
Rh1	Rhodopsin 1
RHG	Reaper Hid Grim
RhO1	Ras homologous 1
RIDD	Regulated Ire1 Dependent Decay pathway
RING	Really interesting new gene
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpr	Reaper
RyR	Ryanodine Receptor
SAPK	Stress activated protein Kinase pathway
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase
SOCs	Store-operated Ca^{2+} channels
Splr	Slipper

SRP	Signal Recognition Particule
STIM	Stromal Interaction Molecule
Strica	Ser/Thr-rich caspase
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TM	Transmembrane Domain
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick end labelling
UAS	Upstream Activating Sequence
uORF	upstream Open Reading Frames
Upd2	Unpaired 2
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	Unfolded Protein Response Element
Usp	Ultraspiracle
UTR	UnTranslated Region
VCP	Valesin-containing protein
Vg	vestigial
wg	Wingless
Wnd	Wallenda
XBP1	X-box-binding protein 1
XBP1u	unspliced XBP1
XIAP	X-linked IAP

TABLE DES FIGURES

Introduction

Figure 1: Structure et fonction du Réticulum endoplasmique (RE*)*……*p.22*

Figure 2: Translocation des protéines dans le RE……*p.24*

Figure 3: le cycle calnexine/calréticuline……*p.26*

Figure 4 : Dynamique des voies calciques et homéostasie……*p.28*

Figure 5 : Signalisation calcique au niveau du RE……*p.29*

Figure 6 : Maintien d'une [Ca^{2+}] du RE normale……*p.30*

Figure 7 : Structure de préséniline 1 (PS1) de mammifère……*p.33*

Figure 8 : Les sous-unités du complexe protéique γ-sécrétase et leur topologie membranaire……*p.33*

Figure 9 : Fonctions de PS1 dépendante de son activité γ-sécrétase……*p.35*

Figure 10 : Les étapes clés de l'ERAD……*p.39*

Figure 11 : Schéma bilan des différents acteurs du RE……*p.40*

Figure 12 : La branche IRE1 de l'UPR……*p.42*

Figure 13 : La branche PERK de l'UPR……*p.45*

Figure 14 : Régulation traductionnelle de l'ARNm codant ATF4……*p.46*

Figure 15 : La branche ATF6 de l'UPR……*p.48*

Figure 16 : Les effecteurs régulés transcriptionnellement par l'UPR en condition de stress du RE…*p.54*

Figure 17 : Le processus d'autophagie……*p.56*

Figure 18 : Autophagie non-sélective versus autophagie sélective……*p.57*

Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines structuraux des caspases initiatrices et effectrices chez la drosophile et les mammifères……*p.62*

Figure 20 : Interactions mécanistiques au sein de la voie de mort cellulaire chez *Drosophila*……*p.64*

Figure 21 : La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères et la drosophile……*p.65*

Figure 22 : Régulation de la cascade d'activation des caspases par Diap1 chez la drosophile……*p.67*

Figure 23 : Les mécanismes pro-apoptotiques de la branche PERK de l'UPR chez les mammifères..*p.72*

Figure 24: La signalisation JNK chez la drosophile……*p.74*

Figure 25 : Les mécanismes pro-apoptotiques de la branche IRE1 de l'UPR chez les mammifères...*p.77*

Figure 26 : L'expression de $Rh1^{G69D}$ induit un stress du RE et active la branche IRE1/XBP1 dans le tissu d'œil de drosophile……*p.80*

Figure 27 : Cdk5 et Mekk1 sont requis pour l'apoptose induite par l'expression de *Rh1*^{G69D}……..*p.82*

Figure 28 : Cycle de développement de la drosophile……*p.86*

Figure 29 : Territoires présomptifs des tissus adultes de drosophile après métamorphose……*p.86*

Figure 30 : Interactions physiologiques entre les tissus larvaires et les disques imaginaux afin de contrôler la croissance chez la drosophile……*p.89*

Figure 31 : Points de contrôles du développement avant la métamorphose……*p.91*

Figure 32 : La glande prothoracique (PG), le centre intégrateur et décisionnaire pour la progression développementale……*p.94*

Figure 33 : Modèle de croissance cellulaire compensatoire de type hypertrophique (CCH) dans des cellules épithéliales post-mitotiques……*p.96*

Figure 34 : La prolifération compensatoire dans un tissu épithéliale chez la drosophile……*p.98*

Figure 35: Régulation de la progression développementale, en présence d'un tissu endommagé……*p.103*

Résultats

Figure 36 : La mort cellulaire induite par l'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile dépend des caspases et est associée à une diminution de la quantité protéique de DIAP1……*p.114*

Figure 37 : La diminution de la quantité de DIAP1 est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR en contexte d'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile……*p.114*

Figure 38 : L'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile n'induit pas une augmentation de la quantité de cellules en mitose……*p.114*

Figure 39 : La formation d'agrégats protéiques en contexte de surexpression de *Psn* et d'expression de *Rh-1*^{G69D} est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR……*p.116*

Figure 40 : L'agrégation protéique observée dans nos modèles Psn et Rh-1^{G69D} n'est pas dépendante de la voie JNK……*p.118*

Figure 41 : Les modèles Psn et Rh-1^{G69D} présentent une activation du processus d'autophagie….*p.119*

Figure 42 : La formation des autophagosomes en contexte de surexpression de *Psn* et d'expression de *Rh-1*^{G69D} est en partie dépendante des caspases……*p.120*

Figure 43 : Vérification de la validité du modèle Vps23……*p.122*

Figure 44 : Caractérisation des effets d'une déplétion de Vps23 dans le disque imaginal d'aile……*p.122*

Figure 45 : La signalisation JAK/STAT est activée en contexte de stress du RE induit par la surexpression de *Psn*……*p.123*

Figure 46 : La signalisation JAK/STAT semble moduler l'expression de *dilp8* et l'activation de la voie JNK dans le modèle de surexpression de *Psn*……*p.125*

Figure 47 : La signalisation JAK/STAT semble moduler la mort cellulaire et le niveau protéique de DIAP1 dans le modèle de surexpression de *Psn*……*p.127*

Figure 48 : Le sauvetage des phénotypes induits par la surexpression de *Psn* en contexte d'inhibition de la voie JAK/STAT est dû à une réduction partielle de la quantité de protéine Psn……*p.127*

Discussion

Figure 49 : Distribution des phénotypes d'échancrures d'ailes en contexte de surexpression de Psn et d'expression de Rh-1^{G69D}.....*p.132*

Conclusion

Figure 50 : Modèle des réponses des cellules du disque imaginal d'aile à l'induction de différents stress du RE……*p.140*

PRÉAMBULE

En 1865, le médecin et physiologiste français Claude Bernard introduit pour la première fois en biologie, le principe d'homéostasie. Dans un système quelconque, il définit la notion de milieu intérieur et la capacité de ce dernier à maintenir son équilibre malgré ses échanges avec son environnement extérieur (Bernard, 1865). Ce concept sera par la suite précisé par le physiologiste américain Walter Bradford Cannon (1932) qui le définira comme étant : « L'ensemble des processus organiques qui agissent pour maintenir l'état stationnaire de l'organisme, dans sa morphologie et dans ses conditions intérieures, en dépit de perturbations extérieures » (Cannon, 1932). Le maintien de l'intégrité fonctionnelle d'un système, malgré les contraintes extérieures qui lui sont imposées, est conservé au cours de l'évolution et doit être finement régulé. Ceci est parfaitement illustré à travers l'observation des différentes tailles et formes entre les individus issus d'espèces différentes tandis qu'au sein d'une même espèce, cette variabilité reste relativement constante. Le concept d'homéostasie à l'échelle des organismes peut également s'étendre au niveau tissulaire et cellulaire. Ainsi, l'homéostasie tissulaire résulte d'un équilibre entre différents processus tels que la mort, la prolifération, la croissance, la différenciation et la migration cellulaires. Cette notion est essentielle aussi bien au cours du développement que chez l'adulte, puisqu'elle permet à la fois la mise en place et le maintien de l'organisation, de la taille et de la fonction du tissu.

Toute perturbation de ces mécanismes régulant l'homéostasie tissulaire peut aboutir au développement de pathologies. En effet, un excès de prolifération cellulaire peut conduire à la formation de tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011) et à l'inverse, un excès de mort cellulaire peut par exemple, provoquer le développement de maladies neurodégénératives. Il est néanmoins possible de retourner vers cet état d'équilibre en induisant une réponse compensatoire adaptée (Martín et al., 2009a), afin de rétablir ou tout du moins de tendre vers un retour de cet état d'équilibre favorable pour la survie et le bon fonctionnement du tissu.

Dans cette introduction, je vous présenterai d'abord les acteurs et les enjeux du maintien de l'homéostasie cellulaire et plus particulièrement l'homéostasie protéique du RE, puis dans un second temps, les mécanismes encore mal connus contribuant au maintien de l'homéostasie tissulaire au cours du développement.

INTRODUCTION

«La science n'a jamais tout à fait raison mais elle a rarement tout à fait tort, et en général, elle a plus de chance d'avoir raison que les théories non scientifiques. Il est donc rationnel de l'accepter à titre d'hypothèse»

Bertrand Russel

RÉSULTATS

DISCUSSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I. MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE PROTÉIQUE AU SEIN DU RE

A. Homéostasie protéique dans la cellule

L'homéostasie protéique est définie comme étant l'équilibre idéal entre la synthèse, la maturation et la dégradation des protéines cellulaires. La production de protéines nouvellement synthétisées est un processus clé de l'homéostasie protéique puisqu'elle initie le flux de biosynthèse des protéines et détermine donc la composition, la stabilité et la fonctionnalité du protéome. Le maintien du protéome, à l'échelle de la cellule, est essentiel pour préserver son bon fonctionnement, sa capacité à répondre et à s'adapter aux changements environnementaux. Le réseau de maintien de l'homéostasie protéique cytosolique inclut les systèmes de repliement des protéines, et la machinerie de dégradation des protéines mal-conformées, agrégées ou dysfonctionnelles via le système ubiquitine-protéasome ou la voie de dégradation autophagie. L'homéostasie protéique au sein du RE est soigneusement orchestrée par les mécanismes impliqués dans la synthèse, le repliement, le trafic ou encore la dégradation des protéines. Toute perturbation de cet équilibre protéique est à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique (RE). Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux conséquences de ce phénomène de stress au niveau du RE, vis-à-vis de la survie cellulaire. Ceci est détaillé dans cette première partie d'introduction.

B. Le RE et ses fonctions

La majorité des cellules contiennent du réticulum endoplasmique (RE), dont l'abondance est proportionnelle à leurs besoins. Les fonctions physiologiques accomplies par le RE sont nombreuses et essentielles pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elles couvrent notamment la synthèse lipidique, la maturation des protéines parcourant la voie de sécrétion ainsi que la régulation des flux calciques (Figure 1).

1. Synthèse lipidique

Les lipides assurent diverses fonctions essentielles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ces molécules sont notamment utilisées en tant que source d'énergie, en tant que molécule de signalisation et en tant que composant des vésicules et membranes biologiques. Les lipides cellulaires sont très diversifiés et existent sous forme d'acides gras, de phospholipides, et de cholestérol. Le RE joue un rôle essentiel dans la biogenèse de ces lipides et principalement dans la synthèse des glycérophospholipides et des sphingolipides qui représentent les principaux constituants des membranes biologiques. Les enzymes de biosynthèse lipidique du RE assurent notamment la transformation du glycérol et des acides gras en précurseurs des

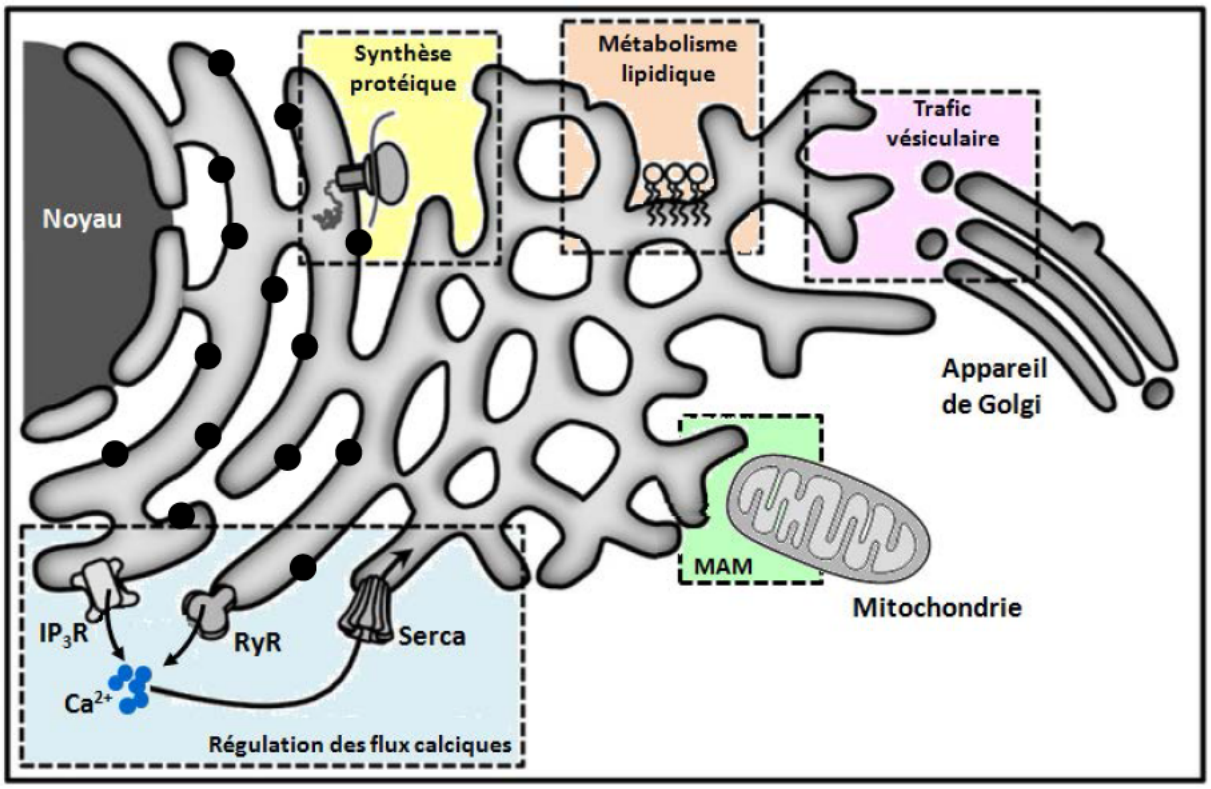


Figure 1: Structure et fonction du Réticulum endoplasmique (RE)

Le RE est un organite très dynamique qui est divisé en deux domaines interconnectés : le RER (Réticulum endoplasmique rugueux) qui est caractérisé par la présence de ribosomes (points noirs) au niveau de sa membrane et le REL (Réticulum endoplasmique lisse) qui est caractérisé à l'inverse, par l'absence de ribosomes à sa surface.
Cet organite assure diverses fonctions telles que le maintien de l'homéostasie calcique à travers l'utilisation d'une batterie de canaux, pompes et protéines tampons. Le RE est également essentiel pour la synthèse protéique et lipidique ainsi que pour le contrôle qualité et la dégradation de nombreuses protéines. En collaboration avec l'appareil de Golgi, il intervient dans le processus de trafic cellulaire qui est notamment nécessaire pour l'export des produits de synthèse du RE vers la membrane plasmique. Enfin, le RE intervient dans la régulation des activités mitochondriales à travers des zones d'interactions dynamiques appelées MAM (mitochondria-associated ER membrane). D'après Bravo et al., 2013.

phospholipides(Fagone and Jackowski, 2009). Concernant le cholestérol, le RE participe également à la biosynthèse de cette molécule qui n'a pas seulement un rôle structural au sein des membranes biologiques, mais qui agit également en tant que précurseur de différentes hormones stéroïdiennes comme par exemple l'ecdysone, une hormone qui intervient dans la régulation du temps de développement, chez les arthropodes.

2. Synthèse protéique et voie de sécrétion

Le RE est le premier compartiment de la voie dite de sécrétion des protéines qui est impliquée dans la maturation et donc le processus de sécrétion, d'une part des protéines de la membrane plasmique, et d'autre part des protéines solubles ou membranaires des différentes organelles de la voie de sécrétion elle-même (RE, appareil de Golgi, lysosomes, endosomes et vésicules de sécrétion). Dès lors, une fois conformées et assemblées dans le RE, ces protéines rejoignent l'appareil de Golgi à partir duquel elles seront adressées à leur compartiment final. Pour assurer l'ensemble de ces activités, le RE contient un système élaboré de repliement protéique et de contrôle qualité médié par tout un panel de protéines spécifiques résidentes du RE.

a. Translocation et modification post-traductionnelles

Les polypeptides naissants qui émergent du ribosome et qui présentent en N-terminal une séquence hydrophobe d'adressage, sont transloqués vers la lumière du RE (Corsi and Schekman, 1996). Pour cela, un complexe de reconnaissance de ce signal : la SRP (Signal Recognition Particule) se fixe au ribosome et à la séquence signal afin d'être recruté à la surface du RE par le récepteur membranaire de SRP qui est lui-même lié à un canal de translocation (complexe Sec61) (Osborne et al., 2005). Ce translocon fixe le peptide signal et permet ainsi le transit à travers ce canal de la protéine au cours de sa synthèse pour passer dans la lumière du RE (pour les protéines sécrétées) ou être directement intégrée dans la membrane du RE (pour les protéines de type transmembranaire) (Figure 2).

Une fois dans la lumière du RE, les protéines nouvellement synthétisées doivent subir plusieurs modifications post-traductionnelles afin d'acquérir leur conformation définitive et achever leur maturation. La modification la plus fréquente est l'ajout d'une unité d'oligosaccharide (14 résidus glucidiques : 2 acétylglucosamines, 3 glucoses et 9 mannoses) au cours de la N-glycosylation sur un résidu aspartique (Helenius and Aebi, 2004) (Kelleher and Gilmore, 2006). Cet ajout est suivi de l'élimination de 2 glucoses afin d'obtenir une protéine monoglucosylée qui pourra par la suite être reconnue par le système contrôle-qualité du bon repliement des protéines. Il existe d'autres types de modifications tels que l'ajout de lipides, pour permettre des ancrages lipidiques ou encore la formation de ponts disulfures qui ont la propriété de stabiliser les protéines.

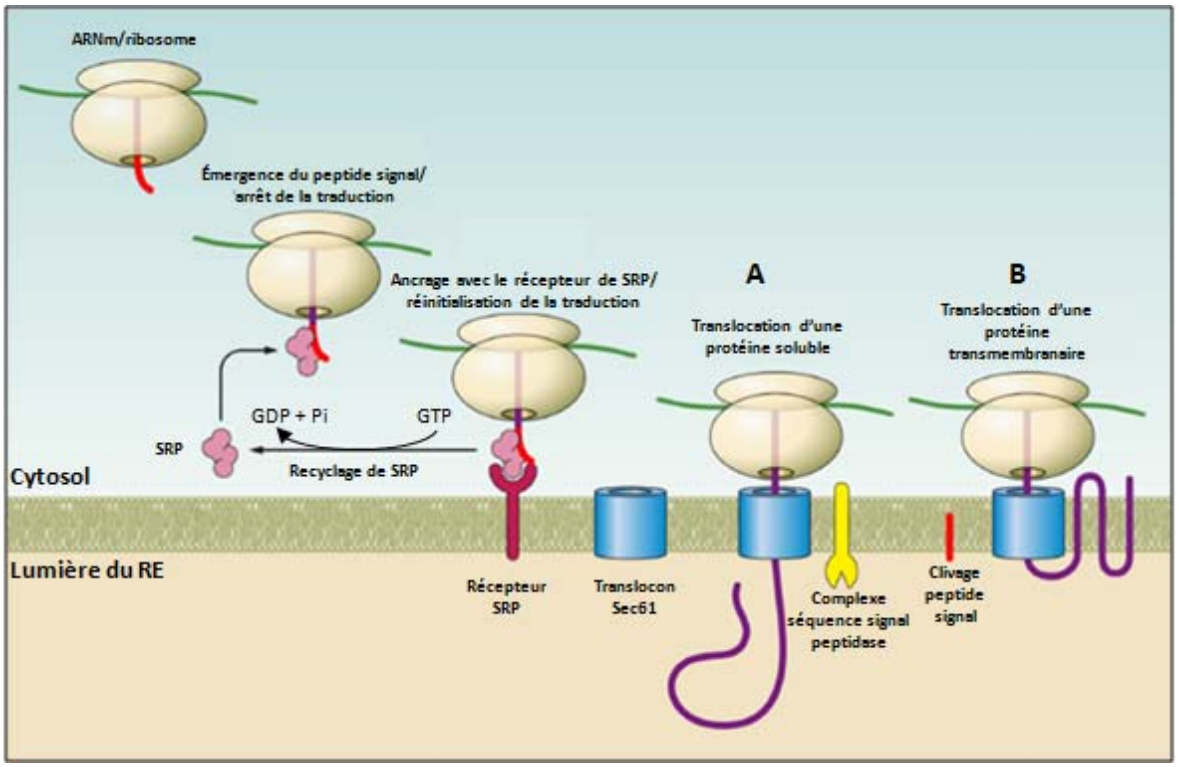


Figure 2: Translocation des protéines dans le RE

Une néo-protéine en cours de synthèse expose une séquence signal d'adressage hydrophobe qui est reconnue par le complexe SRP (Signal Recognition Particule). En liant ce peptide signal, SRP ralentit le processus de traduction et achemine ce complexe au niveau de la membrane du RE pour pouvoir interagir avec son récepteur. Les protéines solubles (A) sont transloquées dans la lumière du RE tandis que dans les protéines transmembranaires (B) sont incorporées dans la membrane du RE après leur passage par le complexe de translocation Sec61. Pour toutes les protéines solubles et certaines protéines transmembranaires, le peptide signal est clivé par des peptidases localisées dans la membrane du RE. Adapté de Guerriero and Brodsky, 2012.

b. Le système de contrôle-qualité des protéines

Dans la lumière du RE, les protéines néosynthétisées interagissent avec différentes protéines chaperonnes ou enzymes de repliement afin d'acquérir leur conformation définitive. Il en existe différentes sortes : les chaperonnes de la famille des heat shock (Grp78 ou BiP (immunoglobulin binding protein), GRP94), les lectines chaperonnes (calréticuline, calnexine), ERp57 ou encore les protéines de la famille des disulfide isomérases (PDI). Comme évoqué précédemment, il existe un système de contrôle qualité de la bonne conformation des protéines qui est connu sous le nom de cycle Calnexine (CNX)/Calréticuline (CRT). Cette machinerie est composée des leptines chaperonnes calréticuline (qui est soluble donc luminale), calnexine (qui est transmembranaire au niveau du RE) et de l'oxydoréductase ERp57 (qui catalyse la formation des ponts disulfures). Ces chaperonnes agissent de concert avec la glucosidase II et une glucosyltranférase qui vont respectivement éliminer ou ajouter un glucose terminal, ce qui aura pour conséquence de stopper ou d'engager l'interaction entre les glycoprotéines mal-conformées et les leptines chaperonnes. Lorsque la protéine a adopté avec succès son repliement final, le glucose restant est éliminé et la protéine est libérée de son interaction avec la chaperonne. Si ce n'est pas le cas, la protéine mal-conformée est re-glycosylée et de nouveau prise en charge par le cycle de repliement. Ce cycle peut se répéter plusieurs fois jusqu'à aboutir soit à l'élimination de la protéine par la voie ERAD/protéasome (ER-Associated Degradation/protéasome), soit à l'adoption de sa conformation définitive. Les protéines correctement conformées sont prises en charge par le transport vésiculaire pour être adressé à l'appareil de Golgi et poursuivre leur cheminement à travers la voie de sécrétion des protéines (Figure 3) (Chevet et al., 2001) (Rutkevich and Williams, 2011). Il est intéressant de mentionner que ces protéines chaperonnes interagissent avec le calcium pour moduler leur activité. En particulier, la calréticuline et la GRP94 qui sont abondantes présentent une grande affinité de liaison pour le calcium stocké dans la lumière du RE (Nakamura et al., 2001) (Coe and Michalak, 2009). Un déficit en calcium serait délétère pour assurer le bon repliement des protéines. De façon étonnante, cette régulation des chaperonnes par le calcium ne se fait pas que dans un sens : les chaperonnes elles-mêmes peuvent également influer sur la $[Ca^{2+}]$ de la lumière du RE. En effet, une surexpression de la calréticuline conduit à une augmentation de la réserve calcique luminale (Bastianutto et al., 1995) tandis que sa déplétion a l'effet contraire (Nakamura et al., 2001). Enfin, la calnexine et la calréticuline peuvent également moduler l'activité de la pompe SERCA et du canal calcique IP_3R, au niveau de la membrane du RE (John et al., 1998) (Roderick et al., 2000). Ces acteurs de l'homéostasie calcique de la lumière du RE seront détaillés un peu plus tard.

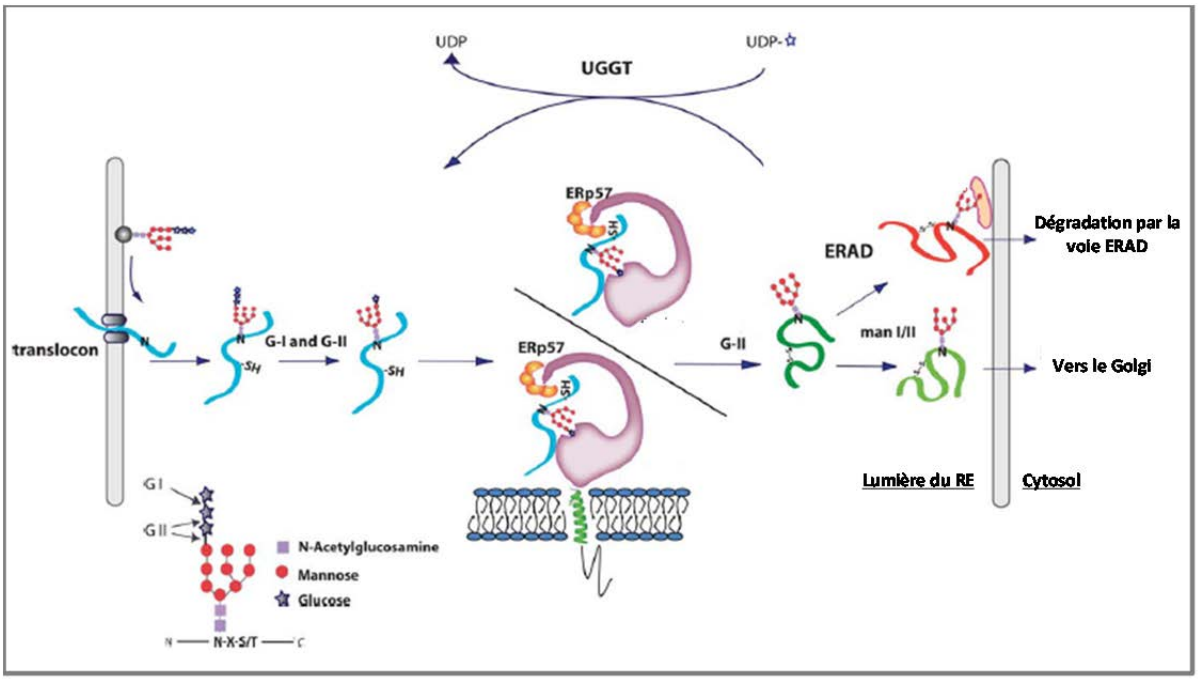


Figure 3: le cycle calnexine/calréticuline

Une fois le transfert d'une unité de polysaccharide sur la protéine néosynthétisée, les glucosidases I et II (G-I and G-II) éliminent 2 glucoses terminaux pour former le substrat qui sera reconnu par la calnexine ou la calréticuline et ERp57 une protéine résidente du RE connue également sous le nom de PDIA3. Après libération par la calnexine/calréticuline, la glucosidase II élimine le dernier glucose restant. Si la néo-protéine a acquis sa conformation finale alors une mannosidase intervient pour éliminer un mannose et permettre ainsi à la protéine parfaitement conformée de quitter la lumière du RE. Si la protéine reste mal conformée, elle est de nouveau glycosylée par l'Uridine diphosphate Glucose: Glycoprotein Transferase (UGGT). Ce senseur de l'état de repliement facilite la réentrée des protéines mal-conformées dans le cycle calnexine/calréticuline. Les protéines qui restent mal repliées peuvent être dirigées vers la voie ERAD. Adapté de Halperin et al., 2014.

3. Homéostasie calcique

Historiquement, le concept de signalisation calcique a été énoncé par Sidney Ringer au début des années 1880, en révélant l'importance du calcium dans le maintien de la contraction cardiaque (Ringer, 1883). L'ion calcium (Ca^{2+}) est un messager intracellulaire crucial qui relaie l'information dans les cellules pour réguler leurs activités. Cette molécule universelle intervient dans le contrôle d'une pléthore de processus cellulaires tels que la prolifération, la transcription, la synthèse protéique, le trafic vésiculaire, le métabolisme mitochondrial, les réponses au stress, l'apoptose ou encore la contraction musculaire (Berridge et al., 2000) (Coe and Michalak, 2009) . Afin de moduler de façon spécifique l'ensemble de ces processus, la concentration calcique ($[Ca^{2+}]$) cytosolique issue à la fois de sources de calcium intra et extracellulaires, doit être finement régulée de façon spatio-temporelle. En effet, au repos la $[Ca^{2+}]$ cytosolique est très faible de l'ordre du micromolaire tandis que celle du milieu extracellulaire ou de la lumière du RE est de l'ordre du millimolaire. Dans la cellule, l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique via l'import d'ions Ca^{2+} du milieu extracellulaire ou via leur relargage de leurs zones de stockage intracellulaire (principalement le RE et la mitochondrie), génère un signal calcique. L'ensemble de ces flux calciques sont médiés par différents acteurs protéiques (canaux calciques, pompe et protéines tampons) tels que la préséniline, les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) et à la ryanodine (RyR) qui assurent la libération des ions calciques du RE vers le cytosol et par la pompe sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) qui favorise l'importation du calcium cytosolique vers la lumière du RE (Figure 4).

Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que le RE est physiquement en contact avec les mitochondries, formant ainsi des mitochondria-associated ER membranes (MAM), et la membrane plasmique. Grâce à ces interactions, la MAM participe à la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire en permettant une transmission sélective des ions Ca^{2+} du RE vers les mitochondries. Ceci intervient notamment dans la régulation des fonctions de cet organite et de la survie des cellules (Marchi et al., 2014) (Area-Gomez, 2014). D'autre part, une diminution du calcium luminal provoque l'activation de senseurs calciques du RE : les Stromal Interaction Molecules (STIM) qui sont conservées chez la drosophile (Soboloff et al., 2012). Les STIM seront alors transloquées à la jonction RE-membrane plasmique afin d'activer des canaux calciques de type store-operated Ca2+ channels (SOCs) tels que le canal ORAI (Stathopulos and Ikura, 2013) dont une isoforme existe chez la mouche. Ces canaux induisent un import sélectif d'ions Ca^{2+} dans la cellule, afin de restaurer l'homéostasie calcique intracellulaire (Figures 5-6). Dans la mesure où je m'intéresse spécifiquement au RE, je décrirais uniquement les acteurs du système calcique qui sont retrouvés dans cet organite.

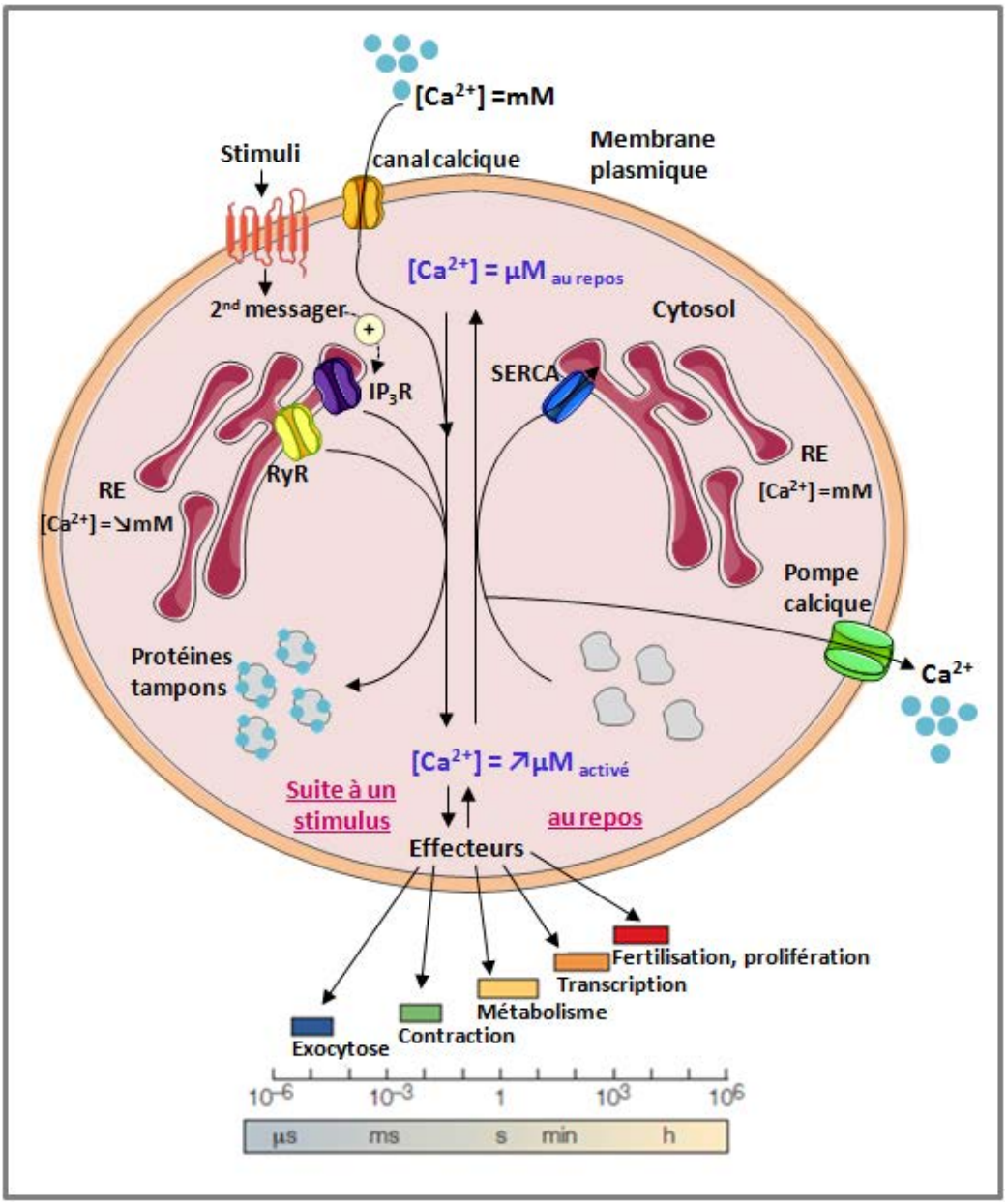


Figure 4 : Dynamique des voies calciques et homéostasie

Un stimulus va induire d'une part l'import de Ca^{2+} extracellulaire au sein de la cellule et d'autre part la libération de seconds messagers qui vont permettre le relargage du calcium stocké dans la lumière du RE via notamment l'IP_3R. Ces évènements conduisent à une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ cytosolique qui est majoritairement régulée via la liaison des ions Ca^{2+} aux protéines tampons cytosoliques, tandis qu'une petite portion calcique se lie à ses effecteurs, afin d'activer de nombreux processus cellulaires régulés temporellement. Au repos, le Ca^{2+} quitte ses effecteurs et protéines tampons pour être éliminé par la cellule via différents canaux et pompes dont la pompe SERCA au niveau de la membrane du RE qui assure l'accumulation du calcium dans la lumière du RE. Adapté de Berridge et al., 2003.

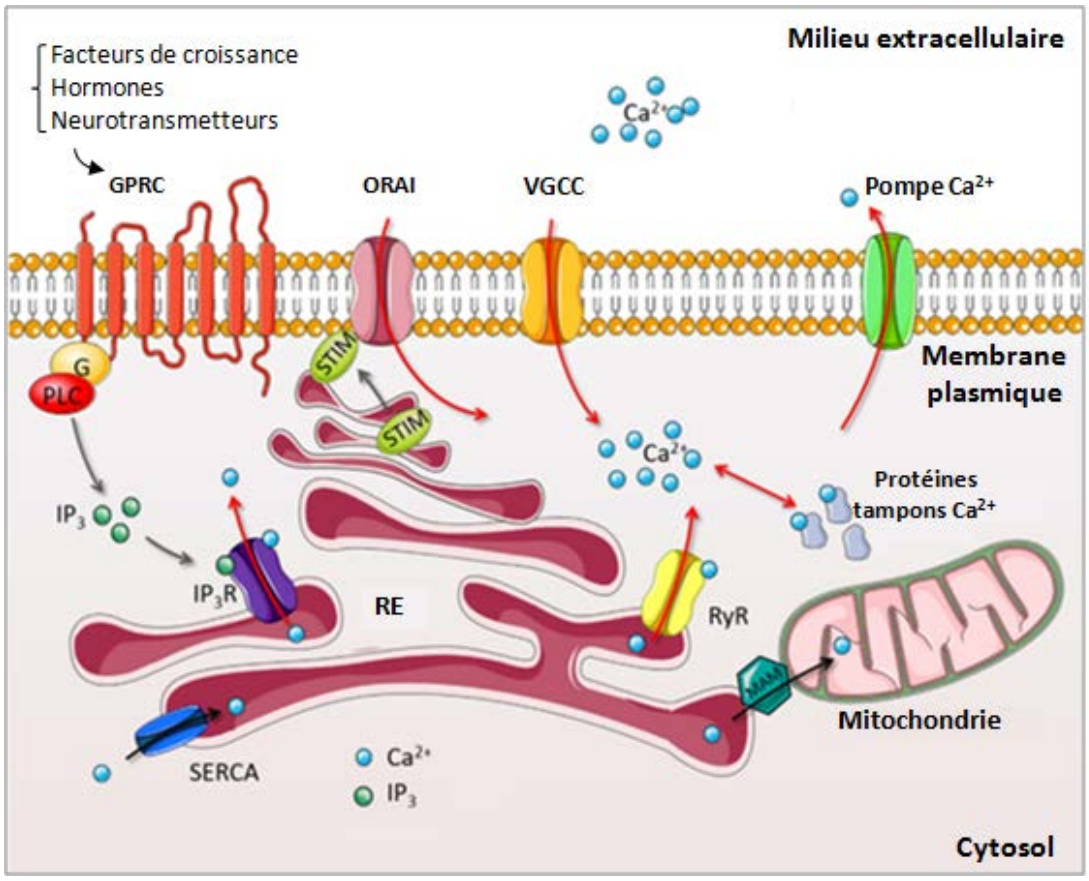


Figure 5 : Signalisation calcique au niveau du RE

La concentration intracellulaire en Ca^{2+} est notamment régulée par des canaux calciques VGCC (voltage-gated Ca^{2+} channel) et des transporteurs au niveau de la membrane plasmique. Le maintien de l'homéostasie calcique cytosolique est régulé d'une part par la liaison des ions Ca^{2+} à des protéines tampons, et d'autre part par le relargage du calcium stocké dans certains organites, essentiellement le RE. Les récepteurs IP_3R et RyR assurent le relargage des ions Ca^{2+} du RE dans le cytosol et à l'inverse, le stockage du Ca^{2+} dans le RE est assuré par la pompe SERCA. L'activation de l'IP_3R nécessite la liaison de l'IP_3, qui est généré par la phospholipase C (PLC) suite à l'activation de récepteurs couplé aux protéines G (G-protein-coupled receptor, GPCR). Une déplétion en Ca^{2+} luminal provenant du RE déclenche un influx calcique *via* les canaux calciques de type SOC (store-operated Ca2+ channels), qui sont principalement retrouvés dans les cellules non excitables. Ces SOC, tel que le canal ORAI, sont situés à la membrane plasmique grâce à une translocation de senseurs calciques du RE : les STIM (Stromal Interaction Molecules) au niveau des jonctions RE-membrane plasmique. Par ailleurs, les ions Ca^{2+} du RE peuvent également être transportés au niveau mitochondrial via l'interaction entre membrane du RE et mitochondrie à des sites appelés mitochondria-associated ER membrane (MAM), afin de stimuler le métabolisme de la mitochondrie. Adapté de Liang et al., 2015.

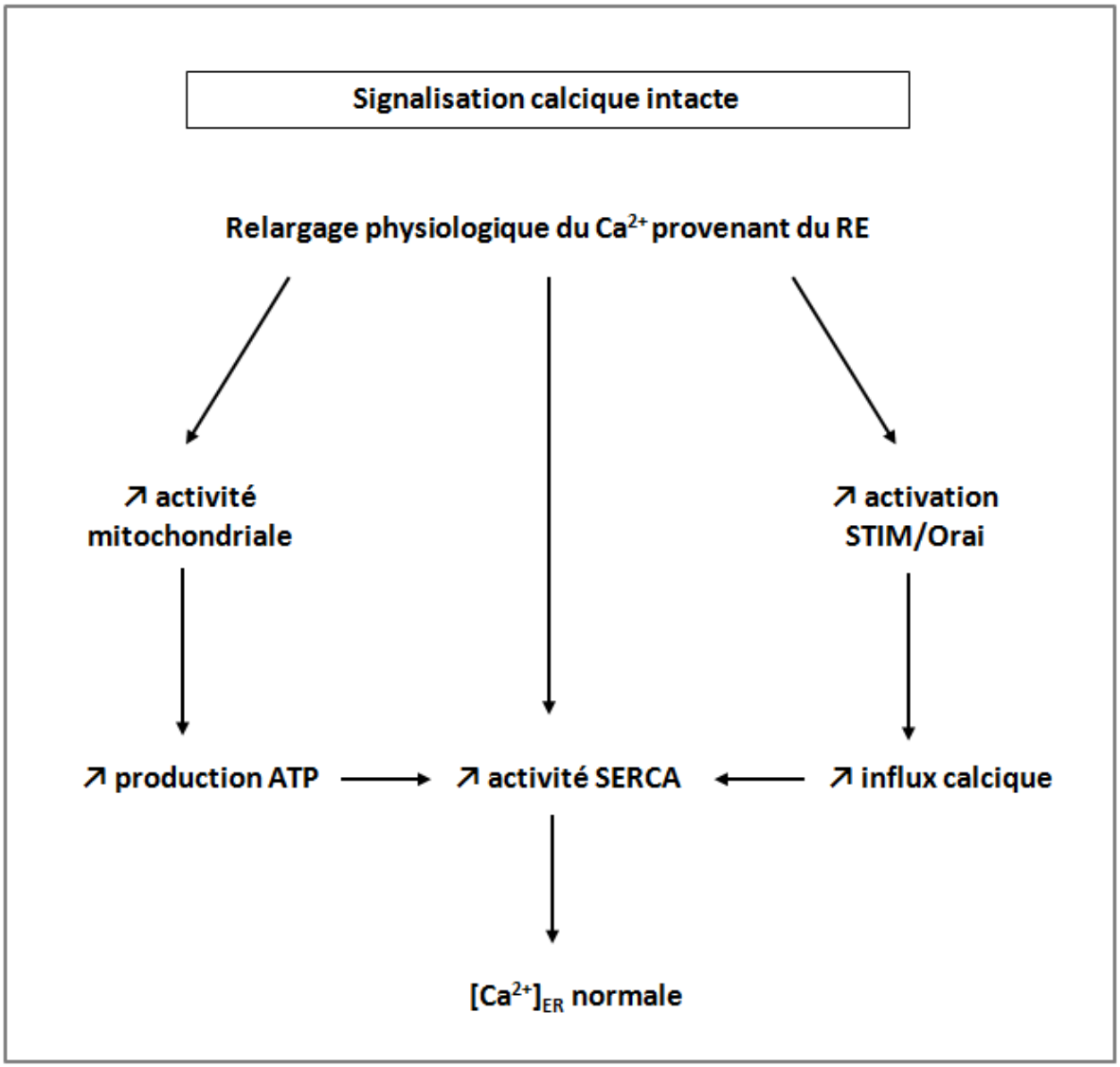


Figure 6 : Maintien d'une $[Ca^{2+}]$ du RE normale

Une étroite coordination entre les mécanismes de relargage et de rechargement du calcium du RE assure une signalisation calcique adéquate en réponse à des stimuli physiologiques. Sous ces conditions, le calcium libéré du RE stimule l'activité et la bioénergétique mitochondriale via les MAM, conduisant à une plus forte production de l'ATP qui est nécessaire au bon fonctionnement de la pompe SERCA. La baisse initiale de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ active les STIM, permettant un influx de calcium issu du milieu extra-cellulaire. Ce calcium est alors recyclé dans la lumière du RE via la pompe SERCA. Ainsi, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ est restaurée et les processus liés au RE sont maintenus. Adapté de Mekahli et al., 2011.

a. Les protéines tampons

De nombreuses protéines tampon sont retrouvées dans le RE. Les oxydoréductases ERp72 et protéine disulfide-isomerase (PDI) jouent ce rôle vis-à-vis du calcium libre dans le compartiment luminal. Des protéines chaperonnes impliquées dans la voie de sécrétion des protéines participent aussi à la régulation de l'homéostasie calcique au sein du RE, telles que la calréticuline, la calnexine, la Binding of immunoglobulin protein (BIP aussi appelée Grp78 ou Grp94 pour glucose-regulated protein 94) (Bravo et al., 2013). La principale caractéristique de ces protéines tampons du RE est leur faible affinité pour le calcium, ce qui permet de maintenir un fort niveau d'ions Ca^{2+} libres dans la lumière de cet organite. Cette spécificité est d'ailleurs ce qui les différencie des protéines chaperonnes cytosoliques qui, à l'inverse, présentent une très forte affinité pour le calcium permettant ainsi de limiter la diffusion des ions Ca^{2+} cytosolique et favoriser ainsi les signaux calciques locaux.

b. Les canaux calciques

(1) IP_3R

L'IP_3R est un des canaux calciques les plus couramment retrouvés à la membrane du RE. Il s'agit d'une protéine tétramérique intégrée dans la membrane du RE, qui transporte le calcium du RE vers le cytosol de la cellule. L'IP_3R peut fixer sur ses 4 sites de liaison un second messager, l'IP3, ce qui permet son ouverture via un changement de conformation. Un seul gène code ce canal chez la drosophile, tandis que chez les mammifères l'IP_3R existe sous 3 isoformes (IP_3R1, IP_3R2 et IP_3R3) qui partagent 60-80% d'identité de séquence (Iwai et al., 2007). Chacune de ces isoformes présente des propriétés et des rôles variables qui diffèrent en fonction de leur régulation, du type cellulaire, et de leur affinité pour le calcium et leur ligand (Hattori et al., 2004) (Iwai et al., 2005) (Taylor and Tovey, 2010). En effet, l'IP_3R2 semble plus sensible à l'IP_3 que l'IP_3R1 et ces deux derniers y semblent plus sensibles que l'IP_3R3 (Iwai et al., 2007). Toutefois, l'IP_3 n'est pas le seul régulateur de l'IP_3R : le calcium intervient également dans la régulation de l'ouverture de ce canal en agissant conjointement avec l'IP3. En effet, une faible quantité de calcium cytosolique augmente la réponse à la fixation de l'IP3 tandis qu'une forte concentration l'inhibe (Taylor and Tovey, 2010). Enfin, l'IP_3R peut aussi être modulé par différentes régulations médiées notamment par l'ATP (Adenosine triphosphate), la préséniline, les groupements thiols, et les phosphorylations (Shah et al., 2015) (Choe and Ehrlich, 2006).

(2) RyR

Le récepteur à la ryanodine (RyR) est un complexe homotétramérique qui comme l'IP3R, forme un canal permettant la sortie du calcium résidant dans la lumière du RE vers le cytosol. Une seule isoforme de RyR existe chez la drosophile, tandis que chez les mammifères, trois RyR présentant plus de 65% de similitude protéique sont identifiés. Ce récepteur et ses différentes isoformes sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires. Leur classification historique situe RyR1 principalement dans les muscles squelettiques, RyR2 est la forme prédominante au niveau du muscle cardiaque et enfin RyR3 est exprimée dans le cerveau (Capes et al., 2011). Le principal activateur de ce canal est le calcium cytosolique pour lequel les différentes isoformes présentent également des affinités variables. Comme pour l'IP_3R, une faible concentration en ions Ca^{2+} cytosolique active l'ouverture du canal RyR. A l'inverse, lorsque cette concentration est trop importante le canal se ferme (Meissner, 1986). RyR peut également être régulé positivement par l'ATP, la PKC (Phospho kinase C), la calmoduline et la préséniline (Lanner et al., 2010).

c. La pompe SERCA

Actuellement, le seul mécanisme connu comme étant responsable de l'accumulation des ions Ca^{2+} dans le RE est un transport actif via la pompe SERCA dont l'activité est ATP-dépendante (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Cette protéine ubiquitaire est localisée à la membrane du RE et appartient à la famille des ATPases de type P. Elle transporte deux ions calcium en échange de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, permettant ainsi de générer un gradient calcique entre le cytosol et le RE (Guerrero-Hernandez et al., 2010). Ceci assure l'établissement et le maintien d'une réserve calcique dans la lumière du RE. D'un point de vue évolutif, cette ATPase est conservée aussi bien sur le plan structurel que fonctionnel. Chez les vertébrés, il existe trois gènes (ATP_2A_1, ATP_2A_2 et ATP_2A_3) codant pour les différentes pompes SERCA1, SERCA2 et SERCA3 et dont l'épissage alternatif de leur région 3' permet de générer au moins 11 isoformes (Brini and Carafoli, 2009). Cet épissage alternatif semble être régulé au cours du développement, il est également spécifique suivant le tissu et peut aussi être modulé au cours de la différenciation cellulaire. Chez les invertébrés, il n'y a qu'un gène codant la pompe SERCA qui se trouve être l'orthologue de SERCA2 chez les vertébrés. Enfin, ces différentes isoformes sont activées lorsque la concentration calcique luminale du RE est faible et peuvent également être régulées par la calréticuline (John et al., 1998) et la préséniline (Green et al., 2008).

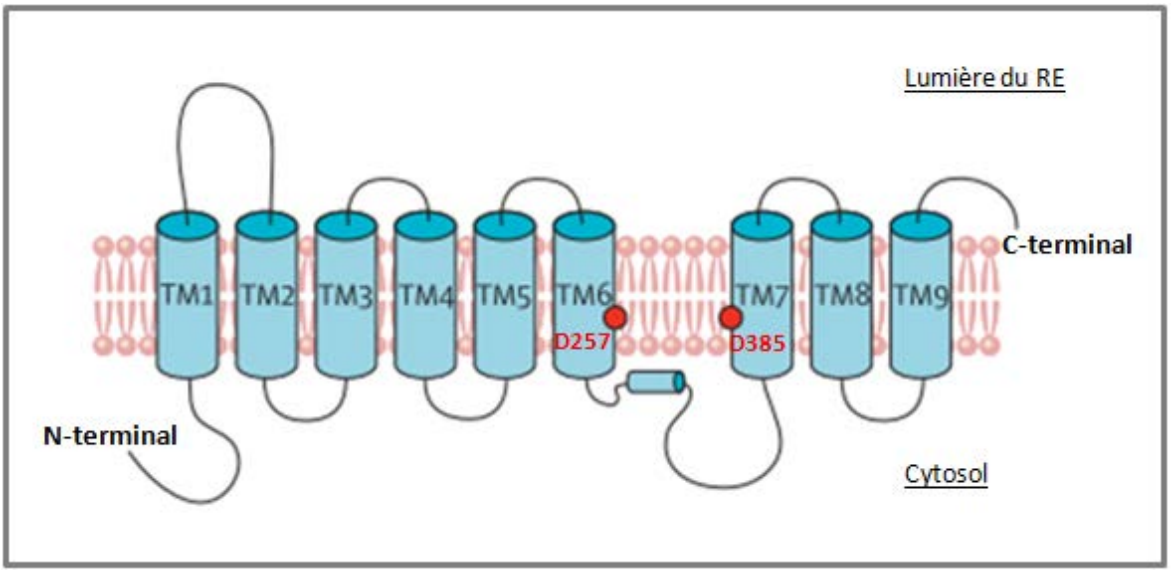


Figure 7 : Structure de préséniline 1 (PS1) de mammifère

PS1 est une protéine membranaire composée de 9 domaines transmembranaires (TM1-9). TM6 et TM7 possèdent des sites catalytiques, présentant respectivement les résidus aspartiques D257 et D385 (points rouges), qui sont nécessaires à l'activité protéasique du complexe γ-sécrétase. Adapté de Bergmans and De Strooper, 2010.

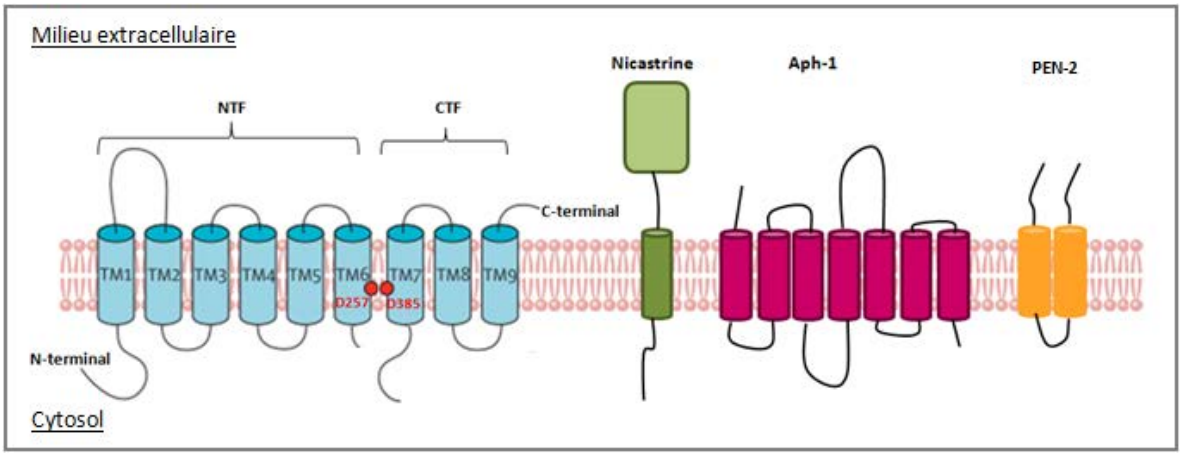


Figure 8 : Les sous-unités du complexe protéique γ-sécrétase et leur topologie membranaire

Le complexe γ-sécrétase est constitué de l'hétérodimère NTF/CTF qui porte l'activité protéasique *via* ses résidus aspartiques, de la nicastrine, d'Aph-1 (Anterior pharynx defective-1) et de Pen-2 (Presenilin ENhancer-2). Adapté de De Strooper et al., 2012.

d. La préséniline

On doit la découverte de la Préséniline (PS) aux travaux de Sherrington en 1995 qui a révélé que des mutations faux-sens dans le gène codant la PS1 (Presenilin 1) conduisaient à l'apparition d'une forme familiale précoce de la maladie d'Alzheimer (AD) (Sherrington et al., 1995). Chez les mammifères, il existe deux formes protéiques (partageant 67% de similitude protéique) : PS1 et PS2 qui sont toutes les deux synthétisées sous forme d'un précurseur protéique de 50 kDa (aussi appelé forme holoprotéique) et possédant 9 domaines transmembranaires. La préséniline appartient à une famille protéique membranaire hautement conservée au cours de l'évolution (Brunkan and Goate, 2005) qui est donc également présente chez la drosophile. Chez la mouche, elle est codée par un unique gène *Psn*, dont le produit partage 53% d'identité de séquence avec les formes humaines (Boulianne et al., 1997). Elle est exprimée dans de nombreux tissus tels que le cerveau, le cœur, les muscles ou encore les reins (Lee et al., 1996). A ce jour, 185 mutations de *PS1* et 13 mutations de *PS2* ont été identifiées chez les patients atteints d'AD (Cruts et al., 2012). De façon intéressante, certaines mutations aussi bien dans *PS1* que dans *PS2* sont associées à une dérégulation des voies calciques de la cellule. Par ailleurs, il est important de mentionner que la préséniline est synthétisée et principalement localisée au niveau de la membrane du RE, parfois retrouvée dans l'appareil de Golgi , et une petite fraction est située au niveau de la membrane plasmique, une fois son transit à travers la voie de sécrétion des protéines achevé (Brunkan and Goate, 2005)(Walter et al., 1996)(Kim et al., 2000). Généralement, la forme holoprotéique de 50 kDa est inactive et est rapidement éliminée par la voie de dégradation du protéasome (Kim et al., 1997). En réalité, en condition physiologique, l'obtention d'une forme active de PS1 (ou de PS2) nécessite lors de sa maturation dans le RE, un clivage endoprotéolitique entre ses domaines transmembranaires (TM) 6 et 7, afin d'éliminer une large boucle hydrophobe cytosolique située entre ces deux domaines et surtout afin de générer deux fragments : un fragment N-terminal (NTF) de 30 kDa et un fragment C-terminal (CTF) de 20 kDa. PS1 et PS2 régulent elles-mêmes ce clivage grâce à ces sites catalytiques qui présentent chacun des résidus aspartiques (Wolfe et al., 1999) (Figure 7). A la suite de cette endoprotéolyse, ces deux fragments restent liés l'un à l'autre et forme un hétérodimère NTF/CTF actif, bien plus stable que la forme entière (Thinakaran et al., 1996).

(1) Fonction protéasique dépendante de l'activité γ-sécrétase

Pour assurer pleinement sa fonction de protéase, la forme holoprotéique de préséniline 1 ou 2 doit s'associer à d'autres partenaires protéiques : Nct (nicastrin), Aph-1 (anterior pharynx defective-1) et PEN-2 (Presenilin ENhancer-2) afin de former un complexe intramembranaire mature possédant une

activité γ-sécrétase (Figure 8). Ce complexe est conservé au cours de l'évolution et est présent chez la drosophile (Dries and Yu, 2008) (Stempfle et al., 2010). L'ensemble de ces composants sont

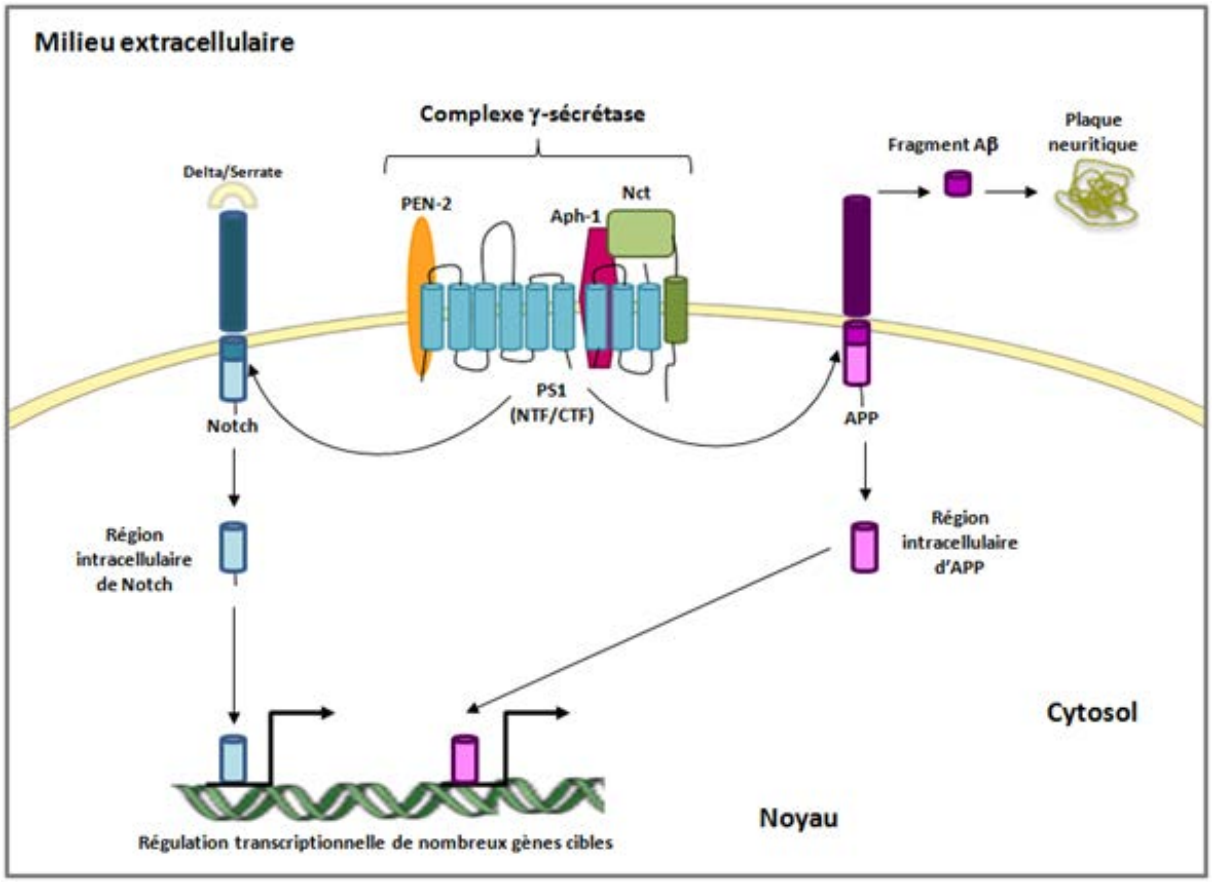


Figure 9 : Fonctions de PS1 dépendante de son activité γ-sécrétase

Notch est un récepteur transmembranaire. Sa liaison à un de ses ligands (Delta ou Serrate) provoque un premier clivage au niveau de son domaine extracellulaire. Le fragment transmembranaire intracellulaire qui en résulte subit à son tour un clivage protéolytique médié par la γ-sécrétase. Ce clivage libère sa région intracellulaire qui va jouer un rôle de facteur de transcription au niveau du noyau.
La γ-sécrétase intervient également dans le clivage du domaine transmembranaire d'APP pour générer des fragments Aβ dont l'accumulation conduit à la formation de plaques neuritiques qui sont caractéristiques des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. D'autre part, cette protéolyse permet de libérer le fragment intracellulaire d'APP. Ce dernier possèderait une activité transactivatrice (Zhang *et a*l. 2014 revue). Adapté de Zhang et al., 2013.

synthétisés au niveau du RE et associés de façon coordonnée. En effet, Nct se lie à Aph-1 dans le RE pour former un hétérodimère stable, dit complexe d'échafaudage, qui se lie par la suite au domaine C-terminal de la forme holoprotéique de PS1 toujours dans le RE. Ce trimère formé via le domaine TM4 de PS1 peut ensuite interagir avec la protéine PEN-2. L'ultime étape de maturation du complexe γ-sécrétase se produit au cours de la formation des fragments NTF/CTF suite à un évènement d'endoprotéolyse entre les TM6 et TM7 de PS1. L'assemblage de ces 4 éléments masque les séquences signal de rétention dans le RE, ce qui autorise la sortie du complexe afin de permettre son transit vers l'appareil de Golgi. Ce complexe γ-sécrétase est alors mature et actif. Il cycle dans 95% des cas entre le RE et l'appareil de Golgi tandis que seulement 5 % du complexe est transporté à la membrane plasmique (Dries and Yu, 2008).

Chez les mammifères, ce complexe possède plus de 80 cibles (Haapasalo and Kovacs, 2011), incluant les E-cadhérines (Marambaud et al., 2002), N-cadhérines (Marambaud et al., 2003), CD44 (Lammich et al., 2002) APP et Notch (Zhang et al., 2000b). Les substrats les mieux caractérisés dans la littérature sont APP (β-Amyloïde precursor protein, qui possède un orthologue chez la drosophile : dAPPI) pour son rôle dans la maladie d'Alzheimer, et Notch pour son importance dans le développement et la détermination du destin cellulaire aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Figure 9).

Il est intéressant de noter que la seule surexpression de PS1 ou PS2, *in vitro* dans des modèles cellulaires, ne suffit pas à augmenter le niveau d'activité du complexe γ-sécrétase (Refolo et al., 1999)(Kimberly et al., 2003). Ceci semble indiquer que la sous-unité PS1/2, bien qu'essentielle pour sa fonction protéasique, n'est pas limitante pour l'activité du complexe γ-sécrétase. En revanche, l'efficacité de ce dernier serait assuré par la formation d'un complexe actif qui nécessiterait l'expression de l'ensemble des composants de ce complexe Nct, Aph-1 et PEN-2 (Edbauer et al., 2003)(Takasugi et al., 2003). Toutefois, une étude récente parue en 2011, s'oppose à ces résultats en rapportant *in vivo* dans un modèle murin que la surexpression d'une forme sauvage ou mutante de *PS1* humaine serait suffisante pour élever le niveau de Nct et PEN-2 en culture cellulaire et par voie de conséquence augmenterait le niveau d'activité de la γ-sécrétase (Li et al., 2011).

(2) Fonction calcique indépendante de l'activité γ-sécrétase

Comme évoqué précédemment, de plus en plus de travaux suggèrent que la préséniline prend part dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire et ceci indépendamment de son activité γ-sécrétase. C'est en 1994, que pour la première fois, une équipe a montré sur des fibroblastes humains (issus de certains membres asymptomatiques d'une famille atteinte de la maladie

d'Alzheimer) qu'une mutation de PS augmentait le relargage du calcium du RE (Ito et al., 1994). Ces données ont ensuite été confirmées dans différents modèles d'études incluant ovocytes de xénope (Leissring et al., 1999), cultures primaires de neurones (Chan et al., 2000) et coupes de cerveaux adultes dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer (Stutzmann et al., 2004). Plusieurs mécanismes, que je développe brièvement ci-dessous, ont été proposés pour expliquer cette régulation du flux calcique par la préséniline.

- *La préséniline agit comme un canal calcique de fuite*

La forme holoprotéique de PS peut constituer un canal de fuite calcique. En effet, l'étude d'un double knockout pour PS1 et PS2 dans des fibroblastes embryonnaires de souris induit un déficit calcique du RE qui peut être restauré par l'expression de PS1 ou PS2 sauvage et ceci indépendamment de leur activité γ-sécrétase (Tu et al., 2006). A l'opposé, d'autres mutants de PS associés à la maladie d'Alzheimer sont décrits comme perturbant ou supprimant cette activité de canal de fuite provoquant alors une accumulation du calcium dans la lumière du RE (Nelson et al., 2007). De façon intéressante, grâce à leur caractère hydrophile, les domaines TM7 et TM9 de PS semblent responsables de cette propriété de conductance des ions Ca^{2+} (Tu et al., 2006) (Nelson et al., 2011). Il existe cependant quelques récentes études qui remettent en question cette théorie du canal calcique de fuite, en démontrant que d'autres formes mutées de PS associées à la maladie d'Alzheimer ne conduisent à aucun changement de la concentration calcique dans le RE en mesurant directement la quantité de calcium luminal (Cheung et al., 2008) (Brunello et al., 2009) (Shilling et al., 2012).Potentiellement, ces formes mutantes n'affectent que leur activité protéasique et non leur activité canal de PS, ce qui pourrait expliquer cette différence.

- *La préséniline module l'activité du récepteur à la ryanodine (RyR)*

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de RyR ainsi que de son activité calcique dans des cellules exprimant une forme mutée de PS (Chan et al., 2000)(Stutzmann et al., 2007)(Zhang et al., 2010). D'ailleurs, une étude a montré que PS1 interagit physiquement avec RyR, ce qui lui permettrait de moduler l'amplitude d'ouverture de ce canal et donc de réguler indirectement la signalisation calcique intracellulaire (Rybalchenko et al., 2008).

- *La préséniline module l'activité du récepteur IP_3R*

Similairement au récepteur de la ryanodine, une forme mutée holoprotéique de PS associée à la maladie d'Alzheimer peut interagir physiquement et fonctionnellement avec le canal IP_3R afin de potentialiser son activité, en augmentant la durée et la probabilité d'ouverture de ce dernier. La

conséquence directe de cette interaction montrée dans des modèles cellulaires murins et humains est un relargage massif de Ca^{2+} de RE vers le cytosol (Cheung et al., 2008)(Cheung et al., 2010).

- *La préséniline améliore l'activité de la pompe SERCA*

La PS pourrait également réguler l'homéostasie calcique en modulant positivement l'activité de la pompe SERCA via une interaction physique (Green et al., 2008). En effet, la surexpression de PS1 et PS2 aussi bien sauvages que mutés au niveau de son activité protéasique peut stimuler l'activité de SERCA et conduire à un engorgement calcique dans la lumière du RE. Cette interaction est d'autant plus intéressante qu'elle est accrue et confère une résistance au stress en favorisant le maintien de l'homéostasie calcique après un stress du RE induit par un traitement à la tunicamycine ou à la staurosporine (Corsi and Schekman, 1996). Toutefois, il existe une étude qui présente des données opposées et qui montre que les formes sauvage ou mutée de PS2 peuvent réduire l'activité de SERCA (Brunello et al., 2009). Ces conclusions opposées peuvent s'expliquer par des modèles cellulaires différents et l'implication d'autres mécanismes encore inconnus à ce jour.

En conclusion, au-delà de ses actions connues via son activité γ-sécrétase, la préséniline joue également un rôle important, à différents niveaux, dans la régulation de l'homéostasie calcique du RE. Comme évoqué précédemment, ce maintien des concentrations calciques du RE est indispensable au bon fonctionnement des acteurs qui assurent la synthèse, la maturation et le transport des protéines néosynthétisées.

C. Stress RE et réponses adaptatives

Différents changements physiologiques (mutations, hypoxie, infection virale, stress oxydant, carence nutritive) peuvent affecter les fonctions du RE (synthèse lipidique, maturation et conformation des protéines, homéostasie calcique) conduisant ainsi à l'accumulation de protéines mal-conformées dans la lumière de cet organite. Ce phénomène a pour conséquence d'interférer avec le fonctionnement normal du RE et peut s'avérer délétère pour la survie de la cellule dans certain cas. Face à ces changements communément décrits comme étant sources de stress du RE, la cellule a développé des systèmes permettant de détecter, éliminer et éviter l'accumulation de nouvelles protéines mal-conformées.

Un de ces systèmes est la voie de l'ER-associated protein degradation (ERAD) (Meusser et al., 2005) dont l'activité est stimulée en condition de stress cellulaire. Ce complexe ancré dans la membrane du RE permet l'élimination des protéines mal ou non-conformées via leur rétrotranslocation du RE vers le cytosol où elles seront dégradées par le système ubiquitine-protéasome (Figure 10).

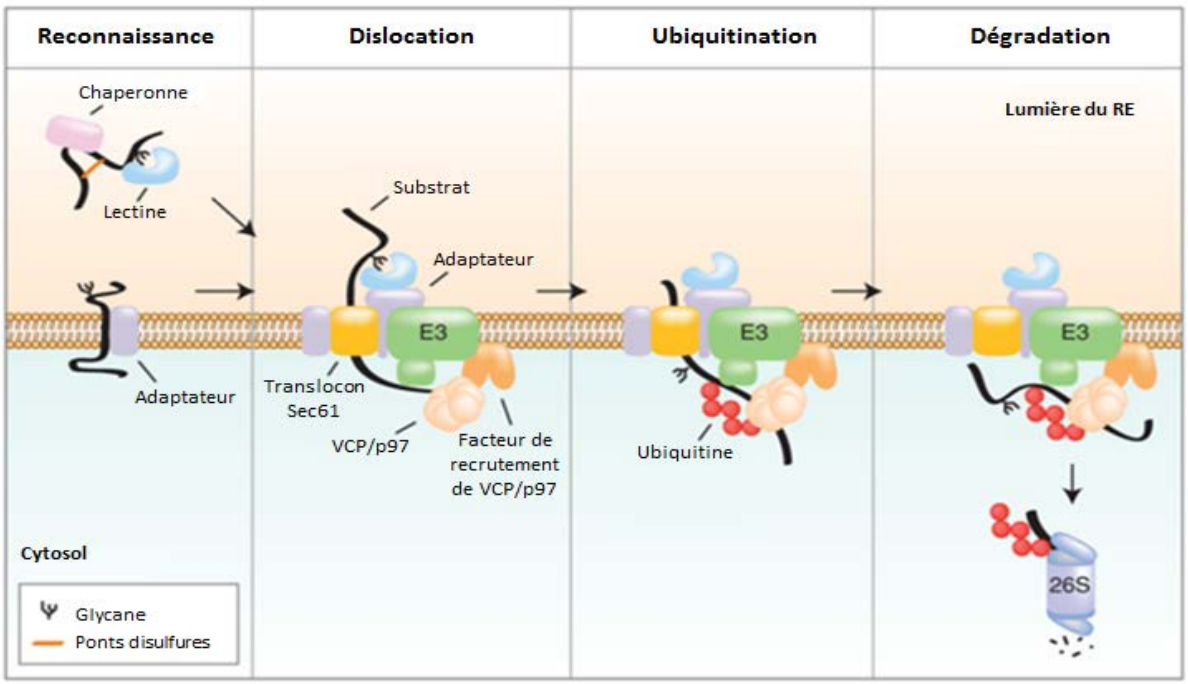


Figure 10 : Les étapes clés de l'ERAD

L'ERAD s'exécute à travers une série d'étapes ordonnées au cours du temps qui inclut : étape 1 – une reconnaissance : les chaperonnes et lectines localisées dans la lumière du RE interagissent avec les éléments mal repliés. Ces facteurs lient leurs substrats et les orientent vers la machinerie de dislocation qui est ancrée dans la membrane du RE. Étape 2 – la dislocation : les substrats sont disloqués à travers la bicouche du RE grâce au translocon (pore de dislocation) qui est couplé à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP via VCP/p97. Étape 3 – l'ubiquitination : une fois les substrats transloqués dans le cytosol, ils sont polyubiquitinylés par une enzyme E3 ligase. Etape 4 – la dégradation : les substrats ubiquitinylés sont dégradés par le protéasome et sa sous-unité 26S. Adapté de Olzmann et al., 2013.

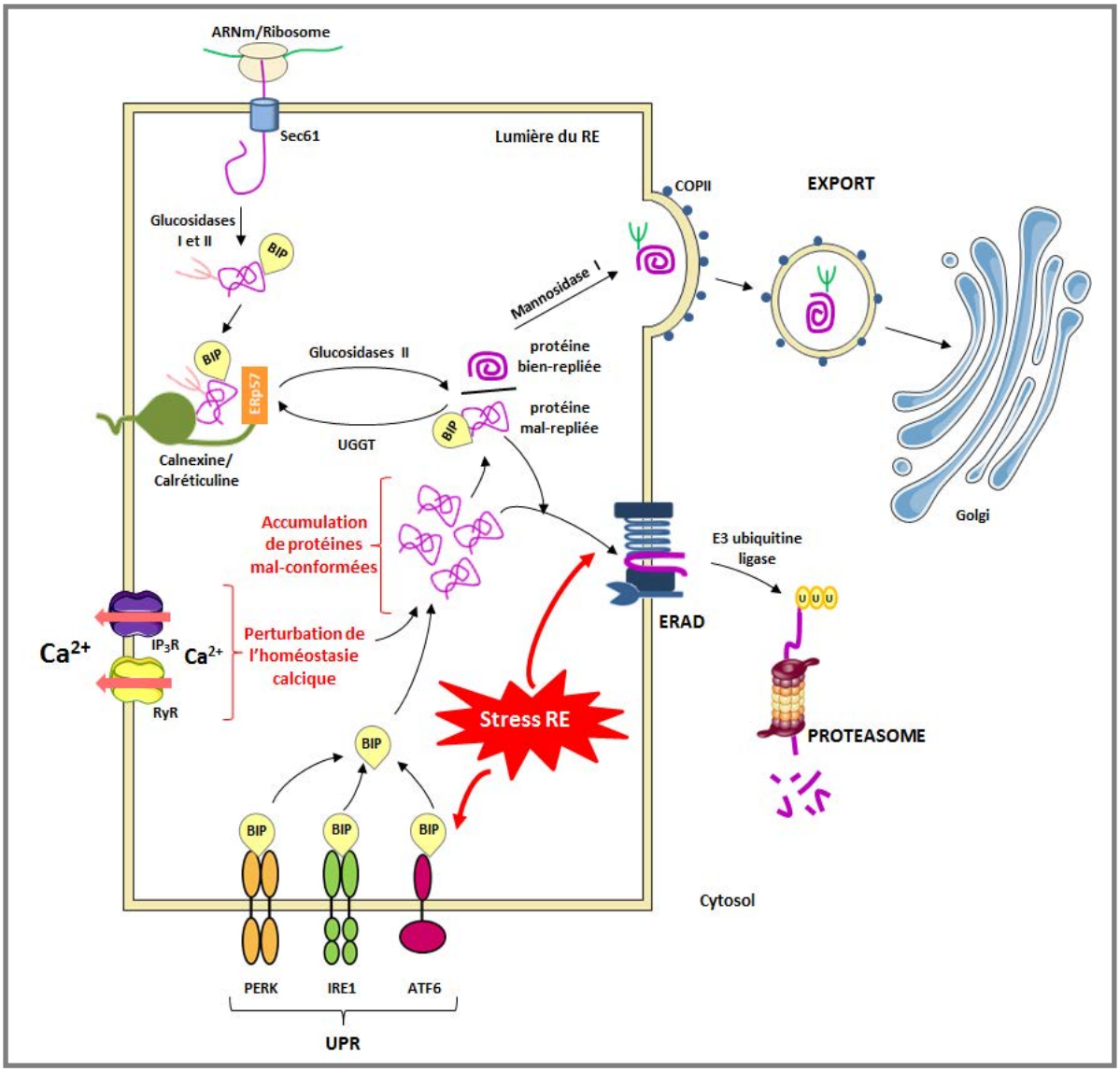


Figure 11 : Schéma bilan des différents acteurs du RE

1) Dans le RE les protéines naissantes non conformées interagissent avec différentes chaperonnes (dont BIP et calnexine/calréticuline) afin d'acquérir leur conformation finale. En plus d'assurer cette fonction, l'interaction de ce système de repliement des protéines (cycle calnexine/calréticuline) avec ses substrats, permet également d'isoler et de diminuer le risque d'agrégation des protéines entre elles, dont la concentration est particulièrement élevée dans ce compartiment. 2) A l'issu de ce cycle, si la protéine a bien adopté sa conformation finale alors cette dernière est prise en charge par les vésicules de transport pour être envoyée à l'appareil de Golgi. 3) Dans le cas contraire, la protéine toujours mal-conformée peut enchainer sur un nouveau cycle de repliement. 4) Si la protéine n'acquière pas sa conformation optimale, elle peut être adressée au système ER-associated protein dégradation (ERAD) pour être éliminée via le protéasome. 5) Dans certaines conditions, l'accumulation de protéines mal-conformées et/ou une perturbation de l'homéostasie calcique du RE par exemples, peuvent déclencher un stress du RE qui va augmenter l'activité de la voie ERAD et/ou induire l'Unfolded Protein Response (UPR) afin de rétablir son homéostasie.

Par cette action, l'ERAD contribue au maintien de l'homéostasie du RE en restaurant la capacité de conformation des systèmes de repliement des protéines. Ce processus est conservé au cours de l'évolution et est principalement décrit chez la levure et les mammifères (Ruggiano et al., 2014). D'ailleurs, la chaperonne Valosin-containing protein (VCP ou p97) est essentielle pour la dégradation protéique associée au RE (Wang et al., 2004). et possède un orthologue chez la drosophile ter94 (Lundgren et al., 2005). Je n'évoque que très brièvement ce processus car au cours de ma thèse je me suis surtout intéressée à un autre mécanisme de maintien de l'homéostasie du RE. Il s'agit d'une réponse adaptative connue sous le nom d'Unfolded Protein Response (UPR).

L'UPR est conservée au cours de l'évolution et très bien décrite chez la levure, les mammifères et plus récemment chez la drosophile (Ryoo and Steller, 2007) (Wu et al., 2014). Elle est composée de 3 branches qui fonctionnent en parallèle et qui utilisent chacune leur propre voie de signalisation. Ces différentes branches sont désignées par le senseur de stress situé au niveau de la membrane du RE qui leur est spécifique : IRE1 (Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase) et ATF6 (Activating Transcription Factor 6) (Figure 11).

1. L'UPR

a. L'UPR et ses senseurs canoniques

(1) La branche IRE1

IRE1 est une protéine transmembranaire résidente du RE qui présente à la fois un domaine luminal de dimérisation, une activité Sérine/Thréonine kinase et une activité endoribonucléase au niveau de son domaine cytosolique C-terminal (Tirasophon et al., 1998). Il s'agit de la branche de l'UPR la mieux étudiée et la plus conservée. Ire1p est d'ailleurs le seul senseur de stress du RE existant chez la levure. Chez les mammifères, il existe deux homologues d'Ire1p : IRE1α et IRE1β qui partagent des similitudes structurales mais présentent des fonctions différentes. En effet, IRE1α, qui est exprimée de façon ubiquitaire, contrôle son expression en clivant son propre ARNm (Tirasophon et al., 2000). Treize autres de ses cibles ont récemment été identifiées (Oikawa et al., 2010). IRE1β, qui est uniquement retrouvée dans les cellules épithéliales intestinales (Urano et al., 2000), intervient dans le clivage site-spécifique de l'ARNr 28S, ce qui contribue à la diminution du niveau de traduction générale (Tirasophon et al., 1998) (Iwawaki et al., 2001). Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul homologue d'Ire1p appelé IRE1 (Plongthongkum et al., 2007) et les individus mutants pour IRE1 ne survivent pas au-delà du premier stade larvaire (Ryoo et al., 2013).

La forme monomérique d'IRE1 est inactive. Son activation survient à la suite d'un changement conformationnel induit par une dimérisation des monomères. Ce processus permet

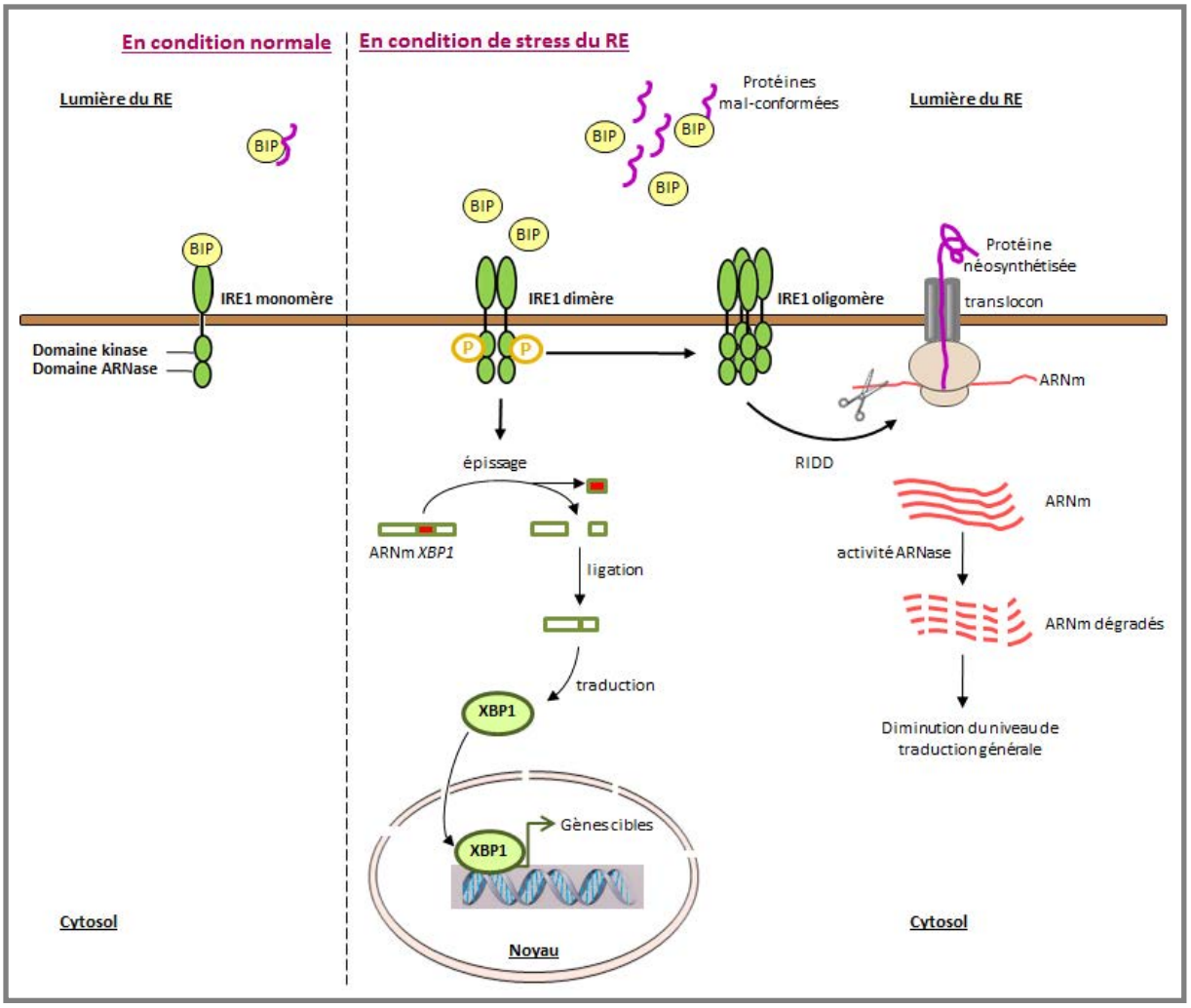


Figure 12 : La branche IRE1 de l'UPR

Grâce à son activité endoribonucléase (1), IRE1 catalyse l'épissage non conventionnel de l'ARNm *XBP1*, ce qui permet de générer le facteur de transcription XBP1 qui activera ses cibles transcriptionnelles dans le compartiment nucléaire afin de résoudre le stress du RE. IRE1 peut également directement dégrader les ARNm localisés à la membrane du RE, toujours grâce à son activité ARNase (2). On parle de mécanisme RIDD (Regulated Ire1 Dependent Decay pathway) qui permet de réduire la quantité de protéines importées dans la lumière du RE.

l'autophosphorylation des domaines kinases ce qui induit l'activité endoribonucléase au niveau du domaine ARNase cytosolique de la protéine (Tirasophon et al., 2000). Une fois activée, IRE1 peut agir de deux façons indépendantes qui sont également conservées chez la drosophile. La première, en induisant un épissage non conventionnel de l'ARNm *XBP1* cytosolique (Yoshida et al., 2001) et/ou nucléaire suivant sa structure (Wang et al., 2015b). Ainsi, l'élimination d'un intron d'une vingtaine de nucléotides, provoque un décalage du cadre de lecture lors de la traduction, ce qui va introduire un nouveau domaine carboxyle dans la protéine XBP1. Cet évènement permet la synthèse d'une forme active du facteur de transcription XBP1 qui comporte une séquence signal d'adressage au compartiment nucléaire, un domaine d'activation transcriptionnelle ainsi qu'un domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN bZIP (basic-leucine zipper motif). Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes cibles en se fixant sur des séquences promotrices spécifiques bien décrites chez les mammifères (Yamamoto et al., 2004). Ces cibles transcriptionnelles sont impliquées dans différents mécanismes tels que la synthèse protéique du RE, le repliement, la glycosylation, le système ERAD, l'autophagie, la biogenèse de lipide ou encore le trafic vésiculaire (Walter and Ron, 2011). D'autre part, l'activité nucléase d'IRE1 en condition de stress, sous forme d'oligomère, est également décrite comme induisant un processus nommé Regulated IRE1-dependent Decay (RIDD). Ce RIDD consiste en la dégradation des ARNm directement localisés à la membrane du RE et ne présentant pas de peptide signal, aussi bien chez les mammifères (Hollien et al., 2009) que chez la drosophile (Hollien and Weissman, 2006) (Gaddam et al., 2013). Ce processus permet d'inhiber la synthèse de certaines protéines et contribue à réduire la quantité de protéines importées dans la lumière du RE (Hollien, 2013) (Figure 12). Des mutations dans le gène *Xbp1* sont létales à l'état larvaire (Souid et al., 2007). Néanmoins, le rôle spécifique de XBP1 au cours du développement normal de la mouche n'est pas complètement compris.

Il est intéressant de mentionner que cette branche possède une boucle de rétrocontrôle positif médiée d'une part, *via* une cible transcriptionnelle de XBP1 : *IRAK2 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-2)*, appartenant à une famille de gènes conservés au cours de l'évolution (homologues chez la drosophile : *Tube* et *Pelle*). Cette kinase, en agissant comme un adaptateur entre IRE1 et l'ARNm XBP1, renforcerait l'épissage de ce dernier ce qui contribuerait à amplifier l'activité de cette branche de l'UPR (Benosman et al., 2013) . D'autre part, l'ARNm *XBP1* non épissé produit une protéine XBP1u (unspliced XBP1) incapable de transactiver ses cibles mais qui semble néanmoins faciliter l'adressage des ARNm codant *XBP1* à la membrane du RE pour qu'ils subissent leur épissage (Yanagitani et al., 2009) (Coelho et al., 2014). Enfin, cette protéine XBP1u est également décrite comme intervenant dans un rétrocontrôle négatif de la voie mais cette fois en piégeant et en adressant XBP1 au protéasome afin de promouvoir sa dégradation (Yoshida et al., 2006).

(2) La branche PERK

En parallèle de la branche IRE1/XBP1, la kinase transmembranaire PERK, dont l'expression est ubiquitaire, est également activée en réponse au stress du RE. Ce senseur se dimérise et s'autotransphosphoryle afin d'activer sa fonction kinase localisée dans son domaine cytosolique et ainsi phosphoryler eIF2α, un facteur d'initiation de la traduction (eukaryotic translation initiation Factor-2α) (Harding et al., 1999) (Zhang et al., 2002) (Ron and Walter, 2007). Cet évènement a pour conséquence de réduire le niveau global de la traduction générale de la cellule. En effet, le rôle normal d'eIF2α est d'aider la sous-unité ribosomique 40S à charger l'ARNt initiateur portant l'acide aminé méthionine, essentiel pour l'initiation de ce processus. La phosphorylation inhibitrice d'eIF2α *via* PERK diminue le taux global d'initiation de la traduction. Cet effet sur la traduction affecte de manière opposée la synthèse de certaines protéines. Ainsi, la phosphorylation d'eIF2α accroit la synthèse de protéines spécifiques dont le facteur de transcription ATF4 (Activating Transcription Factor 4) (Figure 13). Ce processus spécifique est possible grâce à la présence de nombreuses petites phases ouvertes de lecture (upstream Open Reading Frames (uORF) dans la région 5' UTR (UnTranslated Region) d'ATF4. En réalité, la dernière uORF chevauche celle d'ATF4 dans un autre cadre de lecture, ce qui a pour conséquence d'inhiber la traduction d'ATF4 dans les cellules non stressées. Par contre, la phosphorylation d'eIF2α en condition de stress, diminue sa probabilité de fixer cette dernière ORF, ce qui permet la traduction de l'ORF codant ATF4 (Harding et al., 2000) (Figure 14). Une fois synthétisé, ce facteur de transcription à domaine bZIP induit l'expression de nombreuses cibles impliquées dans la réponse au stress. Il est intéressant de noter qu'eIF2α n'est pas le seul substrat de PERK. En effet, le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like2), qui est impliqué dans la réponse au stress oxydant, est normalement maintenu dans le cytoplasme grâce son association avec Keap1. En condition de stress, PERK phosphoryle Nrf2, ce qui provoque une dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et permet l'import de Nrf2 au compartiment nucléaire (Cullinan et al., 2003).

En réalité, la phosphorylation d'eIF2α opère durant quelques heures seulement. Une boucle de rétrocontrôle négative s'exécutant *via* ATF4 induit l'expression d'une phosphatase GADD34 (également nommé PPP1R15) qui permet la déphosphorylation d'eIF2α. Le génome de drosophile code également un seul orthologue de PERK et ATF4 (*cryptocephal* (*crc*)) (Hewes et al., 2000). Ce dernier possède également des uORFs en 5' UTR semblables à celles retrouvées chez ses orthologues. Cependant l'orthologue de GADD34 chez la drosophile, également induit en condition de stress ne semble pas être le produit d'une régulation transcriptionnelle. En effet, une étude

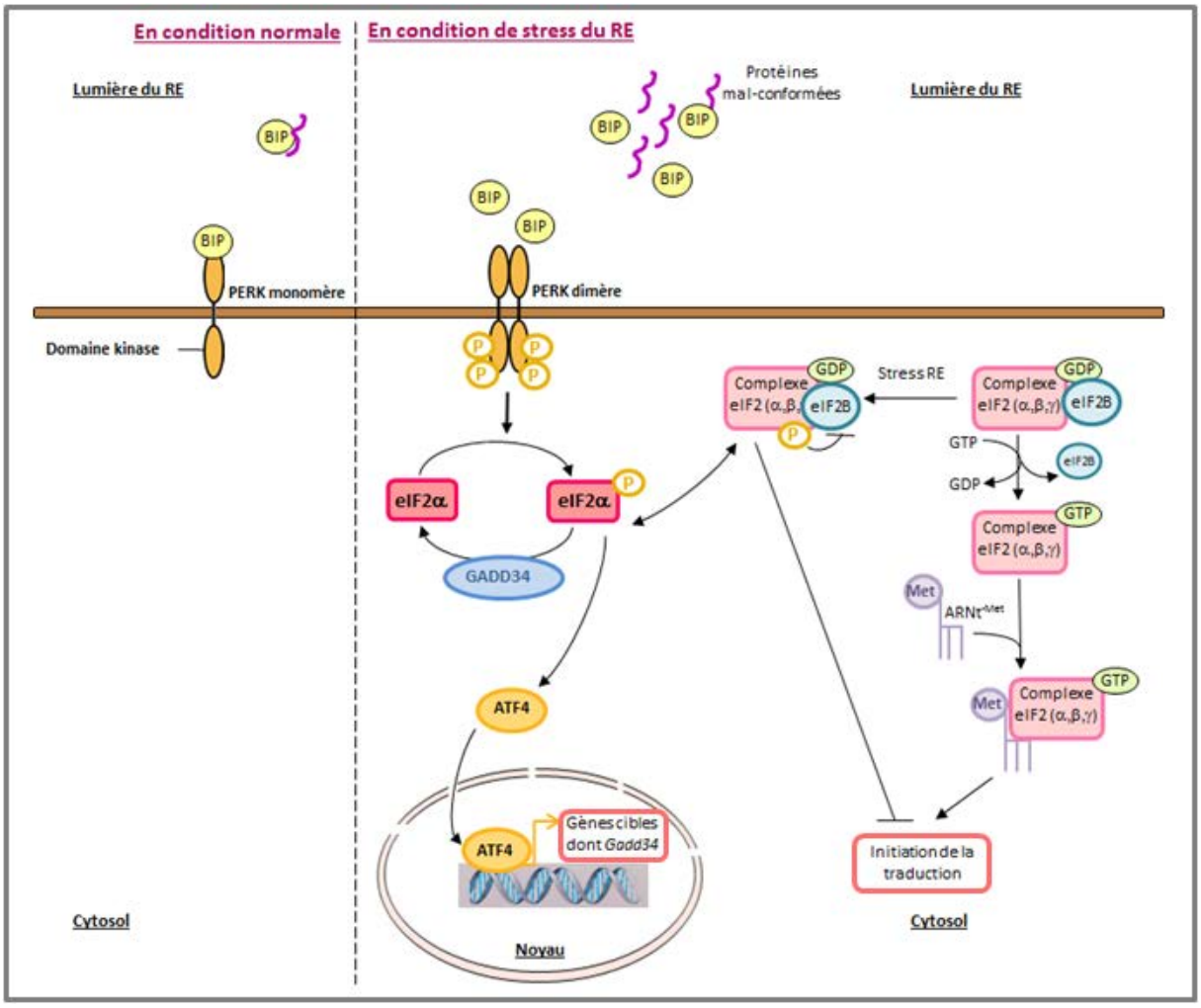


Figure 13 : La branche PERK de l'UPR

En condition de stress du RE, la dimérisation de PERK active sa fonction kinase cytosolique, ce qui lui permet de phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction : eIF2α. Cet évènement permet d'une part (1) d'induire la traduction de l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4 qui à son tour pourra activer ses cibles transcriptionnelles. Une de ces cibles code GADD34, une phosphatase impliquée dans le rétrocontrôle négatif de cette voie, ce qui permet un retour vers un état traductionnel physiologique. D'autre part (2), IF2α phosphorylé diminue le niveau de traduction générale en inhibant l'initiation de ce processus. En effet, le complexe eIF2 (constitué des sous-unités α,β,γ) est actif lorsqu'il est lié au GTP. Le facteur eIF2B catalyse l'échange du GDP en GTP. Une fois activé, le complexe eIF2 interagit avec l'ARNt portant une méthionine qui permet d'initier la traduction. En condition de stress du RE, eIF2α phosphorylé empêche l'échange GDP-GTP, ce qui inhibe la dissociation du facteur eIF2B et par conséquent entrave l'initiation de la traduction.

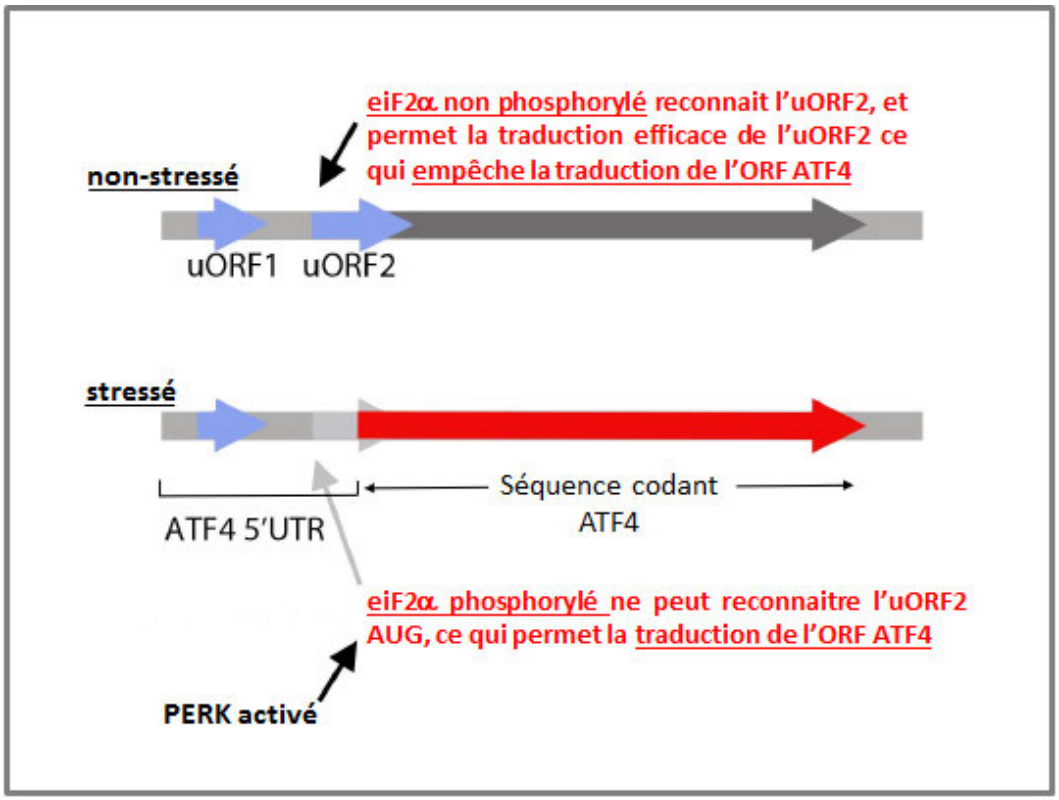


Figure 14 : Régulation traductionnelle de l'ARNm codant ATF4

Il existe plusieurs phases ouvertes de lecture en 5' UTR (upstream ORF, uORF) de l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4. eIf2α, facteur initiateur de la traduction, participe à l'identification du codon (AUG) initiateur de la traduction le long de l'ARNm et aide la sous-unité 40S du ribosome à charger l'ARNt porteur de la méthionine correspondante. L'initiation de la traduction débute avec l'uORF la plus proximale sur l'ARNm. Ici il s'agit de l'uORF1. La réactivation de ce système permet la réinitialisation de la traduction au niveau de l'uORF2 qui finalement inhibe la traduction d'ATF4 puisqu'elle la chevauche. Par ce biais, l'uORF2 interfère avec la traduction de la phase de lecture d'ATF4. En condition de stress, eiF2α est phosphorylée, ce qui compromet la reconnaissance de l'uORF2 par la sous-unité 40S du ribosome. Ainsi, le ribosome passe le codon initiateur de cette uORF2 et permet alors la reconnaissance et la traduction de la séquence codant ATF4. Adapté de Ryoo, 2015.

récente rapporte que la traduction de cet ARNm est hautement régulée par la présence d'uORFs dans sa région 5' UTR, lorsque le facteur eIF2α est phosphorylé (Malzer et al., 2013).

Enfin, concernant le rôle de PERK/ATF4 chez la drosophile, les individus portant des allèles nuls d'ATF4 présentent un défaut de mue larvaire et de pupaison (Hewes et al., 2000). En accord avec cette donnée, ATF4 induit transcriptionnellement Ecdysis triggering Hormone (ETH) dans les cellules endocrines qui à son tour favorise la mue. De façon intéressante, une étude récente rapporte qu'ATF4 agit comme coactivateur du récepteur à l'ecdysone qui contrôle de nombreux gènes cibles impliqués dans la métamorphose (Gauthier et al., 2012). Dans la mesure où la protéine ATF4 ne peut être synthétisée en absence de phosphorylation d'eIF2α induite par un stress, ces observations suggèrent qu'il existe un lien entre le stress du RE et la métamorphose qui reste à caractériser.

(3) La branche ATF6

Chez les vertébrés, ATF6 qui est exprimé de façon ubiquitaire, joue un rôle important dans l'UPR. Cette protéine transmembranaire, localisée à la membrane du RE possède un domaine bZIP de liaison à l'ADN ainsi que 3 domaines structuraux : un domaine cytosolique N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine luminal C-terminal. En condition de stress, les séquences de localisation à l'appareil de Golgi (GLS1 et 2) contenues dans le domaine luminal d'ATF6 permettent son adressage à cet organite via un transport vésiculaire de type COPII (Shen et al., 2002) (Schindler and Schekman, 2009). Dans ce compartiment ATF6 va subir une série de clivages séquentiels grâce à deux protéases membranaires : les protéases des Sites 1-2 (S1P et S2P) (Ye et al., 2000) (Shen and Prywes, 2004), ce qui permettra la libération du fragment N-terminal d'ATF6. Ce fragment pourra ensuite jouer un rôle de facteur de transcription. ATF6 reconnait des séquences consensus situés au niveau de gènes cibles de l'UPR impliqués dans le système de qualité/contrôle du RE tels que les chaperonnes BIP et GRP94 (Yamamoto et al., 2004) (Yamamoto et al., 2007), le système ERAD (Adachi et al., 2008) ou encore XBP1 (Yoshida et al., 2001) (Figure 15). Il existe deux gènes *ATF6* chez les vertébrés dénommés *ATF6*α et *ATF6*β. D'ailleurs, chez la souris un double knockout *ATF6* est létal embryonnaire tandis qu'un simple knockout est viable, ce qui suggère une redondance fonctionnelle de ces deux gènes (Yamamoto et al., 2007). Par ailleurs, concernant une éventuelle boucle de rétrocontrôle de la voie, il a été décrit qu'ATF6β semble réprimer l'activation transcriptionnelle de gènes de réponses au stress du RE qui est médiée par ATF6α (Thuerauf *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel cette régulation opèrerait serait dépendant de la glycosylation. En effet, ATF6β non glycosylée ne serait pas clivée et donc maintenue à la membrane du RE, l'empêchant ainsi d'exercer son rôle de répresseur (Guan et al., 2009). Concernant le génome de la drosophile, ce dernier code un seul homologue d'ATF6 qui conserve l'ensemble des domaines structuraux présentés un peu plus

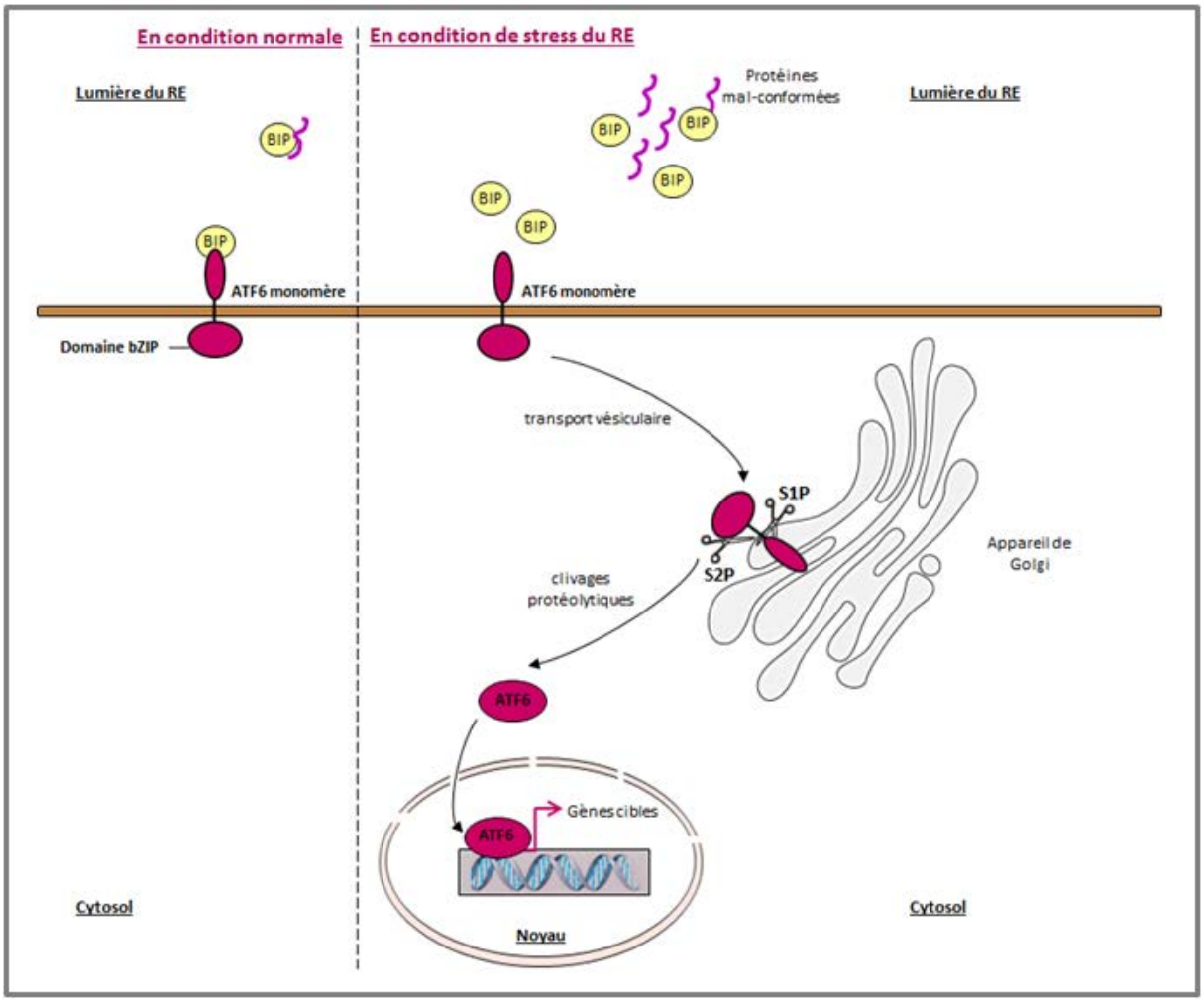


Figure 15 : La branche ATF6 de l'UPR

En réponse au stress du RE, le précurseur protéique d'ATF6 est transloqué au niveau de l'appareil de Golgi pour y subir deux clivages protéolytiques, médiés par les protéases S1P et S2P. Ce processus permet de libérer le domaine cytosolique d'ATF6 qui pourra ensuite se relocaliser au niveau du noyau, pour y jouer son rôle de facteur de transcription.

tôt ainsi que son domaine de liaison à l'ADN. Chez cet organisme, ATF6 ne semble pas jouer un rôle développemental essentiel comme chez les mammifères. Concernant la nécessité de ce gène dans une réponse adéquat au stress dans les tissus adultes, celle-ci reste à être validée.

b. L'UPR et d'autres senseurs de stress

De nouveaux transducteurs de stress du RE qui présentent des régions similaires à celles décrites chez ATF6 ont récemment été identifiés chez les mammifères. Ils possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet de s'associer au RE ainsi qu'un domaine bZIP de liaison à l'ADN et un domaine d'activation transcriptionnelle. Ces senseurs qui sont au nombre de cinq incluent OASIS (CREB3L1), BBF2H7 (CREB3L2), CREBH (CREB3L3), CREB4 (CREB3L4) et Luman (CREB3). Ils sont collectivement regroupés en tant que membres de la famille OASIS. Cependant, malgré leurs similitudes structurales avec ATF6, ces facteurs de transcription diffèrent par leur distribution cellulaire et tissulaire, ce qui suggère qu'ils possèdent des fonctions spécifiques et qu'ils varient par leur capacité à initier un signal de stress (Fox and Andrew, 2015). OASIS est un facteur de transcription hautement exprimé dans les astrocytes et ostéoblastes (Kondo et al., 2005). Il présente une faible homologie avec ATF6 dans son domaine luminal mais est décrit comme étant une cible des protéases S1P/S2P en réponse au stress du RE (Murakami et al., 2006). BBF2H7 est un analogue d'OASIS qui est fortement exprimé au cours de la phase d'extension des os long au niveau des chondrocytes situés dans les zones de prolifération du cartilage. Il est aussi exprimé dans le poumon, le système nerveux (Kondo et al., 2007) et est notamment décrit comme contrôlant Sec23a une protéine importante pour le trafic vésiculaire du RE vers l'appareil de Golgi (Saito et al., 2009). Concernant CREBH, ce senseur est exprimé dans les hépatocytes et est aussi clivé par les protéases S1P/S2P. Il est connu pour réguler l'expression de l'enzyme néoglucogénique PEPCK en réponse au cycle AMP et à la protéine kinase A (Asada et al., 2011). CREB4 est notamment décrit comme étant associé au développement des cellules germinales et impliqué dans la réponse au stress du RE au cours de la spermatogenèse (Adham et al., 2005). Enfin, Luman est exprimé à la fois dans les cellules monocytaires et dendritiques. Le mécanisme et les conditions physiologiques qui conduisent à l'activation de ce senseur ne sont pas entièrement élucidées mais il est connu pour participer dans la régulation de l'expression de différents gènes impliqués dans l'ERAD (Liang et al., 2006).

Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul membre de cette famille de facteur de transcription. Il s'agit de CrebA. A l'inverse de ses orthologues mammifères, ce facteur de transcription ne contient pas de domaine transmembranaire et est constitutivement nucléaire (Fox et al., 2010). Il est principalement exprimé dans les organes sécréteurs aussi bien chez l'embryon que chez la larve et la mouche adulte, avec notamment, un fort niveau d'expression au niveau des disques imaginaux. CrebA est décrit

comme régulant directement l'expression de gènes composant la voie de sécrétion à travers un motif consensus qui ressemble de près au *Creb Response Element* (CRE). D'ailleurs, des expériences en microarray ont identifié près de 400 gènes négativement régulés dans des embryons mutants pour CrebA (Fox et al., 2010). Près d'un tiers de ces gènes sont des composants de la voie de sécrétion. Enfin, CrebA n'est pas seulement nécessaire pour réguler positivement la machinerie générale de sécrétion, il est aussi suffisant (Fox et al., 2010).

2. L'UPR en condition de stress

a. Détection du stress

Initialement, les travaux de Sambrook, portant sur la réponse des cellules mammifères infectées par des virus exprimant des protéines mal-conformées et adressées au RE, ont montré que l'accumulation de protéines aberrantes dans la lumière de cet organite, conduisait à une régulation positive des protéines GRP78 et GRP94 qui appartiennent à la famille des Glucose-Related Protein (GRP) (Kozutsumi et al., 1988). Cette expérience pionnière a mis en évidence la présence d'un système de réponse qui est activé au sein de la cellule à la suite d'un stress du RE comme l'accumulation de protéines mal-conformées. Cette régulation positive des protéines chaperonnes GRP78 et GRP94, en contexte d'accumulation de protéines mal repliées, constitue les bases fondatrices du domaine « Stress RE et UPR ». A ce jour, de nombreuses études essentiellement menées chez la levure qui ne possède que la branche IRE1 de l'UPR, et chez les mammifères, corrèlent cette régulation des chaperonnes GRP78 et GRP94 avec l'initiation de l'UPR (Truettner et al., 2009). Il existe néanmoins plusieurs études biochimiques et structurales qui proposent différentes théories pour expliquer ce mécanisme d'activation qui à ce jour, reste encore mal compris.

(1) Activation canonique de l'UPR dépendante de BIP

Le mécanisme d'activation de l'UPR le plus admis est celui où BIP se lie au domaine luminal des senseurs IRE1, PERK et ATF6 dans les cellules non stressées afin de les maintenir dans leur état monomérique inactif. En condition de stress, les protéines mal conformées en forte concentration dans le RE entreraient en compétition pour se lier à BIP. La diminution de la quantité de BIP disponible pour interagir avec le domaine luminal de ces senseurs jusqu'ici masqué permettrait la dimérisation/oligomérisation des senseurs et l'activation de leur domaine cytosolique (Okamura et al., 2000) (Bertolotti et al., 2000) (Shen et al., 2002) (Kimata et al., 2003). L'existence d'une corrélation entre la surexpression de BIP et une atténuation de l'UPR a été décrite pour la première fois par Dorner (Dorner et al., 1992) et Kohno (Kohno et al., 1993) respectivement chez les

mammifères et la levure. Plus tard, deux études montraient qu'une forme mutante de BIP incapable de se lier au domaine luminal d'Ire1p conduisait à une activation constitutive d'Ire1p chez la levure (Kimata et al., 2003) et suggéraient une incapacité de cette forme à réguler négativement le senseur Ire1p (Todd-Corlett et al., 2007). Ces données semblent conforter l'idée d'un rôle répresseur de BIP dans l'UPR. Toutefois, cette chaperonne étant essentielle et impliquée dans de nombreux processus cellulaires (translocation et conformation des protéines dans le RE), il n'est pas exclu que les effets observés avec des mutants BIP soient finalement secondaires et découlent d'un accroissement du stress cellulaire plutôt qu'à l'altération de l'interaction entre BIP et IRE1. En revanche, une protéine Ire1p mutée au niveau de son domaine luminal et incapable de lier BIP même en absence de stress ne présente pas d'activité constitutive chez la levure. Ainsi, l'absence d'interaction avec BIP n'est pas suffisante pour activer Ire1p. Celle-ci semble dépendante du stress (Kimata et al., 2004) (Oikawa et al., 2007). Des études cristallographiques et biochimiques menées au niveau du domaine luminal d'Ire1p indiquent que ce dernier peut lier les domaines hydrophobes des protéines mal-conformées. Il semble en effet, que ceci soit le cas, car des mutations d'Ire1p affectant ce domaine empêchent l'activation de ce senseur en condition de stress (Kimata et al., 2007) (Gardner and Walter, 2011). Ainsi, le modèle d'activation de l'UPR chez la levure en condition de stress est réalisé en deux étapes : dans un premier temps, la dissociation de BIP vis-à-vis d'Ire1p permet son oligomérisation et est un prérequis pour la deuxième phase d'activation qui concerne la fixation des protéines mal-conformées au niveau de son domaine luminal. Cet événement permet un changement de conformation d'Ire1p, ce qui provoque une réorientation de son domaine cytosolique assurant ainsi son activation.

Chez les mammifères, les mécanismes de détection du stress du RE *via* les branches IRE1 et PERK sont globalement similaires à ceux décrits précédemment chez la levure. En effet, IRE1α/β et PERK présentent également des sites de liaison à BIP. Leur délétion empêche l'association de ses senseurs avec cette chaperonne (Ma et al., 2002a) (Oikawa et al., 2009). Toutefois, Oikawa *et al*. proposent que l'interaction avec BIP est le principal déterminant de l'activité d'IRE1α contrairement à ce qui a été décrit chez la levure. En effet, un mutant IRE1α qui s'associe faiblement à BIP est activé même en absence de stress cellulaire. De plus, une étude cristallographique a montré que la conformation du domaine luminal d'IRE1α n'est pas adaptée pour pouvoir interagir avec les protéines mal conformées (Zhou et al., 2006). De son côté, IRE1β est capable d'interagir avec à la fois BIP et les protéines mal conformées (Oikawa et al., 2012). Cette différence entre IRE1α et IRE1β peut être expliquée par la variation de séquence de leur domaine luminal. Concernant PERK, l'effet d'un mutant de liaison à BIP provoque une activation constitutive, ce qui est en faveur du rôle répresseur de BIP vis-à-vis de ce senseur. Ainsi en condition de stress, la dissociation de BIP favoriserait l'activation de PERK (Ma et al.,

2002a) et cette dernière serait totale lorsque PERK interagirait avec des protéines mal conformées (Kimata and Kohno, 2011). Enfin, la séquence luminale d'ATF6 ne présente pas d'homologie avec IRE1 ou PERK et son activation semble différente. Au cours d'un stress du RE, BIP se dissocie du domaine luminale d'ATF6 (Shen et al., 2002) (Shen and Prywes, 2004) mais cet événement n'est pas suffisant pour assurer son activation. En effet, celle-ci repose d'une part sur un changement de localisation subcellulaire (transit du RE vers l'appareil de Golgi) et d'autre part sur des clivages protéolytiques intramembranaires.

(2) Activation alternative de l'UPR

Une étude récente a montré que le domaine transmembranaire d'IRE1 chez la levure peut détecter un défaut de composition des membranes lipidiques, conduisant à l'activation de l'UPR et ceci indépendamment de protéines mal-conformées (Promlek et al., 2011) (Volmer and Ron, 2015). En effet, une déplétion des composés inositols ou une délétion des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique conduit à une régulation positive d'IRE1 sauvage ou d'une forme mutante pour son domaine luminal.

Chez les mammifères, d'autres protéines cytosoliques contrôlent également l'activation d'IRE1α. En effet, les membres pro-apoptotiques Bax et Bak de la famille Bcl-2 forment un complexe avec le domaine cytosolique d'IRE1α, afin de l'activer (Hetz et al., 2006). A l'opposé, l'inhibiteur de Bax BI-1 est une protéine résidente du RE qui peut également former un complexe avec IRE1α mais pour inhiber son activité endoribonucléase (Lisbona et al., 2009) (Madeo and Kroemer, 2009).

D'autre part, la glycosylation du domaine luminal d'ATF6 pourrait servir de senseur de l'homéostasie du RE (Hong et al., 2004). En condition physiologique, ATF6 est glycosylée au niveau de son domaine luminal, favorisant ainsi son interaction avec la calréticuline qui permet son maintien dans le RE. En condition de stress, un défaut de glycosylation d'ATF6 perturberait son interaction avec la calréticuline et favoriserait sa translocation vers l'appareil de Golgi puis vers le noyau dans des cellules de mammifères. En effet, une forme d'ATF6 mutée pour un de ses sites de glycosylation est retrouvée en grande quantité dans le compartiment nucléaire en absence de stress. Enfin, de récents travaux ont mis en évidence le rôle de la Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) dans la régulation de l'UPR (Jwa and Chang, 2012). Cette équipe a montré que chez l'homme, PARP16 est suffisante pour activer IRE1α et PERK en absence de stress. En condition de stress du RE, l'ADP-ribosylation de PARP16, d'IRE1α et de PERK augmente leur activité ARNase et kinase mais ne semble pas affecter l'activation d'ATF6. Parce qu'une perte de fonction partielle de PARP16 empêche la dissociation de BIP vis-à-vis d'IRE1α et de PERK, les auteurs ont proposé un mécanisme *via* lequel la ribosylation

induite par PARP16 pourrait provoquer un changement conformationnel des domaines senseurs permettant alors la dissociation de BIP afin d'induire l'activation de l'UPR. En conclusion, différents ligands et signaux d'activations peuvent intervenir dans l'induction de l'UPR afin de déclencher différentes réponses spécifiques.

b. Réponses de l'UPR pour s'adapter au stress

L'UPR joue un rôle fondamental dans l'adaptation au stress cellulaire car elle induit divers mécanismes qui vont tenter de restaurer l'homéostasie du RE afin de rétablir ses fonctions. Dans ce paragraphe je détaillerai brièvement ces mécanismes. Le rôle cytoprotecteur de l'UPR est médié par l'activation de facteurs de transcriptions à domaines bZIP : IRE1, PERK et ATF6 qui vont à leur tour réguler de nombreux gènes cibles. Cette myriade d'effecteurs est coordonnée au cours du temps et est notamment régulée par la présence de séquences promotrices spécifiques. Ainsi, XBP1 et ATF6 se fixent sur des séquences consensus ERSE (ER Stress Response Element : CCAAT-N(9)-CCACG) localisées dans la région promotrice de nombreux gènes de réponse au stress (Yoshida et al., 1998a) (Roy and Lee, 1999). Cette fixation se réalise en présence du facteur de transcription nucléaire Y (NF-Y). Il est intéressant de préciser que l'activation des séquences de type ERSE est parfaitement réalisée même en absence de XBP1. De plus, XBP1 est capable de reconnaitre les séquences UPRE (Unfolded Protein Response Element : TGACGTGG/A) qui semblent plus spécifiques de XBP1 (Yamamoto et al., 2004). Enfin, le facteur de transcription ATF4 reconnait la séquence consensus AARE (Amino-Acid Response Element : ATTCACTCA) (Okada et al., 2002). Ces différences de reconnaissance de promoteurs peuvent expliquer la spécificité et la variabilité de réponse des différentes branches de l'UPR (Figure 16).

(1) UPR et protéostasie

Comme évoqué précédemment, les trois branches de l'UPR induisent l'expression de gènes codant des chaperonnes telles que BIP, GRP94 ou la calréticuline, mais aussi des enzymes responsables de la formation de ponts disulfures, afin d'améliorer la capacité du RE à conformer correctement les protéines qui ne le sont pas et qui ont tendance à s'accumuler (Harding et al., 1999) (Hollien and Weissman, 2006).

ATF6 et IRE1 peuvent également favoriser l'augmentation du calcium luminal. Ainsi ATF6 induit l'expression de *SERCA2* chez les mammifères (Okada et al., 2002) et XBP1 réduit l'expression de *RyR* et *IP3R* afin de limiter le relargage du calcium dans le cytosol de la cellule (Casas-Tinto et al., 2011). Ces senseurs régulent donc la concentration de calcium luminal, ce qui pourrait contribuer au bon fonctionnement des chaperonnes du RE qui dépendent du calcium pour leur activité.

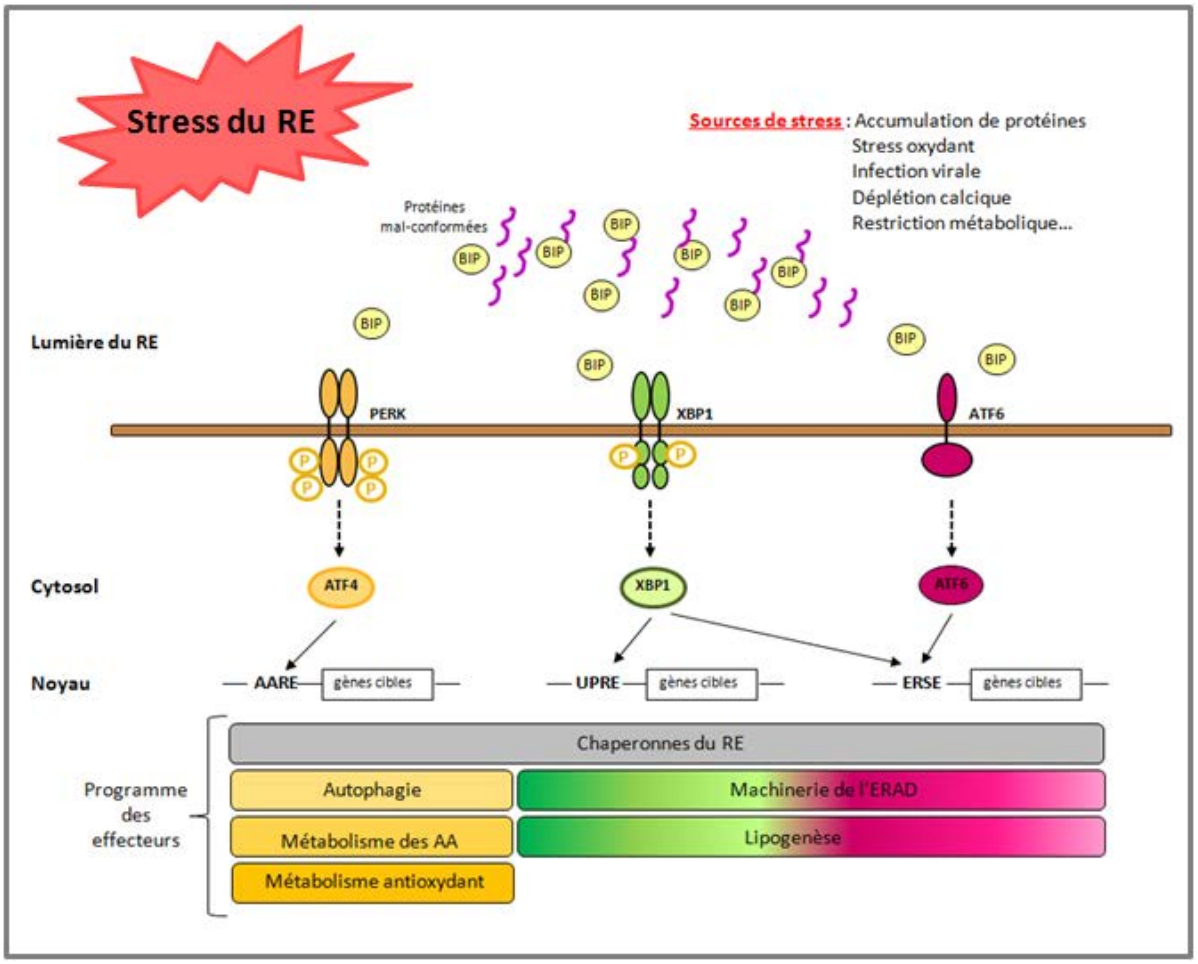


Figure 16 : Les effecteurs régulés transcriptionnellement par l'UPR en condition de stress du RE

Le stress du RE déclenche l'UPR via l'activation de trois protéines transmembranaires, PERK, IRE1 et ATF6. Ces senseurs induisent et coordonnent des réponses spécifiques à travers la régulation des facteurs de transcriptions ATF4, XBP1 et ATF6 qui reconnaissent des séquences consensus promotrices particulières qui assurent l'activation transcriptionnelle de leurs cibles.

Afin de réduire le pool de protéines néosynthétisées entrant dans la lumière du RE, la branche PERK initie la diminution du niveau général de traduction en inhibant le facteur d'initiation eiF2α (Ron and Walter, 2007) (Walter and Ron, 2011). Cette action est complétée par celle le mécanisme RIDD induit par IRE1 qui détruit une partie des ARNm (Hollien et al., 2009).

PERK active également l'expression de gènes cibles spécifique tels que *ATF4*, lui-même impliqué dans l'expression de gènes spécifiques tels que *Gadd34* qui exerce un rétrocontrôle négatif de la voie PERK (Brush et al., 2003) ou encore de gènes participant à la maintenance de l'homéostasie protéique (biosynthèse des acides aminées, potentiel redox cellulaire...) (Harding et al., 2000). Enfin, cette branche PERK régule aussi l'expression de gènes codants des acteurs de la synthèse protéique afin cette fois, de préparer la cellule à une éventuelle reprise de la traduction une fois le stress du RE résolu (Okada et al., 2002).

(2) UPR et ERAD

Un autre mécanisme impliqué dans la régulation de l'homéostasie protéique est l'ERAD qui est constitutivement activée. Ce processus essentiel à la cellule consiste en la rétrotranslocation dans le cytosol, la polyubiquitinylation et la dégradation *via* le protéasome des protéines mal-conformées du RE (Meusser et al., 2005). Chez les mammifères, en condition de stress du RE, ATF6 et XBP1 s'hétérodimérisent pour reconnaitre les séquences promotrices de type UPRE et provoquer une augmentation de l'expression des composants de l'ERAD , ce qui permet de maintenir l'homéostasie du RE (Travers et al., 2000) (Yamamoto et al., 2007). Chez la drosophile, seule la branche IRE1/XBP1 serait responsable de cette régulation transcriptionnelle (Hollien and Weissman, 2006).

(3) UPR et autophagie

Le stress du RE active également une autre voie de dégradation des protéines : l'autophagie. Ce processus assure à la fois la séquestration de macromolécules à éliminer et la dégradation d'organites entiers, ceci indépendamment de leur taille ou de l'état de repliement de leurs protéines constitutives. L'autophagie séquestre ses cibles dans une double membrane vésiculaire qui va fusionner aux lysosomes pour leur dégradation et le recyclage des substrats bioénergétiques (Mizushima and Komatsu, 2011) (Figures 17 et 18). Ce mécanisme hautement conservé au cours de l'évolution est principalement gouverné par de multiples protéines nommées Atg (Nakatogawa et al., 2009).

Plusieurs mécanismes moléculaires sont décrits pour expliquer la communication entre l'UPR et l'autophagie. En effet, l'ATP ou encore le Ca^{2+} relargué par le RE peuvent inhiber l'activité de mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), un régulateur négatif de l'autophagie, et induire

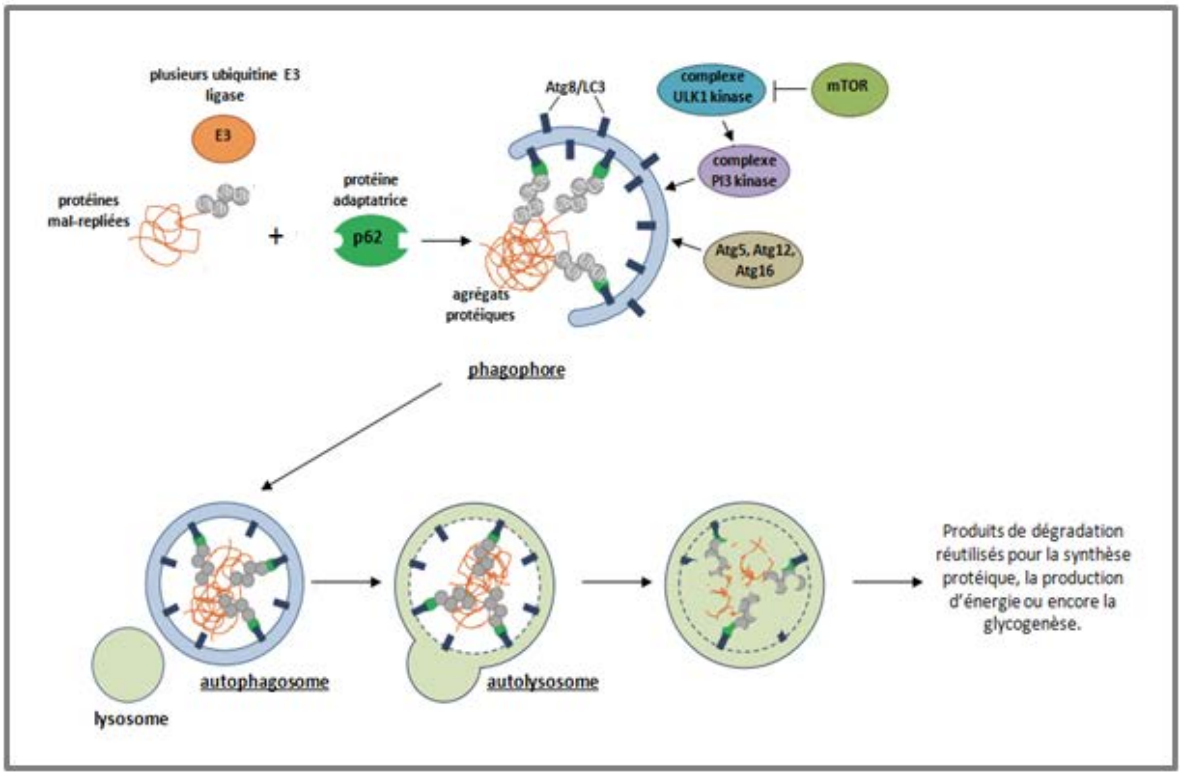


Figure 17 : Le processus d'autophagie

En condition de stress cellulaire, l'initiation de l'autophagie est contrôlée par le complexe ULK1 qui est activé et transloqué au RE afin d'y réguler d'autres facteurs/complexes tels que celui de la PI3 kinase pour conduire à la formation d'une vésicule nommée « phagophore ». L'élongation et l'isolement de la membrane de cette structure sont gouvernés par deux complexes de conjugaison liant les ubiquitines : il s'agit des complexes Atg5/Atg12/Atg16 et Atg8/LC3. Finalement, l'autophagosome peut fusionner avec les lysosomes pour former l'autolysosome et assurer ainsi la dégradation de son contenu. Cette dégradation sélective est possible grâce à des protéines adaptatrices telles que p62 qui possède des domaines lui permettant à la fois de se lier aux protéines polyubiquitinylées et à Atg8/LC3. Adapté de Lippai and Lőw, 2014.

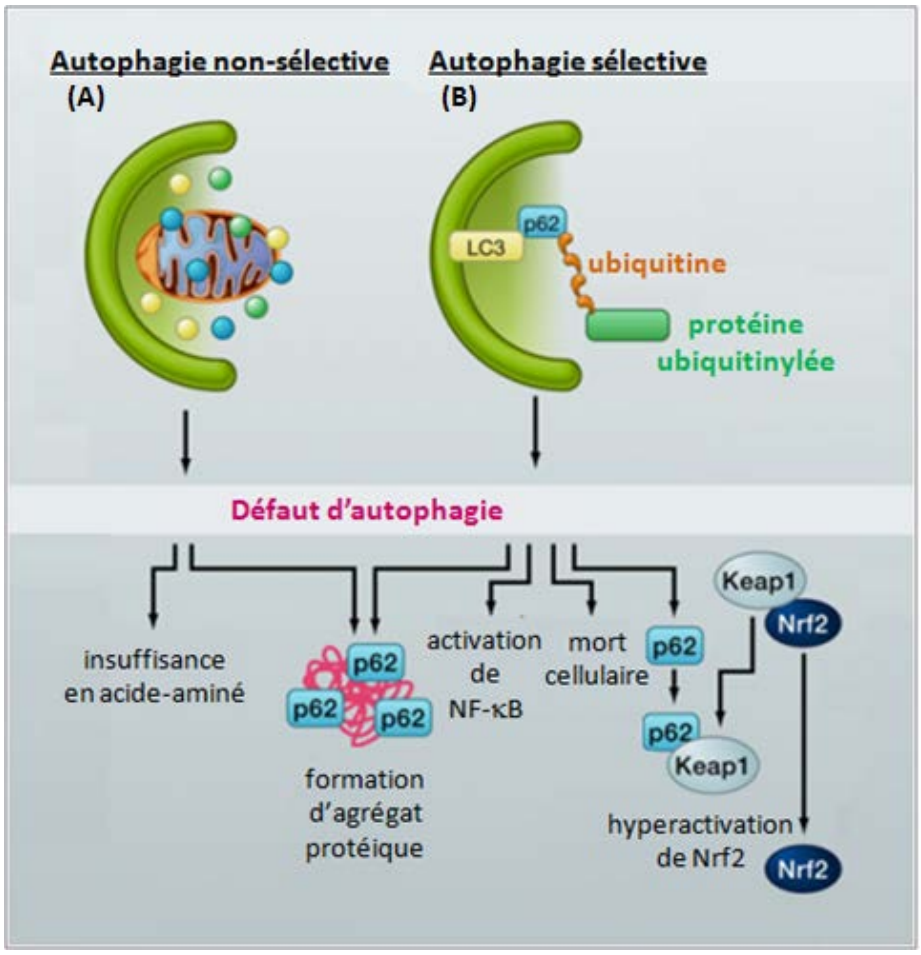


Figure 18 : Autophagie non-sélective versus autophagie sélective

(A) En condition de carence nutritive, l'autophagie catabolise les composants cytoplasmiques de façon non sélective. Grâce à ce mécanisme, la cellule peut s'adapter à ses contraintes environnementales et produire de l'énergie pour assurer sa survie. Un défaut de ce processus conduit à une déplétion en acide-aminés pourtant indispensables à la synthèse protéique. Il est important de noter qu'en condition normale, l'autophagie est activée constitutivement à faible niveau et assure le recyclage des matériaux cytosoliques. (B) p62 est une protéine permettant notamment l'adressage de structures et molécules polyubiquitinylées au protéasome ou à l'autophagie où elle lie notamment Atg8/LC3. Généralement, un défaut d'autophagie s'accompagne d'une accumulation de p62. Cette accumulation amplifie sa fonction de protéine adaptatrice dans plusieurs signalisations telles que la voie NF-κB, les voies de mort cellulaire ou encore l'activation de Nrf2 impliquée dans la réponse oxydante. Adapté de Mizushima and Komatsu, 2011.

l'accumulation massive d'autophagosomes (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007) (Høyer-Hansen et al., 2007). Toutefois, une étude montre que le Ca^{2+} libéré par le RE déclenche l'autophagie *via* l'activation de la PKC (Protein Kinase C) et ceci indépendamment de mTOR (Sakaki and Kaufman, 2008). D'autres études proposent que l'activation de l'autophagie induite par un stress du RE est régulée par la branche IRE1/XBP1 de l'UPR (Ogata et al., 2006) (Margariti et al., 2013). Enfin, la branche PERK/ATF4 n'est pas en reste, puisqu'elle semble stimuler l'activité transcriptionnelle de certains gènes codant des Atg, en condition de stress (Harding et al., 2000) (Kouroku et al., 2007) (B'chir et al., 2013). Au vu de l'ensemble de ces données de la littérature, il est concevable que plusieurs mécanismes possibles contribuent à l'établissement de cette connexion fonctionnelle entre le stress du RE et l'autophagie.

L'autophagie induite en condition de stress du RE est activée sous une forme particulière connue sous le nom de "réticulophagie". Elle apparait essentielle pour réguler l'expansion du RE induite par l'UPR (Yorimitsu et al., 2006) (Bernales et al., 2006) (cf paragraphe iv). Dans ce contexte, l'autophagie est un mécanisme cytoprotecteur (Ogata et al., 2006) (Pankiv et al., 2007) : elle permet d'atténuer l'amplitude du stress cellulaire en enlevant des portions de membrane du RE qui contiennent les senseurs de stress ou en dégradant les protéines aberrantes du RE qui ne peuvent être dégradées par l'ERAD. En effet des protéines très fortement mal-repliées ou des agrégats protéiques peuvent rencontrer des difficultés à transloquer à travers le canal protéique Sec61 du système ERAD et à être dégradées *via* le protéasome.

(4) UPR et biogenèse des membranes

Comme évoqué en introduction, le RE joue un rôle important du rôle dans la synthèse lipidique qui est notamment essentielle pour la formation des membranes. En condition de stress du RE, la branche IRE1/XBP1 induit l'expression de gènes impliqués dans l'expansion des membranes du RE (Sriburi et al., 2004). Ceci est corrélé avec une augmentation de la biosynthèse des phospholipides et de l'expression de nombreuses protéines qui fonctionnent dans la voie de sécrétion (Shaffer et al., 2004) (Sriburi et al., 2007). Une étude plus récente a montré que la branche PERK/ATF4 et que ATF6β n'étaient pas impliqués dans ce processus, en revanche ATF6α a la capacité de déclencher une expansion du RE et ceci même en absence de XBP1 (Bommiasamy et al., 2009). L'UPR intervient donc également dans le maintien de la biogenèse des membranes du RE. Cette biogenèse pourrait permettre de compenser les membranes éliminées par autophagie.

(5) Réponses intégratives au stress

Comme nous l'avons vu, les senseurs du stress du RE utilisent différents mécanismes et effecteurs pour activer l'UPR, mais un point important qu'il ne faut pas négliger est celui concernant la communication entre ces différentes branches. En effet, les voies IRE1α et ATF6 sont très proches puisque le produit de l'ARNm non épissé de XBP1 cible la forme active d'ATF6 pour assurer sa dégradation *via* le protéasome (Yoshida et al., 2009), tandis qu'ATF6 exerce aussi une régulation transcriptionnelle positive sur le gène codant XBP1 (Yoshida et al., 2001). De plus, ATF6 peut s'hétérodimériser avec XBP1 pour promouvoir l'expression des composants de l'ERAD (Yamamoto et al., 2007).

La voie PERK est également liée à ATF6 et IRE1. En effet, PERK facilite à la fois la synthèse et l'adressage d'ATF6 à l'appareil de Golgi (Teske et al., 2011) et PERK semble régulé positivement par IRE1 pour l'induction du processus d'autophagie (Deegan et al., 2015). L'ensemble de ces études souligne la notion que les branches de l'UPR sont interconnectées entre elles, afin d'intégrer l'ensemble des réponses d'adaptation qu'elles génèrent pour faire face au stress. D'ailleurs, ce point précis ne facilite pas la compréhension de la contribution exacte de chacune d'elle vis-à-vis de l'établissement de l'effet biologique final observé. De nombreuses études tentent toujours de résoudre cette question.

D. Conséquence de l'UPR en contexte de stress prolongé

Outre son rôle majeur dans la voie de sécrétion des protéines et la synthèse lipidique (Basseri and Austin, 2012), l'UPR influence également l'inflammation (Garg et al., 2012) et l'apoptose (Sano and Reed, 2013). C'est précisément ce dernier point que je vais développer dans cette partie. En effet, l'activation prolongée de l'UPR, signalant un stress persistant ainsi qu'un défaut de restauration de l'homéostasie du RE, n'est pas compatible avec la survie de la cellule et est connue pour déclencher une mort cellulaire par apoptose (Xu et al., 2005) (Walter and Ron, 2011) (Hetz, 2012).

1. La mort cellulaire par apoptose

En 1972, Kerr définit l'apoptose comme étant un processus de mort cellulaire caractérisé à la fois par une condensation nucléaire et cytoplasmique, et associé à une fragmentation cellulaire. Ce mécanisme génère alors des corps apoptotiques qui seront ensuite éliminés par les cellules environnantes *via* le processus de phagocytose (Kerr et al., 1972). Cette mort est à la fois nécessaire au cours du développement et également chez l'adulte, afin de maintenir l'homéostasie tissulaire qui est requise pour le bon fonctionnement d'un organisme vivant.

a. Les différents types d'apoptose

(1) L'apoptose développementale

La mort cellulaire est un phénomène très répandu au cours du développement des organismes multicellulaires et est majoritairement de type apoptotique (Glucksmann, 1951). Voici quelques exemples pour illustrer ce propos. Il est bien connu chez les vertébrés, que la formation de l'extrémité des membres telle que la séparation des doigts, nécessite l'élimination du mésenchyme interdigitale à la suite d'un stimulus de type facteur de croissance tel que Transforming Growth Factor β (TGFβ) (Zuzarte-Luís and Hurlé, 2002). Chez la drosophile, les glandes salivaires sont éliminées en réponse à un pic hormonal d'ecdysone, après qu'elles aient assuré leur fonction (Baehrecke, 2002). De façon intéressante, cette mort développementale n'intervient pas qu'à l'échelle d'un tissu, elle opère également au niveau de cellules isolées. En effet, aussi bien chez les mammifères que chez la drosophile, cette mort cellulaire programmée est essentielle au développement d'un système nerveux fonctionnel. Par exemple, une délétion des gènes pro-apoptotiques peut entrainer de sévères malformations cérébrales chez les mammifères (Yoshida et al., 1998b). Chez la drosophile, cette apoptose est requise pour l'élimination d'environ 2000 cellules excédentaires, afin de mettre en place une organisation correcte des unités ommatidiennes au cours du développement de l'œil (Bonini and Fortini, 1999).

(2) L'apoptose accidentelle

Outre son rôle développemental, l'apoptose est également requise pour l'élimination des cellules endommagées ou néfastes pour l'organisme. Cette mort est déclenchée en réponse à différents stress comme des dommages à l'ADN, une infection virale, une blessure physique ou encore un stress du RE ce qui nous intéresse en particulier (Bergmann et al., 1998). D'ailleurs cette apoptose accidentelle nécessite des mécanismes de compensation afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Une dérégulation de cet équilibre entraine diverses pathologies telles que des maladies neurodégénératives ou encore certains cancers. Ces points seront développés un peu plus tard dans l'introduction.

b. Les caspases et leurs antagonistes les IAPs

Les gènes essentiels à l'activation de l'apoptose sont hautement conservés au cours de l'évolution. Quelle que soit l'espèce considérée, le principal effecteur de ce processus de mort cellulaire est la caspase (cysteinyl aspartate-specific proteases) : il en existe 18 chez les mammifères et 7 chez la drosophile. Il s'agit d'une protéase qui contient en son site actif une cystéine capable de cliver ses substrats après un résidu aspartique (Kumar, 2007). Ces caspases sont synthétisées sous forme de

zymogène correspondant à leur forme protéique précurseur inactive qui est structurée en 3 domaines de longueur variable : un pro-domaine en N-terminal, une grande sous-unité et une petite sous-unité en C-terminal (Figure 19). L'activation de ces protéases nécessite un clivage protéolytique qui leur permet d'acquérir leur forme active en tant que tétramère composé de deux grandes et de deux petites sous-unités. Suivant la longueur de leur pro-domaine, les caspases sont classées en deux catégories : celles dites initiatrices ont un long pro-domaine, telles que Dronc (Drosophila Nedd-2-like caspase), Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like) et Strica (Ser/Thr-rich caspase), et celles dites effectrices possèdent un court pro-domaine, telles que DrIce(Drosophila ICE),Dcp-1 (Death caspase-1), Decay (Death executioner caspase related to apopain/Yama) et Damm (Death-associated molecule related to Mch2), pour ce qui est de l'organisme modèle de drosophile (Figure 19). Les longs pro-domaines des caspases initiatrices présentent des motifs CARD (caspases recruitment domain) ou DED (death effector domain) qui permettent des interactions protéine-protéine. Ces pro-domaines autorisent des interactions entre les formes précurseur des caspases initiatrices et une molécule adaptatrice de la famille Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1). Chez la drosophile, cette protéine adaptatrice est connue sous le nom de Dark (Drosophila Apaf-1 related killer). Ces protéines forment un complexe multimérique d'activation dénommé apoptosome qui stimule l'homodimérisation et l'activation auto-catalytique de ces caspases (Yan and Shi, 2005). Les caspases initiatrices vont par la suite cliver d'autres caspases dites effectrices. A l'issue de cette cascade d'activation, les caspases effectrices clivent à leur tour plusieurs centaines de substrats cellulaires (Fischer et al., 2003) telles que des protéines impliquées dans la transduction de signaux, dans le maintien du cytosquelette ou encore dans la réparation de l'ADN et l'assemblage du noyau. De cette façon, ce mécanisme assure l'amplification et la prolongation du signal apoptotique. Chez la drosophile, la caspase initiatrice Dronc (homologue fonctionnel de la caspase-9 chez les mammifères) et les caspases effectrices DrIce et Dcp-1 (homologues fonctionnels de la caspase-3 chez les mammifères) sont les principaux acteurs de l'apoptose.

Compte tenu de l'importance de leur rôle, le contrôle de l'activité des caspases est central dans la régulation de ce processus de mort cellulaire et est médié par les inhibiteurs de caspases appartenant à la famille des IAP (inhibitor of apoptosis protein). Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un à trois domaines BIR (Baculovirus inhibitory repeat) situés en position N-terminale. Ces BIR permettent leur interaction avec les caspases. Chez les mammifères, il existe huit membres tandis que chez la drosophile il en existe quatre : Diap1 (Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1), Diap2 (Drosophila inhibitor of apoptosis protein 2), dBruce (Drosophila BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) et Deterin (Berthelet and Dubrez, 2013). Chez la drosophile, Diap1 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose puisque la seule perte de fonction de *diap1*

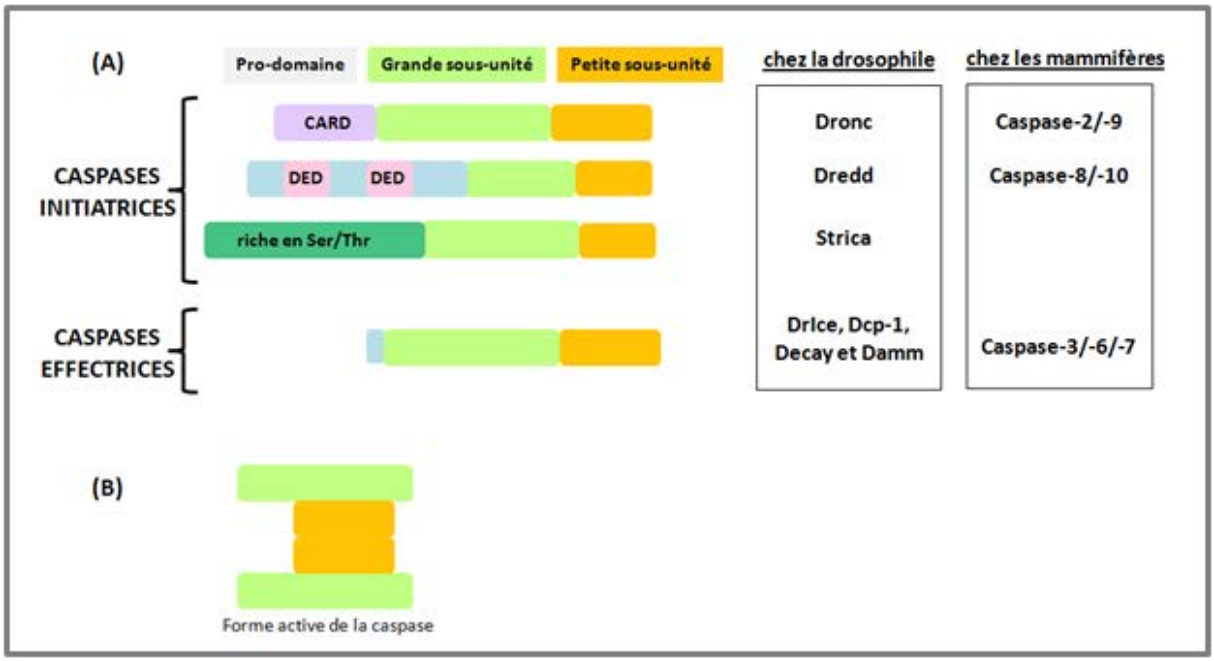


Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines structuraux des caspases initiatrices et effectrices chez la drosophile et les mammifères

(A) Les domaines catalytiques des caspases résident dans les petites et grandes sous-unités. Les caspases initiatrices Dronc (Drosophila Nedd-2-like caspase), Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like) et Strica (Ser/Thr-rich caspase) contiennent respectivement un pro-domaine en N-Terminal : CARD (caspase activation and recruitment domain), DED (death effector domain) qui correspondent à des motifs d'interaction protéine-protéine ou un domaine riche en sérine et thréonine. Concernant les caspases effectrices DrIce (Drosophila ICE), Dcp-1 (Death caspase-1), Decay (Death executioner caspase related to apopain/Yama) et Damm (Death-associated molecule related to Mch2), elles ont la particularité de posséder un petit pro-domaine. La longueur relative des différents domaines et sous-unités n'est pas toujours figurée. Adapté de Denton et al., 2013 et de Kumar, 2007. (B) Représentation schématique d'une caspase activée sous forme de tétramère, composée de deux grandes et deux petites sous-unités.

provoque une apoptose massive, entrainant une létalité embryonnaire (Wang et al., 1999) (Goyal et al., 2000). En plus de ses deux domaines BIR (BIR1 étant nécessaire pour lier DrIce et Dcp-1 (Yan et al., 2006) tandis que BIR2 permet l'interaction avec Dronc (Chai et al., 2003)), Diap1 possède un domaine RING (really interesting new gene) qui lui confère une activité E3 ubiquitine ligase. Cette activité ubiquitine-ligase constitue une des stratégies de Diap1 pour inhiber la mort (Figure 20). En effet, Diap1 est capable de polyubiquitinyler à la fois les caspases Dronc et DrIce. Concernant Dronc, Diap1 peut d'une part ajouter des chaines d'ubiquitine à sa forme zymogène ce qui empêchera son activation catalytique sans pour autant promouvoir sa dégradation *via* le protéasome (Lee et al., 2011) et d'autre part, il peut polyubiquitinyler sa forme active au sein de la machinerie apoptosome ce qui cette fois conduira à sa dégradation par le protéasome (Shapiro et al., 2008). L'ubiquitinylation de DrIce inhibe également son activité catalytique (Ditzel et al., 2008).

Ces principaux acteurs canoniques de la voie de l'apoptose, présentés de façon non-exhaustive, sont impliqués dans les deux voies principales de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque dite mitochondriale. Ces deux voies diffèrent de par leur mode d'activation et d'action. En effet, la voie extrinsèque est déclenchée par des signaux extracellulaires qui activent des récepteurs spécifiques à domaine de mort afin d'induire une cascade de signalisation permettant l'activation des caspases. Tandis que la voie intrinsèque est essentiellement activée en réponse à des dommages intracellulaires tels que des cassures de l'ADN, l'absence de facteurs de survie ou encore en contexte de stress oxydant. Chez les mammifères, cette voie de mort se caractérise par un rôle central de la mitochondrie qui contrôle l'activation des caspases, ce qui ne semble pas être le cas chez la drosophile. Par ailleurs, il est intéressant de mentionner qu'il existe également des voies de signalisation de mort indépendantes des caspases qui font intervenir d'autres protéases telles que les calpaïnes ou les cathepsines (Bröker et al., 2005). Dans la suite de cette introduction, je ne présenterai que la voie intrinsèque de l'apoptose.

c. La voie intrinsèque de l'apoptose

Chez les mammifères, les caspases sont activées à la suite de l'interaction d'Apaf-1 avec le cytochrome c. En effet, le cytochrome c, un facteur pro-apoptotique initialement localisé dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, est relargué dans le cytosol à la suite d'un évènement majeur qui consiste en la perméabilisation de la membrane externe de cet organite, en réponse à des signaux apoptotiques (Figure 21). En dehors du relargage du cytochrome c, cet évènement capital de la signalisation intrinsèque de l'apoptose, permet également la libération des protéines pro-apoptotiques Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 qui ont pour rôle d'inhiber les IAPs afin d'assurer l'activation des caspases. Ce mécanisme de perméabilisation de la membrane externe des

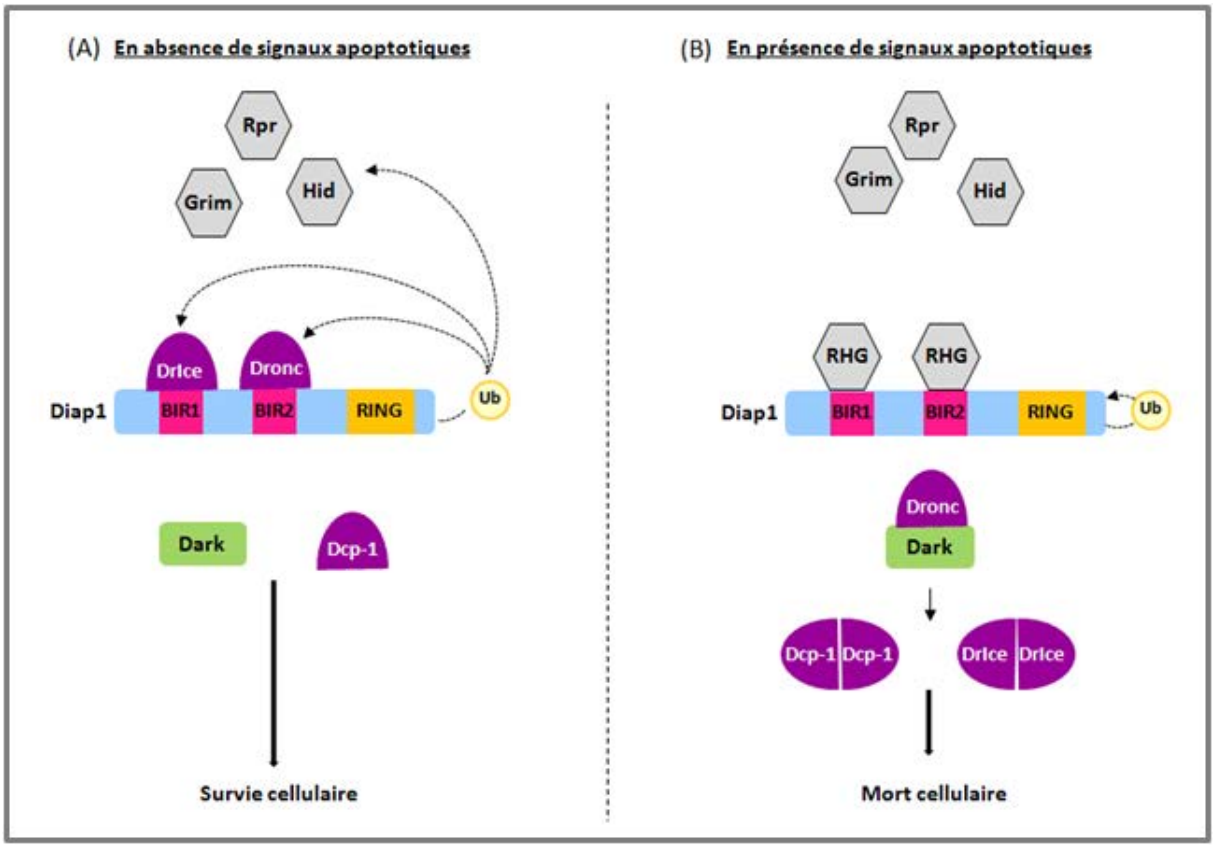


Figure 20 : Interactions mécanistiques au sein de la voie de mort cellulaire chez *Drosophila*

(A) En absence de signaux apoptotiques, les domaines BIR de Diap1 lient les caspases Dronc et DrIce. Ceci promeut l'ubiquitinylation des caspases *via* le domaine RING de Diap1. Cette ubiquitinylation inactive les caspases sans pour autant induire leur dégradation *via* le protéasome. Ce domaine RING est également capable d'ubiquitinyler les protéines de la famille RHG (Reaper (Rpr), Hid, Grim). (B) En présence de signaux apoptotiques, les protéines RHG remplacent les caspases pour interagir avec Diap1, stimuler son auto-ubiquitinylation et promouvoir sa dégradation protéosomale. Etant libre, Dronc peut alors s'associer avec la protéine adaptatrice Dark afin de permettre l'assemblage de l'apoptosome et induire ensuite la cascade activatrice des caspases effectrices DrIce et Dcp-1 pour provoquer la mort cellulaire. D'après Xu et al., 2009.

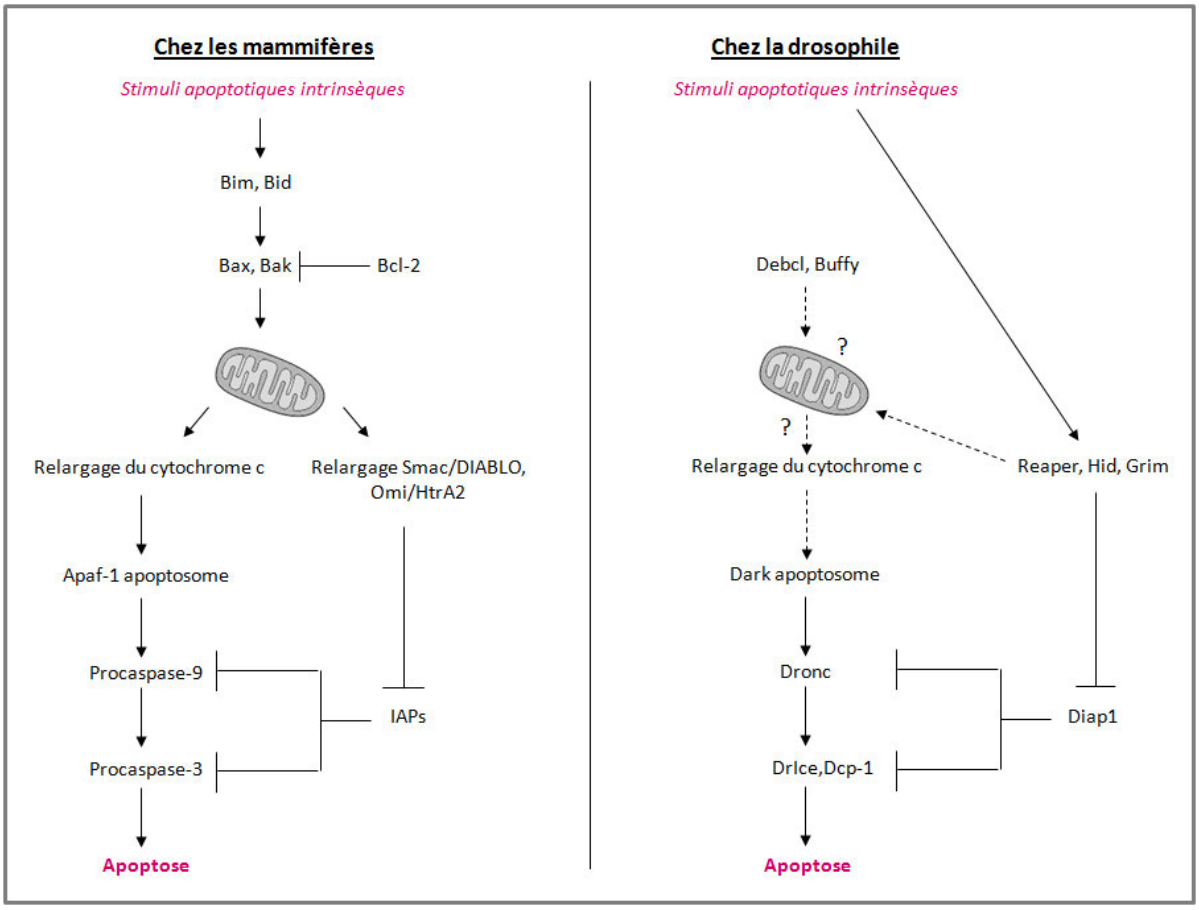


Figure 21 : La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères et la drosophile

Les protéines impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose sont conservées au cours de l'évolution. Toutefois, le processus conduisant à l'activation des caspases est différent entre les mammifères et la drosophile. Chez les mammifères (à gauche), la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie survient lorsque les protéines de la famille Bcl-2 à multiples domaines BH Bax et Bak sont activées par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à domaine BH3 Bim et Bid, en réponse à un signal apoptotique. Ceci a pour conséquence de libérer des protéines pro-apoptotiques résidant dans l'espace intermembranaire mitochondriale dont notamment le cytochrome c, Smac/Diablo et Omi/HtrA2. La libération du cytochrome c est requise pour l'assemblage de l'apoptosome *via* Apaf-1 qui permet le recrutement et l'activation de la caspase-9 au sein de ce dernier. Les facteurs pro-apoptotiques Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 (analogues fonctionnels des protéines RHG) favorisent l'activation des caspases en inhibant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs). Chez la drosophile (à droite), la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie n'est pas un évènement central dans l'activation des caspases. En effet chez cet organisme, l'activation des effecteurs de l'apoptose est principalement dépendante de la quantité de Diap1 qui est elle-même régulée par ses antagonistes : les protéines de la famille RHG (Reaper, Hid et Grim). Adapté de Yuan and Akey, 2013.

mitochondries est contrôlé par les membres la famille Bcl-2 (incluant Bcl-2, Bax/Bak et Bim/Bid) qui présentent des rôles pro-ou anti-apoptotiques. Suivant leur rôle vis-à-vis de la mort et du nombre de domaine BH (Bcl-2 Homology)qui les compose, les membres de cette famille protéique s'organisent en trois grands groupes Le premier est représenté par les protéines anti-apoptotiques telle que Bcl-2 qui sont composés de quatres domaines BH. Le second groupe est représenté par les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak qui présentent trois domaines BH. Et enfin, le troisième et dernier groupe qui rassemble les protéines pro-apoptotiques "BH3-only" car elles ne possèdent qu'un domaine BH3 comme les facteurs Bim et Bid. Ainsi, le changement de conformation des facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak médié par les facteurs pro-apoptotiques Bim et Bid module leur translocation du cytosol vers la membrane externe de la mitochondrie afin de provoquer la perméabilisation de cette dernière. En conclusion, la mitochondrie apparait comme un régulateur central de l'apoptose chez les mammifères, puisque de nombreux acteurs pro-apoptotiques agissent au niveau de cet organite ou en sont libérés (Tait and Green, 2013).

Chez la drosophile, l'implication de la mitochondrie semble nettement moins essentielle dans l'activation et l'exécution de l'apoptose (Figure 21). En effet, bien que le génome de drosophile code au moins deux membres de la famille Bcl-2 : Debcl et Buffy (Chen and Abrams, 2000), il a été montré que de simples ou doubles mutants nuls pour ces acteurs protéiques ne présentent aucun phénotype développemental. Ceci suggère donc que ces facteurs ne sont pas essentiels pour la mort cellulaire développementale (Sevrioukov et al., 2007). Mais d'autre part, il a été décrit dans la littérature qu'une surexpression de Debcl dans des mouches transgéniques ou de Buffy dans des cellules de drosophile conduit à une mort cellulaire ectopique (Colussi et al., 2000) (Zhang et al., 2000a) (Doumanis et al., 2007). Ces données suggèrent un rôle pro-apoptotique de ces membres de la famille Bcl-2. Pourtant, Buffy semble également avoir une fonction pro-survie dans des mouches transgéniques aussi bien au cours du développement qu'en réponse à un stress (Quinn et al., 2003), tout comme Debcl qui semble protéger les neurones de la toxicité induite par l'accumulation de chaines polyglutamines (Senoo-Matsuda et al., 2005). L'ensemble de ces travaux suggère alors que Debcl et Buffy ont à la fois des rôles pro et anti-apoptotiques. Cette dualité fonctionnelle apparait être dépendante du contexte et du tissu, rendant ainsi peu clair le rôle de ces facteurs dans la régulation de l'apoptose. Concernant l'existence d'une libération du cytochrome c dans le cytosol au cours de l'apoptose chez la drosophile, cet événement reste encore controversé (Varkey et al., 1999) (Abdelwahid et al., 2007). D'ailleurs, une potentielle interaction entre le cytochrome c et la protéine adaptatrice Dark n'est pas clairement avérée chez cet organisme, à l'inverse de ce qui se passe chez les mammifères. De plus, son implication dans la mort cellulaire semble être également dépendante du contexte et du tissu (Dorstyn et al., 2004) (Mendes et al., 2006).

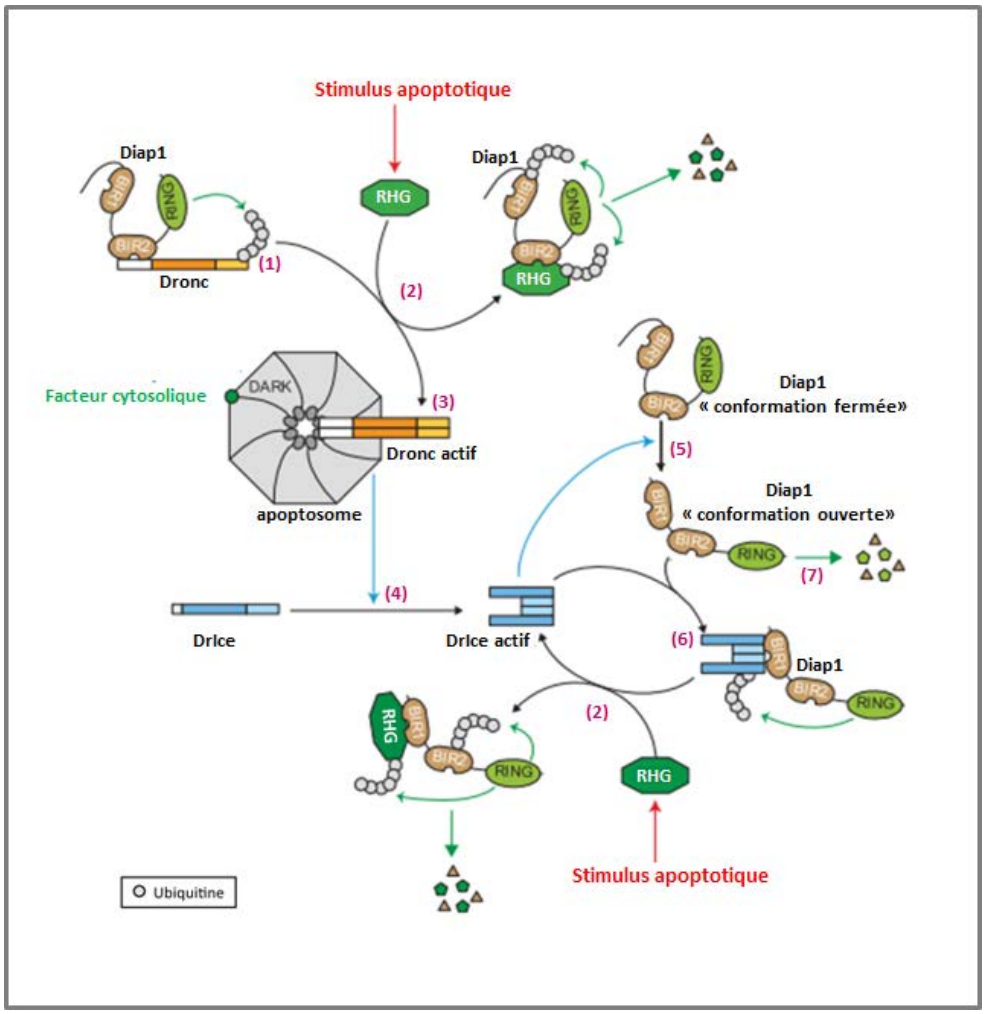


Figure 22 : Régulation de la cascade d'activation des caspases par Diap1 chez la drosophile

(1) La cascade d'activation des caspases est maintenue inactive par une interaction directe des caspases avec Diap1 (Drosophila IAPs). Le domaine BIR2 de Diap1 lie le pro-domaine de la caspase initiatrice Dronc qui est ubiquitinylée par son domaine RING. Cet évènement empêche l'assemblage de l'apoptosome. (2) En présence d'un stimulus apoptotique, l'activation des protéines de la famille RHG (Reaper, Hid et Grim) permet leur interaction avec Diap1 afin de le neutraliser, de promouvoir son auto-ubiquitinylation et sa dégradation, quelque soit sa conformation « ouverte ou fermée ». (3) Dans ce contexte, la caspase Dronc libérée peut alors participer à l'assemblage de l'apoptosome avec la protéine adaptatrice DARK et (4) activer la caspase effectrice DrIce. (5) Cette dernière permet le clivage de l'extrémité N-terminale de Diap1 qui jusqu'ici masquait son domaine BIR1 et le maintenait dans une conformation fermée. Cette accessibilité du domaine BIR1 permet à Diap1 en « conformation ouverte » d'interagir avec la forme active de la caspase DrIce. (6) Cette interaction inhibe l'activité de DrIce via une dégradation médiée ou non par l'ubiquitinylation de cette dernière (2). (7) La « conformation ouverte » de Diap1 est très fortement instable et rapidement dégradée par la machinerie du protéasome. Adapté de Berthelet and Dubrez, 2013.

En réalité, les protéines de la famille RHG (analogues fonctionnels de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 chez les mammifères) semblent jouer un rôle majeur dans la régulation de l'activité des caspases et donc dans l'induction de l'apoptose chez la drosophile. Ces protéines RHG ont été identifiées en 1994 par l'équipe de Steller, à la suite d'un crible génétique révélant que des embryons homozygotes mutants portant la déficience *H99* ne présentaient ni mort développementale ni mort induite à la suite d'irradiation (White et al., 1994). Plus tard, des études ont permis de révéler que cette région délétée contenait 3 gènes requis pour l'apoptose et codant pour Hid (Head involution defective), Grim et Reaper (White et al., 1996). La surexpression des gènes codant ces trois protéines est suffisante pour induire une mort cellulaire dépendante des caspases. Par la suite, trois autres membres de la famille RHG ont été découvert, il s'agit de Jafrac2 (Tenev et al., 2002), Sickle (Christich et al., 2002) et Omi (Challa et al., 2007) dont la caractérisation génétique est moins bien détaillée. Ces protéines RHG exercent une activité pro-apoptotique qui réside tout d'abord dans la libération des caspases liées à Diap1 *via* un phénomène de compétition d'interaction puisqu'elles présentent une meilleure affinité pour Diap1 que les caspases (Chai et al., 2000)(Yan et al., 2004). De plus, ces membres de la famille RHG favorisent également la dégradation de Diap1 soit en diminuant son niveau de synthèse sans affecter son niveau de transcription (Muro et al., 2002), soit en stimulant sa dégradation via son auto-ubiquitinylation et son adressage au protéasome (Holley et al., 2002). L'interaction des RHG avec les domaines BIR de Diap1 en font également des cibles de l'ubiquitinylation médiée par le domaine RING de Diap1, ce qui entraine leur dégradation *via* le protéasome (Olson et al., 2003) (Figure 22). En résumé, les protéines RHG constituent les antagonistes des IAPs. Enfin, il serait possible que la mitochondrie joue un rôle au cours de ce processus de mort mais de façon indépendante des membres de la famille Bcl-2 et de la libération du cytochrome c. En effet, une relocalisation de Reaper à la mitochondrie, médiée par un facteur mitochondrial, permettrait de diminuer la dégradation de Reaper et favoriserait ainsi l'augmentation de la dégradation de Diap1 afin de promouvoir l'activation des caspases effectrices DrIce et Dcp-1 (Thomenius et al., 2011). Finalement, l'activité des caspases chez la drosophile est surtout modulée par leur interaction avec Diap1 (Ryoo and Baehrecke, 2010) qui apparait donc comme le facteur clé dans ce processus de mort et dont la dégradation suffit pour activer les caspases (Igaki et al., 2002a).

Après avoir présenté quelques mécanismes apoptotiques chez la drosophile et sachant qu'en contexte de stress chronique du RE, l'UPR est capable de provoquer la mort par apoptose de la cellule, on peut se demander comment l'UPR déclenche ces programmes de mort cellulaire? Dans la mesure où la plupart de ces signalisations de mort sont spécifiquement activées via les branches PERK et IRE1 et que par ailleurs, la voie ATF6 ne semble pas impliquée dans cette réponse chez la

drosophile, je m'attacherais à ne décrire que les rôles pro-apoptotiques des voies PERK et IRE1 de l'UPR chez les mammifères et la drosophile.

2. Les conséquences pro-apoptotiques de la branche PERK de l'UPR

Nous avons vu précédemment que la branche PERK/ATF4 de l'UPR diminue fortement le niveau général de traduction de la plupart des ARNm afin de limiter le chargement de peptides *de novo*. En parallèle de ce mécanisme, quelques rares ARNm codant des activateurs transcriptionnels et présentant des cadres ouverts de lectures en 5' UTR tels que CHOP et ATF4, sont au contraire traduits plus efficacement en présence du facteur d'initiation de la traduction eiF2α phosphorylé.

a. Actions médiées par CHOP

Chez les mammifères, le facteur pro-apoptotique CHOP/Gadd153 (homologue protéique du facteur de transcription C/EBP) est faiblement exprimé en absence de stress cellulaire. En revanche, l'UPR promeut une activation à la fois transcriptionnelle et traductionnelle de ce facteur de transcription en réponse à un stress du RE. La branche PERK/ATF4 joue un rôle prédominant dans l'induction de CHOP en contexte de stress du RE (Zinszner et al., 1998) (Harding et al., 2000) (Harding et al., 2002) (Rutkowski et al., 2006) (Palam et al., 2011) et CHOP semble être une cible directe d'ATF4 (Ma et al., 2002b). L'importance de CHOP est soulignée par une étude d'Oyadomari *et al.* qui a montré que des cellules déficientes pour CHOP résistent à l'apoptose induite par un stress du RE (Oyadomari and Mori, 2004). Ces résultats ont été confirmés dans des modèles murins dans lesquels la délétion de *Chop* entraine une résistance à la mort cellulaire induite par un stress du RE en réponse à diverses contextes pathologiques (Song et al., 2008) (Pennuto et al., 2008) (Thorp et al., 2009). Toutefois, le mécanisme permettant la transition entre les réponses adaptatives et cette phase pro-apoptotique de l'UPR reste encore mal-compris.

Plusieurs modes d'action de CHOP sont décrits dans la littérature. CHOP semble réprimer l'expression de plusieurs membres anti-apoptotiques de la familles Bcl-2, sensibilisant ainsi les cellules à l'apoptose (McCullough et al., 2001). Et d'un autre côté, ce facteur transcriptionnel régule positivement certains composants pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que BIM et BAX (Puthalakath et al., 2007) (Fu et al., 2010).

Un autre mécanisme d'action de CHOP passerait par une régulation de l'état oxydatif du RE. Des travaux portant sur un modèle murin d'étude du diabète de type II, dans lequel la résistance à l'insuline provoque une augmentation de la synthèse de pro-insuline et déclenche ainsi un stress du RE et l'UPR, indiquent que CHOP régule l'expression de *ero1*α. ERO1α (ER Oxidase 1-α) est une molécule qui oxyde les protéines disulfides isomérases (PDI) résidentes dans la lumière du RE afin

que ces dernières puissent fonctionner et assurer la formation et le réarrangement des liaisons disulfures mal-formées. En lien avec son mode d'action, ERO1α produit du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la lumière du RE (Tavender and Bulleid, 2010), ce qui génère un stress oxydatif. La création d'un tel environnement hyperoxydant est décrit comme contribuant à sensibiliser les cellules à la mort cellulaire induite par un stress du RE (Marciniak et al., 2004). Ceci souligne l'implication potentielle de cette oxydase dans la régulation de la signalisation apoptotique (Grek and Townsend, 2014). De façon intéressante, les souris *Chop*$^{-/-}$ présentent une diminution du niveau d'ERO1α ainsi que de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) contribuant à une nette diminution de l'apoptose (Song et al., 2008). De plus, l'induction d'ERO1α par CHOP semble également activer l'IP3R, conduisant au relargage du Ca^{2+} du RE dans le cytosol (Li et al., 2009). Ce mécanisme contribue d'une part à l'apoptose en modulant l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux (PTP), ce qui favorise la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Tsujimoto et al., 2006). Et d'autre part, l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique favorise l'activation d'une kinase impliquée dans la transduction du signal calcique : la camodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). Cette dernière participe à la libération du cytochrome c et à l'activation de l'apoptosome (Timmins et al., 2009) (Figure 23). De façon intéressante, CHOP n'est pas conservée chez la drosophile et la seule surexpression de CHOP n'induit pas de mort cellulaire ; elle ne fait que sensibiliser les cellules à l'apoptose induite en réponse à un stress du RE (Han et al., 2013). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme pro-apoptotique dépendant du stress du RE mais indépendant de CHOP.

b. Actions médiées par ATF4

Une récente étude a mis en évidence un lien entre la voie PERK-eiF2α phosphorylé-ATF4 et les IAPs. En réponse à un stress chronique du RE, la signalisation PERK, *via* eiF2α phosphorylé, atténue d'une part la synthèse protéique *de novo* de X-linked IAP (XIAP) et d'autre part promeut la déstabilisation et la dégradation, via le protéasome, des XIAP déjà existant grâce à l'activité transcriptionnelle d'ATF4 qui régule positivement l'expression d'ubiquitine ligases par exemple. A l'opposé, CHOP n'a aucun effet sur le niveau de XIAP (Hiramatsu et al., 2014).

Le facteur de transcription ATF4 participe à l'induction de l'apoptose *via* une activation transcriptionnelle de la phosphatase Gadd34. En effet, la déphosphorylation du facteur d'initiation de traduction eiF2α permet de lever l'inhibition du niveau de traduction générale, initialement imposée par l'activation du senseur PERK. Par ce mécanisme, il y a une augmentation du taux de protéines néosynthétisées et donc potentiellement de protéines mal-conformées ce qui entretient

voire augmente le niveau de stress du RE et en même temps permet la traduction d'ARNm qui codent des protéines pro-apoptotiques (Han et al., 2013) (Figure 23).

3. Les conséquences pro-apoptotiques de la branche IRE1 de l'UPR

Comme décrit précédemment, la branche IRE1α/XBP1 joue un rôle important dans l'adaptation et la survie cellulaire en contexte de stress du RE. Pourtant, à l'opposé de ses fonctions pro-survies, des études ont également montré qu'une activation prolongée de IRE1α pouvait aussi conduire à l'apoptose (Han et al., 2009). Cette mort cellulaire médiée par la voie IRE1 fait appel d'une part au mécanisme RIDD et d'autre part à une voie Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) : la signalisation c-Jun N-terminal kinase (JNK).

a. Rôle pro-apoptotique de RIDD

Jusqu'ici, j'avais présenté l'activité endoribonucléasique d'IRE1α (RIDD) comme un mécanisme d'adaptation de l'UPR pour faire face au stress du RE, en dégradant les ARNm. Il se trouve qu'en contexte de fort stress du RE, le processus RIDD peut également avoir une fonction pro-apoptotique. En effet, il peut d'une part, dégrader les ARNm codant des chaperonnes telles que BIP/Grp78 (Hollien and Weissman, 2006) (Hollien et al., 2009) et d'autre part, réguler le niveau de traduction de facteurs pro-apoptotiques. Ainsi, l'activation d'IRE1α conduit à une rapide dégradation des microARNs responsables de la répression traductionnelle de l'ARNm codant la caspase-12 qui intervient dans l'activation de l'apoptose mitochondriale (Upton et al., 2012).

b. Rôle pro-apoptotique de la voie JNK

(1) La signalisation JNK

Plusieurs études ont décrit l'activation de la voie JNK médiée par la branche IRE1 de l'UPR afin induire un programme de mort cellulaire en réponse au stress du RE (Li and Holbrook, 2004) (Verma and Datta, 2010). Conservée au cours de l'évolution, cette voie de réponse au stress est également nommée SAPK (stress-activated protein kinase pathway) et a particulièrement retenu mon attention au cours de mes travaux. Cette signalisation est, comme son nom l'indique, composée de protéines kinases qui se phosphorylent en cascade au niveau d'un motif particulier de type : Thréonine-X-Tyrosine, pour aboutir *in fine* à l'activation du facteur de transcription Jun. La faible redondance génétique des composants de cette voie simplifie son étude chez l'organisme modèle drosophile, en comparaison avec celle des mammifères (Johnson and Nakamura, 2007) (Igaki, 2009). La voie JNK est activée par différents stimuli intrinsèques ou environnementaux tels que la présence de ROS, des dommages à l'ADN ou encore la présence de cytokines inflammatoires. D'ailleurs, la finalité

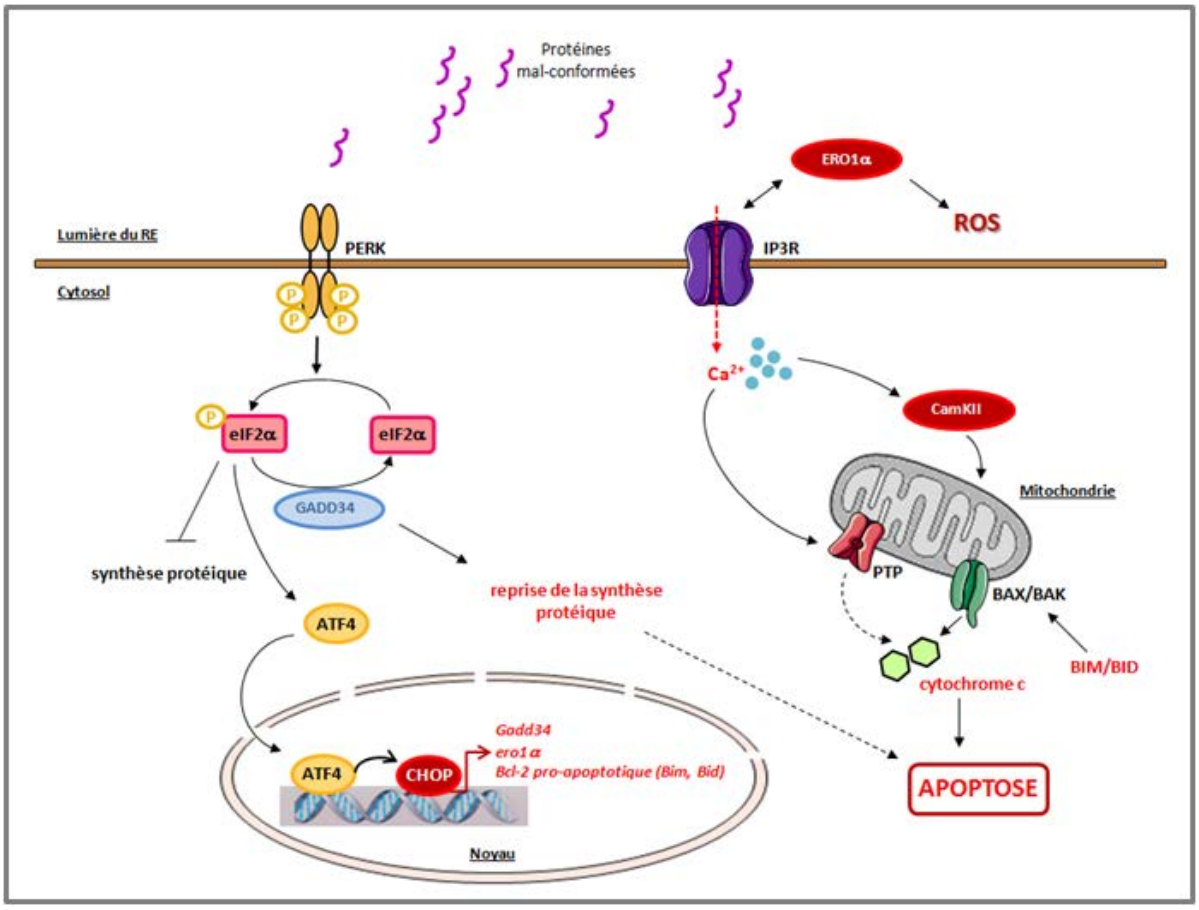


Figure 23 : Les mécanismes pro-apoptotiques de la branche PERK de l'UPR chez les mammifères

En condition de stress du RE, l'activation de PERK induit la phosphorylation de eiF2α provoquant un arrêt de la traduction générale. Cela permet également la traduction sélective du facteur de transcription ATF4 qui lui-même augmente le niveau de traduction du facteur de transcription CHOP. CHOP induit l'expression de plusieurs protéines pro-apoptotiques telles que Gadd34, ERO1α, ou encore les acteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (BIM, BID). L'expression de la phosphatase Gadd34 déphosphoryle eiF2α, restaurant ainsi le niveau global de traduction des protéines et notamment de celles impliquées dans la régulation de l'apoptose. Par ailleurs, l'augmentation de l'oxydase ERO1α dans la lumière du RE crée à la fois un environnement oxydant et une augmentation du relargage de Ca^{2+} *via* une régulation de l'IP3R. Ce calcium cytosolique active aussi bien les pores transitoires mitochondriaux PTP que la kinase CamKII, favorisant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale. De plus, l'induction transcriptionnelle de *Bim* et *Bid* favorise l'activation de BAX et BAK afin de provoquer le relargage du cytochrome c et déclencher le processus apoptotique médié par les caspases. Adapté de Urra et al., 2013.

biologique de cette signalisation est tout aussi variable (Leppä and Bohmann, 1999) (Raman et al., 2007). Selon les acteurs de cette cascade, l'amplitude et la durée de l'activation de cette voie ainsi que sa combinaison avec d'autres signalisations, la voie JNK peut notamment stimuler la prolifération cellulaire (Sabapathy et al., 2004) ou au contraire conduire à l'apoptose (Hu et al., 1999). De part cette diversité fonctionnelle, cette cascade est, chez la drosophile, impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la fermeture dorsale de l'embryon (Jasper et al., 2001), la cicatrisation des plaies (Bosch et al., 2005), la croissance tumorale (Uhlirova and Bohmann, 2006) ou la mort cellulaire (Igaki et al., 2002b). Chez l'homme, de nombreuses pathologies sont liées à sa dérégulation au cours de la réponse cellulaire au stress (Sabapathy, 2012).

- *Les acteurs de la voie JNK chez la drosophile*

La kinase la plus en aval de cette signalisation est la JNK Basket (Bsk). Elle constitue en partie avec la JNK Kinase (JNKK) Hemipterous (Hep) le cœur de la voie. Dans certaines conditions, liées au mode d'activation de la voie (Geuking et al., 2005), la JNKK MAP Kinase Kinase 4 (Mkk4) peut également phosphoryler Bsk. L'activation de Bsk conduit à son tour à la phosphorylation du facteur de transcription Jun-related antigen (Jra, homologue de Jun chez les mammifères) qui pourra ensuite s'associer avec le facteur de transcription Kayak (Kay, homologue de Fos chez les mammifères), un autre facteur de transcription. La cascade Hep-Bsk-Jra/Kay est décrite comme étant le cœur de la voie. L'association entre Jra et Kay permet de former le facteur de transcription AP-1 (Adaptor Protein complex-1) qui pourra alors réguler l'expression de ses gènes cibles.

Le gène puckered (Puc) représente une des cibles transcriptionelles de la voie et intervient dans la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négative en déphosphorylant Bsk ce qui a pour effet de désactiver cette JNK (Martín-Blanco et al., 1998) (McEwen and Peifer, 2005). Il est également intéressant de mentionner que Jra ne constitue pas le seul substrat de Bsk. Ceci explique en partie la pléthore de réponses induites par l'activation de cette signalisation. Enfin, les JNKK peuvent être activées par six JNKK kinases potentielles (JNKKK) : dTak1 (drosophila TGF-β activated kinase 1), dTakl2 (drosophila Tak1-like 2), DASK1 (drosophila Apoptosis signal-regulating kinase 1), Slipper (Slpr), dMekk1 (drosophila MEK kinase 1) et Wallenda (Wnd). En fonction du stimulus, les JNKKK sont activées par différentes protéines adaptatrices telles que dTAB2, les facteurs dTRAF1 et dTRAF2 (TNF receptor-associated factor 1 et 2) qui sont liés aux récepteurs membranaires de la famille du TNF (tumor necrosis factor), les petites GTPases Rac1, Rho1 (Ras homologous 1) ou encore Cdc42 (Cell division cycle 42) et la kinase Misshapen (Msn). De cette façon, chaque voie JNK est le résultat d'une combinaison entre une protéine adaptatrice, une JNKKK et la cascade Hep-Bsk (Figure 24). Les différentes combinaisons possibles d'acteurs de cette signalisation peuvent être considérées comme

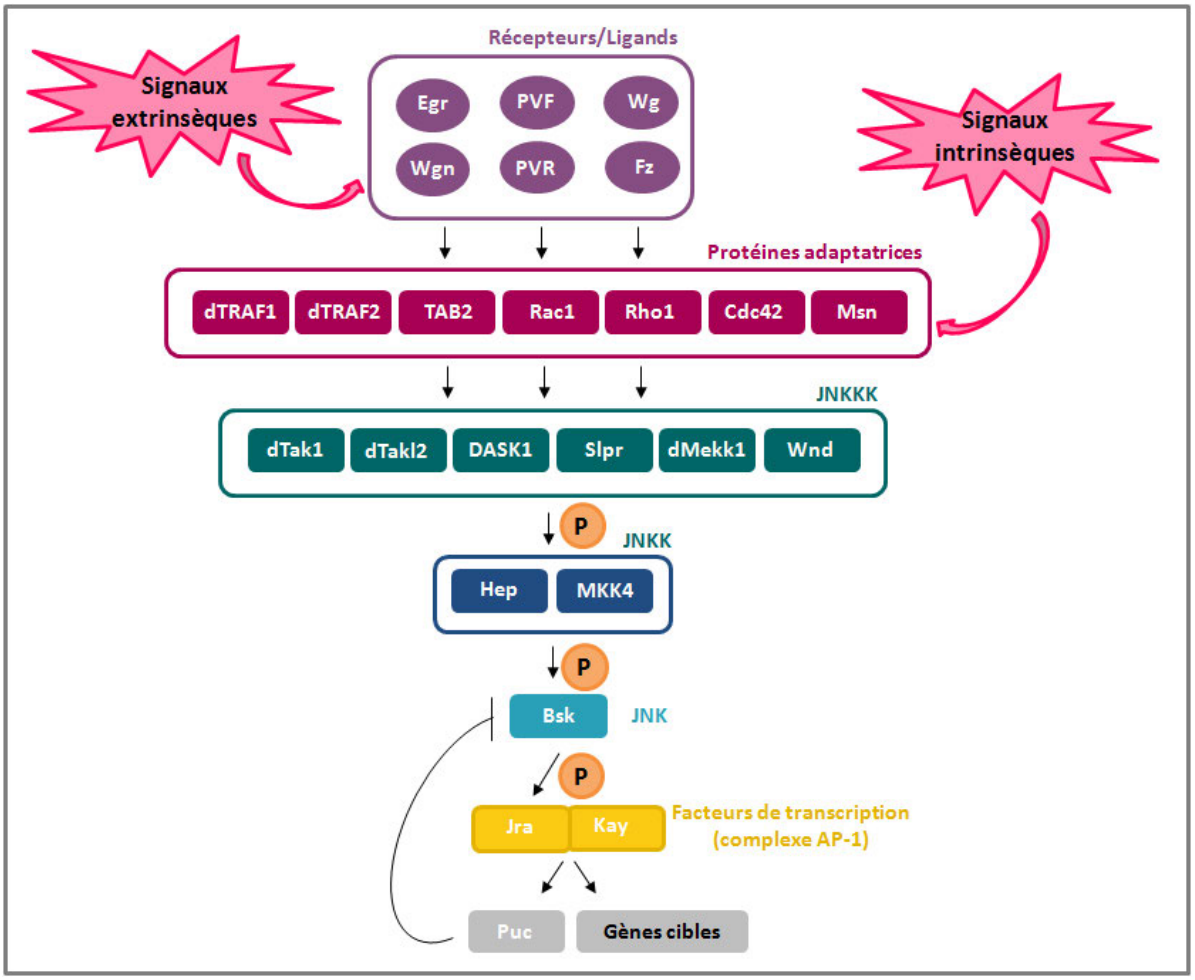


Figure 24: La signalisation JNK chez la drosophile

Cette signalisation est activée par différents couples de récepteurs/ligands localisés à la surface de la cellule. La présence de protéines adaptatrices assure la transmission du signal en activant le(s) JNKKK. Ces protéines adaptatrices détectent également les signaux intracellulaires. Les JNKKK peuvent ensuite à leur tour activer les JNKK par phosphorylation, ce qui conduira à l'activation du facteur de transcription Jra par la JNK Bsk. L'état phosphorylé de Jra lui permet alors d'interagir avec Kay afin de constituer le complexe AP-1 et réguler ainsi leurs différents gènes cibles. La phosphatase Puc est l'une de ces cibles transcriptionnelles. Elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie en déphosphorylant Bsk. Les multiples combinatoires possibles entre les différents acteurs de cette voie contribuent à la spécificité de réponse de cette signalisation. Adapté de Igaki, 2009.

étant à l'origine de la variabilité et de la spécificité des réponses activées par cette voie. La littérature met en avant l'importance du choix de la JNKKK activée dans l'effet de la voie JNK (Stronach, 2005a).

- *Les modes d'activation de la voie JNK dans le processus d'apoptose chez la drosophile*

L'activation de cette signalisation fait suite à divers signaux qui peuvent être de nature extrinsèque ou intrinsèque. En fonction de cela, les mécanismes d'apoptose induits par la voie peuvent dépendre ou non des caspases. Les signaux extrinsèques peuvent activer la voie *via* différents couples récepteur/ligand tels que Eiger/Wengen (homologue de TNF/TNFR chez les mammifères), Wingless/Frizzled (Wg/Fz) et PVF/PVR ((Platelet vascular factor/PVF receptor) homologue de PDGF/PDGFR) (Igaki, 2009). Dans ce paragraphe, je ne présenterai que le couple Eiger/Wengen car c'est le plus étudié dans la littérature. Au cours du développement *in vivo* comme en cellules S2 de drosophile, la surexpression de *eiger* conduit à une apoptose massive (Igaki et al., 2002b) (Moreno et al., 2002) et le récepteur Wengen est nécessaire pour l'induction de cette mort cellulaire (Kauppila et al., 2003). Wengen peut interagir directement avec la protéine adaptatrice dTRAF2 (Kauppila et al., 2003) (Geuking et al., 2005) qui pour être activée est ubiquitinylée via l'E2 ubiquitine ligase qui est composée de l'hétérodimère Ben/Duev1a (Ma et al., 2013). Cet événement déclenche une cascade de phosphorylation à travers la signalisation dTRAF2-dTAB2-dTak1-Msn qui conduit à l'activation du cœur de la voie JNK pour induire l'apoptose indépendamment des caspases (Geuking et al., 2005). Il semblerait également que dTRAF2 puisse subir un autre type d'ubiquitinylation qui, cette fois, serait responsable de sa dégradation. Cette modification post-traductionnelle semble pouvoir être éliminée par la *Drosophila* cylindromatosis ortholog (dCYLD) qui assure la désubiquitinylation de dTRAF2 (Xue et al., 2007).

Des signaux intrinsèques peuvent également activer une apoptose dépendant de la voie JNK. Par exemple, la cascade dTRAF1-DASK1-Hep-Bsk serait nécessaire pour une mort cellulaire dépendant des caspases induite par Rpr. Cette voie JNK serait activée lorsque Rpr conduit à la dégradation de Diap1. En effet, une étude à montrer que DIAP1 favorise la poly-ubiquitination de dTRAF1 grâce à son activité E3 ubiquitine-ligase, et donc son élimination *via* le protéasome (Kuranaga et al., 2002). Ce rôle pro-apoptotique de la signalisation JNK est également retrouvé chez les mammifères (Davis, 2000) (Weston and Davis, 2007) et notamment en contexte de stress du RE.

(2) Apoptose dépendante de la voie IRE1/JNK

IRE1α recrute la protéine adaptatrice TRAF2 à la membrane du RE en réponse à un stress RE (Urano et al., 2000). Ce recrutement est régulé par la c-Jun NH2-terminal inhibitory kinase (JIK) qui est un partenaire se liant à IRE1α et qui a pour fonction de réguler la formation du complexe IRE1α-TRAF2

(Yoneda et al., 2001). Ce complexe IRE1/TRAF2 assure le recrutement et l'activation de la JNKKK ASK1 afin d'induire l'apoptose en aval de la signalisation JNK (Nishitoh et al., 2002) (Figure 25). L'importance de ASK1 dans l'apoptose induite par un stress du RE a été montrée dans un modèle neuronal de cytotoxicité où les cellules déplétées pour ASK1 présentent une résistance au stress induit et sont incapables d'activer la voie JNK et l'apoptose (Nishitoh et al., 2002). Il semblerait que le mécanisme responsable de cette mort cellulaire soit la régulation des protéines de la famille Bcl-2 par la cascade IRE1-TRAF2-ASK1- JNK. En effet, la phosphorylation de Bcl-2 par la JNK activée pourrait engendrer une incapacité de cette dernière à retenir Bax et Bid, favorisant ainsi l'activation de l'apoptose mitochondriale (Lai et al., 2007).

4. Survie versus apoptose

Deux phases temporelles de réponse cellulaire au stress du RE sont observées chez les vertébrés. Dans un premier temps, l'UPR met en place un ensemble de mécanismes adaptatifs réduisant le flux de protéines entrant dans le RE, à travers l'activité ARNase d'IRE1 et l'inactivation par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eiF2α. Puis, une seconde vague d'évènements déclenche cette fois, une réponse massive d'ordre génique *via* la régulation des trois facteurs de transcription de l'UPR : XBP1, ATF6 et ATF4. Les cibles transcriptionelles de ces régulateurs de l'expression génique dépendent de la nature du stimulus, du type cellulaire affecté et de leur possible interaction avec d'autres facteurs de transcription. Une chronologie d'activation des branches de l'UPR, dépendante de l'intensité et de la durée du stress, a été proposée. En effet, les activités d'IRE1 et ATF6 semblent atténuées en condition de stress persistant du RE, ce qui n'est pas le cas de la voie PERK (Lin et al., 2007). D'ailleurs le maintien de la branche PERK promeut l'apoptose contrairement au maintien de la branche IRE1 sur une période équivalente qui induit de la prolifération sans mort cellulaire (Lin et al., 2009). Ces données suggèrent que le différentiel d'activation de PERK et IRE1 intervient probablement dans la détermination du destin cellulaire en condition de stress. Enfin, nous avons vu que les branches IRE1 et PERK activent de multiples cascades apoptotiques chez les vertébrés. Toutefois, ces voies d'induction de mort cellulaire après un stress du RE restent à ce jour très peu décrites chez la drosophile.

E. UPR et pathologies humaines

1. Différentes pathologies associées au RE

Puisqu'un stress chronique du RE et une activation constante de l'UPR peuvent conduire à la mort de la cellule, il n'est pas surprenant que ces conditions conduisent à des dysfonctionnements cellulaires qui peuvent s'avérer être à l'origine de pathologies humaines telles que le diabète, les fibroses

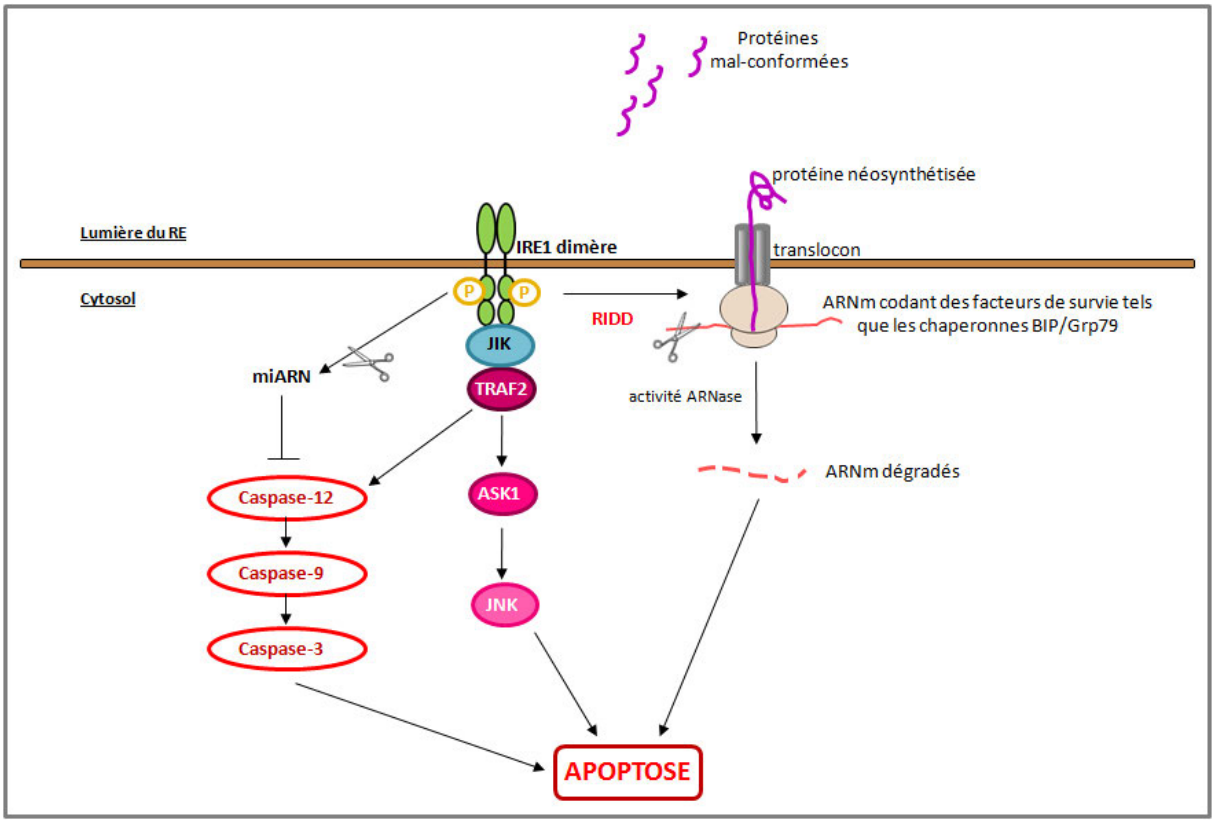


Figure 25 : Les mécanismes pro-apoptotiques de la branche IRE1 de l'UPR chez les mammifères

En contexte de stress prolongé du RE, IRE1 dégrade les ARNm *via* le processus RIDD qui peut avoir aussi une activité pro-apoptotique en dégradant les ARNm codant des facteurs de survie tels que les chaperonnes du RE. De plus, l'activité endoribonucléase d'IRE1 permet le clivage de miARN qui régulent l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que la caspase-12. Par ailleurs, le recrutement de TRAF2 par IRE1 via JIK (c-Jun NH2-terminal inhibitory kinase) intervient dans l'activation de la voie ASK1-JNK afin de promouvoir l'apoptose en condition de stress du RE. Adapté de Urra et al., 2013.

pulmonaires, les infections virales, les cancers, certaines atteintes cardiaques ou encore des maladies de type inflammatoire ou neurodégénératif. Le point commun entre ces maladies, de prime abord très différentes, est la présence de conditions intra- et/ou extra-cellulaires qui perturbent le repliement des protéines et conduisent à leur accumulation dans la lumière du RE. Ainsi, le stress du RE apparait de plus en plus comme un élément central dans la mise en place de contextes physiopathologiques (Yoshida, 2007) (Lin et al., 2008). Cette notion est appuyée par le fait que pour la plupart des maladies mentionnées ci-dessus, la manipulation génétique des composants de l'UPR a une incidence vis-à-vis de l'issue de la maladie dans divers modèles rongeurs (Oakes and Papa, 2015). Les récentes avancées dans la compréhension des circuits apoptotiques mis en jeu après un stress du RE mettent évidence des mécanismes qui pourraient permettre de relier le stress du RE à la pathogenèse et à la progression de la maladie, afin d'élaborer par la suite, de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour le moment, d'importantes questions subsistent concernant le rôle de l'UPR en tant qu'évènement déclencheur de la maladie : quels évènements de l'UPR sont activés par un stress du RE ? Quelle est la conséquence de l'activation de l'UPR au niveau cellulaire et tissulaire dans un contexte pathologique donné ? Dans les paragraphes suivants, j'ai choisi d'examiner la place de l'UPR dans deux modèles de maladies développés chez la drosophile : un modèle de dégénérescence rétinienne : l'*Autosomal Dominant Retinis Pigmentosa* (ADRP) qui provoque à long terme une perte de la vision et un modèle de cancer colorectal (CRC) touchant les cellules intestinales.

2. L'ADRP

Jusqu'à présent, la branche IRE1/XBP1 est la plus étudiée *in vivo* en contexte de perturbation des capacités de repliement des protéines au sein du RE. Un exemple bien caractérisé est celui d'un allèle mutant de *ninaE* (neither inactivation nor afterpotential E) qui provoque une dégénérescence des photorécepteurs chez la drosophile (Kumar and Ready, 1995) (Colley et al., 1995). Le gène *ninaE* code la Rhodopsine-1 (Rh1) qui fonctionne comme un senseur de la lumière dans les photorécepteurs. Certains mutants faux-sens pour *ninaE*, conduisent à une dégénérescence rétinienne comparable à celle observée chez des patients atteints d'ADRP suite à une mutation du gène codant la rhodopsine chez l'Homme (Sung et al., 1991). Bien que l'effet des allèles mutants responsables de cette pathologie chez l'Homme était supposé résulter d'un défaut de conformation de la rhodopsine, le lien entre l'UPR et la dégénérescence rétinienne induite par des mutants de rhodopsine a été établi pour la première fois grâce à des études menées sur le mutant *ninaE* ^{G69D} de drosophile (Zhang et al., 2014). L'utilisation du rapporteur XBP1-GFP a permis de montrer que la branche IRE1/XBP1 est activée dans ces photorécepteurs mutants et que la perte de XBP1 accélère la progression de la dégénérescence rétinienne. Ces données mettent en avant le rôle protecteur de cette voie de l'UPR dans ce modèle (Ryoo et al., 2007). A l'inverse, favoriser la dégradation de la Rh1 mal-conformée en

surexprimant *HDR1*, qui code une ubiquitine ligase intervenant dans la signalisation de l'ERAD, supprime la progression de cette dégénérescence chez la drosophile (Kang and Ryoo, 2009) (Figure 26).

La substitution P23H est la mutation la plus commune dans l'ADRP chez l'homme. Son équivalent P37H a été généré chez la mouche afin d'obtenir une activation équivalente de l'UPR (Griciuc et al., 2010). Ainsi, il apparait que la $Rh1^{P37H}$ de drosophile est particulièrement sensible à son environnement conformationnel dans la lumière du RE. En effet, le génome de la mouche code deux calnexines et une forme mutante de l'une d'entre elles conduit à la naissance d'adultes parfaitement viables mais présentant un défaut de maturation de Rh1 et une dégénérescence rétinienne liée à l'âge (Rosenbaum et al., 2006).

Il existe d'autres atteintes génétiques qui altèrent la conformation de Rh1 dans le RE. Récemment, un complexe protéique localisé à la membrane du RE ((EMC) ER membrane protein complex) avec une fonction jusqu'alors inconnue a été décrit. Il apparait nécessaire à la bonne conformation des protéines à multiples domaines transmembranaires telle que la rhodopsine. Ainsi, une déplétion des sous-unités de EMC dans les photorécepteurs conduit à en une Rh1 mal-conformée (Satoh et al., 2015).

L'étude de mutants affectant la conformation de la rhodopsine a permis de mettre en évidence un effet d'hormèse. En effet, bien qu'un stress excessif du RE soit à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire et d'une apoptose, des conditions modérées de stress, provoquées par une légère accumulation de rhodopsine mal-conformée, peuvent jouer un rôle protecteur face à une exposition secondaire à d'autres sources de stress. De tels effets ont été observés dans un modèle de mort cellulaire des photorécepteurs provoqué par l'expression du gène codant l'homologue de p53. Les auteurs ont trouvé qu'une mutation de *ninaA*, un gène codant une chaperonne du RE normalement requise pour la bonne conformation de Rh1, protège de la mort cellulaire induite par p53 (Mendes et al., 2009). Dans ces conditions, le degré de mal-conformation de la rhodopsine est suffisamment modéré pour éviter une dégénérescence des photorécepteurs, mais toutefois suffisant pour activer l'UPR afin d'induire des réponses adaptatives pour faire face à ce stress et améliorer la réponse antioxydante pour conférer une meilleure résistance au stress cellulaire d'une manière générale. Ce concept connu sous le nom d'hormèse implique un état pré-conditionné obtenu à la suite d'un stress modéré, non létal mais suffisant pour induire d'une part, une réaction adaptative et d'autre part, protéger la cellule d'une éventuelle deuxième exposition à un stress potentiellement plus intense (Mattson, 2008) (Matus et al., 2012).

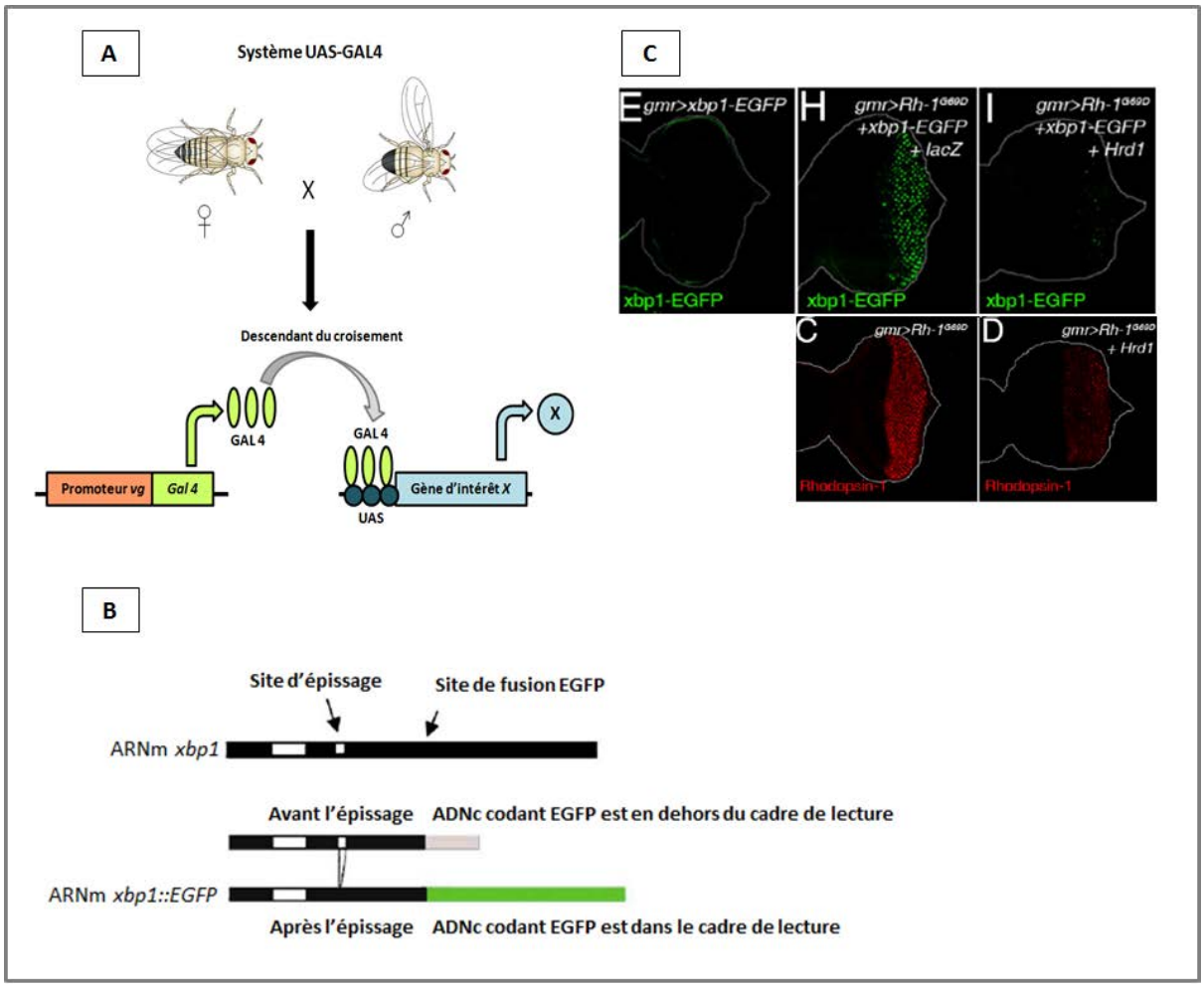


Figure 26 : L'expression de *Rh1*^{G69D} induit un stress du RE et active la branche IRE1/XBP1 dans le tissu d'œil de drosophile

A) Le système UAS-Gal4. Ce système permet le contrôle de l'expression des gènes de façon spatio-temporelle. Le gène *Gal4* est placé sous le contrôle d'un promoteur choisi pour son profil d'expression (*vestigial* (*vg*) ou Glass multimer reporter (*Gmr)* par exemple). Le facteur de transcription GAL se fixe sur les séquences promotrices UAS et induit l'activation transcriptionnelle du gène *X* placé en aval de ces dernières.

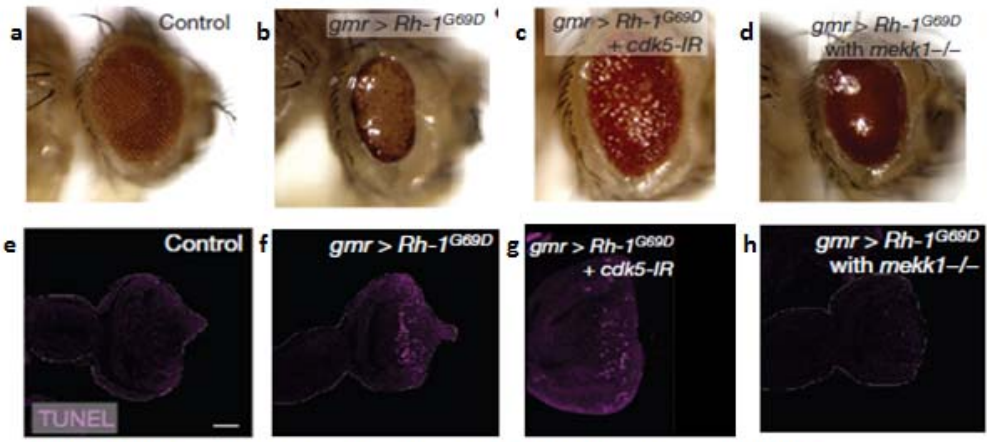
B) Représentation schématique du rapporteur xbp1::EGFP. L'ADNc codant EGFP est insérée en 3' du site putatif d'épissage d'IRE1, donnant lieu à une protéine de fusion qui perd une partie de la région C-terminale de xbp1 (en haut). EGFP est en dehors du cadre de lecture de xbp1 en absence d'épissage médié par IRE1 (au milieu), mais se retrouve dans le cadre après épissage (en bas). D'après Ryoo *et al*. 2007.

C) Le stress du RE causé par l'expression d'une forme mal-conformée de *Rh-1* est fortement supprimé par l'expression ectopique de *Hrd1* chez la drosophile. Disques imaginaux d'œil sauvage (E) ou la forme mutante Rh-1^{G69D} (H, I, C, D) et exprimant le rapporteur xbp1-EGFP (E, H, I) ou Hrd1 (I, D). Détection d'un immunomarquage anti-Rh1 (C, D), et détection du marqueur xbp1-EGFP (E, H, I). L'expression de *Rh-1*^{G69D} provoque un stress du RE (H) associée à une accumulation de Rh-1 (C). La co-expression de Hrd1 abolit le stress du RE causé par l'expression du mutant *Rh1*^{G69D} (I) et supprime l'accumulation de Rh1 (D). Génotypes: (C) *gmr-Gal4/+; UAS-Rh1*^{G69D}*/+,* (D) *gmr-Gal4/UAS-Hrd1;UAS-Rh1*^{G69D}*/+,* (E) *gmr-Gal4/+;UAS-xbp1-EGFP/+,* (H) *gmr-Gal4/UAS-lacZ; UAS-Rh1*^{G69D}*/UAS-xbp1-EGFP* et (I) *gmr-Gal4/UAS-lHrd1; UAS-Rh1*^{G69D}*/UAS-xbp1-EGFP.* D'après Ryoo *et al.* 2009.

Par ailleurs, il est important de préciser que les 3 principales branches de l'UPR sont activées en quelques heures en contexte de stress du RE, et retournent rapidement vers un état inactif grâce aux mécanismes de rétrocontrôles négatifs mis en place pour réguler ce processus. De façon paradoxale, bien qu'un certain nombre d'études implique l'UPR dans les maladies neurodégénératives, il n'existe pas de preuve évidente que les mutants Rh1 engagent directement l'activation de l'UPR comme signal de mort cellulaire. D'autre part, il est difficile d'imaginer que ces voies puissent être responsables de ces maladies dégénératives qui s'aggravent au fils du temps et se manifestent seulement au bout de quelques décennies de stress chronique du RE chez l'Homme. De façon intéressante, un crible d'ARNi pour des gènes requis dans la mort cellulaire induite par l'expression du mutant *ninaE*^{G69D}, a permis d'identifier les kinases CDK5 et MEKK1 qui ne sont pas impliquées dans les voies canoniques de l'UPR (Kang et al., 2012) (Figure 27). Ces travaux mettent en lumière le rôle d'une autre signalisation qui contribue à la mort cellulaire induite par un stress du RE et qui pourrait potentiellement impliquer le Ca^{2+} puisque la kinase Cdk5 peut être activée par un excès de Ca^{2+} cytosolique (Qu et al., 2007). De plus, une récente étude souligne le rôle de Cdk5 dans la régulation de la fission mitochondriale, événement intervenant dans la mort cellulaire. En effet, ces travaux rapportent qu'une suractivation de CDK5 augmente la phosphorylation de la Dynamin related protein 1 (DRP1), une GTPase régulant la fission mitochondriale. Cet évènement moléculaire favorise la fission mitochondriale qui est associée à la mort cellulaire (Jahani-Asl et al., 2015). Ainsi, il serait envisageable qu'une détérioration de l'homéostasie calcique associée à une dérégulation de la morphologie mitochondriale puisse être à long terme, responsables du déclenchement de mécanismes pro-apoptotiques.

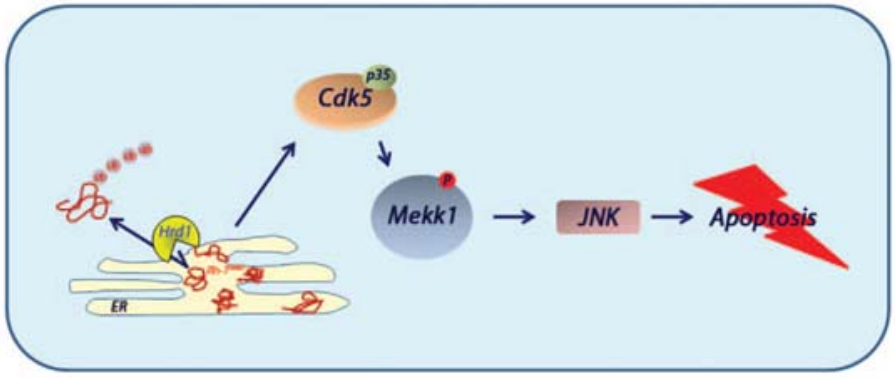
3. Le cancer colorectal (CRC)

Une dérégulation de l'homéostasie protéique du RE est communément associée à un état pathologique et plus particulièrement au développement de cancers (Ma and Hendershot, 2004) (Moenner et al., 2007) (Chevet et al., 2015). Par définition, l'apparition d'un cancer résulte d'un déséquilibre homéostatique à l'échelle du tissu. Il se caractérise également par sa capacité à fortement proliférer dans des conditions métaboliques bien spécifiques, à savoir dans un environnement de faible vascularisation créant ainsi un microenvironnement extrême, généralement pauvre en oxygène, en nutriments et particulièrement acide. Ces conditions défavorables à la survie des cellules cancéreuses provoquent un stress du RE et déclenchent l'UPR (Scriven et al., 2009) (Clarke et al., 2014) (Wang and Kaufman, 2014). Nous avons vu qu'en condition physiologique, cette réponse cytoprotective permet l'adaptation de la cellule au stress du RE, et dans le cas contraire conduit à son apoptose. Partant de ce postulat, l'intensité et la durée du stress subit par les cellules cancéreuses, devraient conduire à leur mort. Pourtant, elles semblent échapper à ce mécanisme,



Cdk5 et Mekk1 sont requis pour l'apoptose induite par l'expression de *Rh1^{G69D}*

(a-d) phénotype d'œil adulte. (a) morphologie d'un œil adulte sauvage, (b) phénotype d'œil adulte réduit causé par la surexpression de Rh1^{G69D} , (c-d) phénotype d'œil adulte partiellement sauvé en contexte Rh1^{G69D} , (c) et co-expression d'un ARNi ciblant cdk5, (d) ou en contexte perte de fonction partielle pour mekk1. (e-h) marquage de l'apoptose dans les disques imaginaux d'œil avec la technique TUNEL. (e) le disque contrôle ne présente pas d'apoptose, (f) l'expression de Rh1^{G69D} provoque une apoptose massive, (g-h) qui est fortement réduite en contexte cdk5 ARNi, (g) et en contexte perte de fonction partielle pour mekk1 (h). Génotypes : (a,e) *gmr-Gal4/+* (b,f) *gmr-Gal4/UAS-Rh1^{G69D}; +/+* (c,g) *gmr-Gal4, UAS-Rh1^{G69D}/UAS-cdk5-IR;UAS-dicer2/+* (d,h) *gmr-Gal4/UAS-Rh1G69D; mekk1^{ur-36} / mekk1^{ur-36}* . D'après Kang *et al.* 2012



Modèle de l'apoptose induite par Rh1^{G69D} dans le tissu d'oeil

Le chargement de protéines mal-conformées dans le RE active une voie pro-apoptotique qui est constituée de Cdk5 et de sa sous-unité régulatrice p35 et de Mekk1. Ces gènes sont requis pour l'activation de la JNK et de la mort cellulaire. Mekk1 est une JNKKK qui est phosphorylée par Cdk5. Bien que cette voie soit nécessaire pour l'apoptose, elle n'affecte pas le niveau global de protéines mal-conformées dans le RE. Ceci est en opposition avec l'effet de l'expression de l'ubiquitine ligase Hdr1 qui réduit la toxicité du stress, en diminuant la quantité de protéines mal-conformées dans le RE via leur dégradation par la machinerie de l'ERAD. D'après Kang *et al.* 2012

Figure 27 : Cdk5 et Mekk1 sont requis pour l'apoptose induite par l'expression de *Rh1^{G69D}*

soulignant leur faculté adaptative à pouvoir détourner l'UPR et perturber les voies de mort cellulaire associées au RE. D'ailleurs, le développement de tumeurs est souvent associé à un fort niveau d'activation de l'UPR et en particulier à une forte activité des branches IRE1 et PERK.

Un certain nombre de problématiques se pose : comment l'UPR est-elle altérée ? Et comment la machinerie moléculaire résidente dans le RE devient-elle dérégulée et impliquée dans les pathologies liées au cancer ? Quelle est la contribution de chacune des branches de l'UPR dans la mise en place de ce processus cancéreux ? La compréhension de ces mécanismes apporterait de nouvelles perspectives pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques alternatives à celles déjà existantes. Pour illustrer ces propos, j'ai choisi de vous présenter très succinctement le cas particulier du cancer colorectal (CRC).

Le CRC est l'un des cancers les plus mortels en Europe et aux Etats-Unis avec 700 000 décès par an et plus d'un million de cas recensés tous les ans. Ce cancer est principalement d'origine sporadique mais quelques formes familiales existent. Le CRC résulte d'un certain nombre d'altérations génétiques qui touchent certains oncogènes, suppresseurs de tumeurs ou encore gènes impliqués dans la stabilité de l'ADN. Ces altérations génétiques conduisent à une dérégulation de l'homéostasie intestinale, normalement maintenue par différentes voies de signalisation dont par exemple la voie Wnt qui dans 80% des formes héréditaires et sporadiques, se retrouve perturbée à cause de mutations qui affectent son régulateur négatif l'adenomatous polyposis coli (Apc) (Korinek et al., 1997) (Sansom et al., 2004). En effet, une hyperactivation de la voie Wnt initie le développement de CRC en stabilisant le facteur de transcription β-caténine qui augmente alors l'expression de facteurs de transcription tels que c-Myc et c-Fos qui sont impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du cycle cellulaire.

L'UPR semble jouer un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. En effet, en 2007 une étude a décrit un niveau élevé d'ARNm *xbp1* dans des échantillons de polypes colorectaux, de carcinomes du colon et de lignées cellulaires cancéreuses pour le colon chez l'Homme (Fujimoto et al., 2007). La particularité du tissu intestinal adulte, aussi bien chez les mammifères que chez la drosophile, est qu'il est en permanence renouvelé grâce à l'action de cellules souches intestinales (ISC). Ces ISC ont la caractéristique de pouvoir se diviser pour produire de nouvelles cellules souches (auto-renouvellement) et des cellules capables de se spécialiser (différenciation) (Micchelli and Perrimon, 2006) (Casali and Batlle, 2009). A ce jour, il existe un débat concernant le type des cellules à l'origine du CRC, et même si elles ne sont probablement pas les seules cellules à l'origine du développement d'un CRC, les ISC semblent être les cellules les plus prédisposées pour initier ce processus de cancérogenèse (Huels and Sansom, 2015).

Une étude récente a montré que l'expression d'une forme mutante de Xbp1 dans un modèle murin de CRC (*Apc*$^{mut/mut}$) accroit le risque de développer des tumeurs intestinales (Niederreiter et al., 2013). En effet, dans ce modèle, la perte de fonction de Xbp1 promeut la prolifération des ISC de façon dépendante d'IRE1. Ces travaux révèlent l'existence d'un lien entre un senseur de stress du RE et l'augmentation de la tumorigenèse intestinale. Les auteurs de cette étude proposent que la perte de fonction de Xbp1 empêche ce dernier d'exercer sa fonction régulatrice sur IRE1 qui se retrouve alors suractivé. Dans ces conditions, l'hyperactivation d'IRE1 peut potentiellement conduire à une dégradation des ARNm via le mécanisme RIDD. Les ARNm ciblés sont encore pour la plupart méconnus, mais certains seraient impliqués dans le contrôle des niches des ISC. Il apparait ainsi que Xbp1 joue un rôle de suppresseur de tumeurs.

Chez la drosophile, les ISC nécessitent l'activation de l'UPR pour induire des réponses régénératives qui conduisent à une hyperprolifération des ISC et à une dysplasie de l'épithélium intestinal lorsqu'elles sont suractivées en contexte de stress oxydatif (Wang et al., 2014). De façon intéressante, les auteurs de cette étude ont à nouveau mis en évidence le rôle protecteur de Xbp1 vis-à-vis de l'activité proliférative des ISC. Xbp1 et la signalisation ERAD, notamment médiée par Hdr1, sont suffisants et nécessaires pour limiter la prolifération des ISC de façon autonome cellulaire. Cet effet semble dépendre de l'activité de la voie JNK et du facteur de transcription CncC (cap'n collar), qui est impliqué dans la réponse antioxydante (Sykiotis and Bohmann, 2010) et est déjà identifié comme un régulateur de la prolifération des ISC (Hochmuth et al., 2011). L'ensemble de ces données suggère que Xbp1 intervient pour limiter l'activité proliférative des ISC et qu'à l'inverse une hyperactivation d'IRE1 aurait plutôt un rôle pro-tumoral. Ces résultats confortent ceux obtenus chez les mammifères.

Par ailleurs, une récente étude réalisée chez la drosophile, montre que la kinase PERK intègre les stimuli du stress RE et induit la prolifération des ISC (Wang et al., 2015a). Bien que l'activation de cette branche de l'UPR soit également nécessaire pour la régénération homéostatique intestinale, un engagement chronique de cette réponse devient délétère au cours du temps. D'ailleurs, un knockdown de PERK dans les ISCs est suffisant pour promouvoir l'homéostasie intestinale (Wang et al., 2015a).

Un certain nombre de cancers, dont le CRC fait partie, sont décrits pour être particulièrement résistants aux radio- et chimiothérapies, conduisant le plus souvent à des récidives de la maladie. Dès lors, la problématique se pose de savoir comment l'UPR peut affecter la sensibilité des cellules face aux radiations ? Il a été montré qu'un knockdown pour eiF2α confère une résistance aux radiations ionisantes dans des fibroblastes embryonnaire de souris (Kim et al., 2010). Tout comme, une

déplétion de PERK au cours du stress du RE dans des cellules de glioblastome confère également une résistance aux radiations *via* l'inhibition de la signalisation PERK/eiF2α/CHOP, qui de ce fait empêche l'inhibition de la synthèse protéique et l'apoptose médiée par CHOP (Oommen and Prise, 2013). Plus récemment , une étude menée sur notamment des lignées cellulaires humaine de cancer colorectale radio-résistantes, a montré que l'induction de l'UPR provoque une radio-sensibilisation significative des lignées cellulaires radio-résistantes, sans détailler le mécanisme moléculaire sous-jacent (Drake et al., 2015).

Enfin, il est important de mentionner qu'une perte de la capacité de repliement des protéines dans les cellules épithéliales intestinales (IEC), conduisant à une activation autonome ou non-autonome cellulaire des voies de signalisation des réponses au stress du RE, provoque une inflammation de l'intestin qui perturbe fortement l'homéostasie proliférative de cet épithélium (Kaser et al., 2011). Ces effets sont classiquement impliqués dans l'établissement de maladies inflammatoires dans ce tissu (Garrett et al., 2010) (Luo and Cao, 2015).

Pour conclure, la suractivation d'IRE1 semble stimuler la prolifération des ISCs et l'inhibition de PERK semble détourner, voire inhiber, les voies de mort, ce qui peut conférer une résistance aux radio- et chimiothérapie. Il existe peu d'études sur l'association de la voie ATF6 au développement de cancers. Néanmoins, l'expression d'ATF6 peut être nécessaire au développement tumoral de par son interaction avec les autres branches de l'UPR (White-Gilbertson et al., 2013). Enfin, en ce qui concerne le tissu épithélial, il est important de garder à l'esprit l'existence des différentes interactions entre la machinerie de l'UPR, les voies de signalisations de l'immunité innée, l'homéostasie commensale et la fonction des cellules souches qui ont un effet significatif sur la fonctionnalité du tissu et la durée globale de vie de l'organisme en question.

II. Maintien de l'homéostasie tissulaire au cours du développement

A. Coordination de la croissance tissulaire au cours du développement

De manière générale, les animaux possèdent une taille propre à leur espèce. Un des mystères fondamentaux en biologie est de savoir comment le processus développemental détermine la taille adulte idéale et comment la taille des organes et tissus augmente de façon harmonieuse avec celle de l'individu ? Malgré une multitude de travaux portant sur le sujet, ces questions restent d'actualité. Pour la plupart des organismes complexes, incluant les amphibiens, les mammifères et la mouche, la taille finale d'un organe/tissu est déterminée par le nombre et la taille des cellules qui le compose. Ainsi, pour atteindre des proportions adéquates, les animaux doivent contrôler à la fois, le taux de croissance et la durée de la période pendant laquelle cette croissance se réalise. Ces paramètres sont

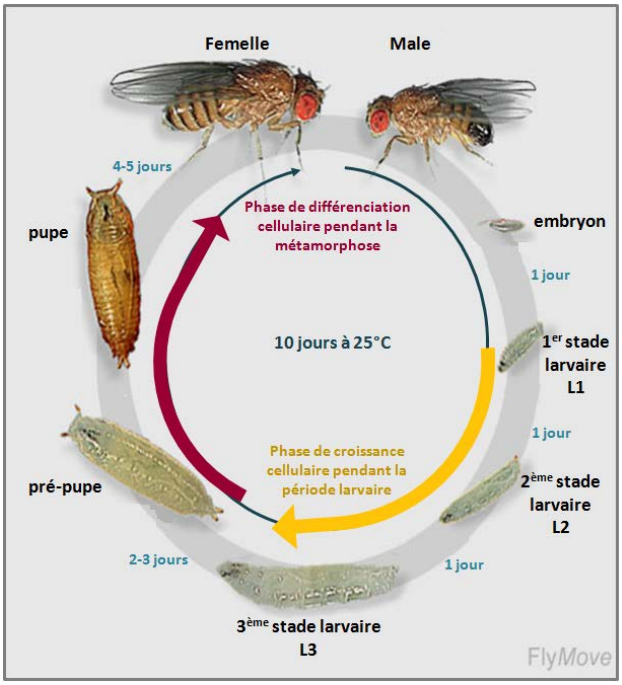


Figure 28 : Cycle de développement de la drosophile

Le cycle de développement de la drosophile est court, il ne dure qu'une dizaine de jours à 25°C. Pendant cette période, la future mouche adulte passe par différents stades. La phase embryonnaire dure 24h puis elle est suivie d'une série de trois phases larvaires (L1, L2 et L3) durant laquelle la larve subit une forte croissance cellulaire jusqu'à atteindre une taille prédéterminée idéale. Cette phase s'achève au bout de quatre-cinq jours après la ponte des œufs fécondés et est suivie par les stades pré-pupal et pupal au cours desquels les tissus embryonnaires, c'est-à-dire les disques imaginaux, vont se différencier pour former les tissus adultes après la métamorphose. Enfin la mouche adulte émerge de sa pupe vers le 10ème jour du cycle et sa durée de vie est d'environ 50 jours à 25°C.

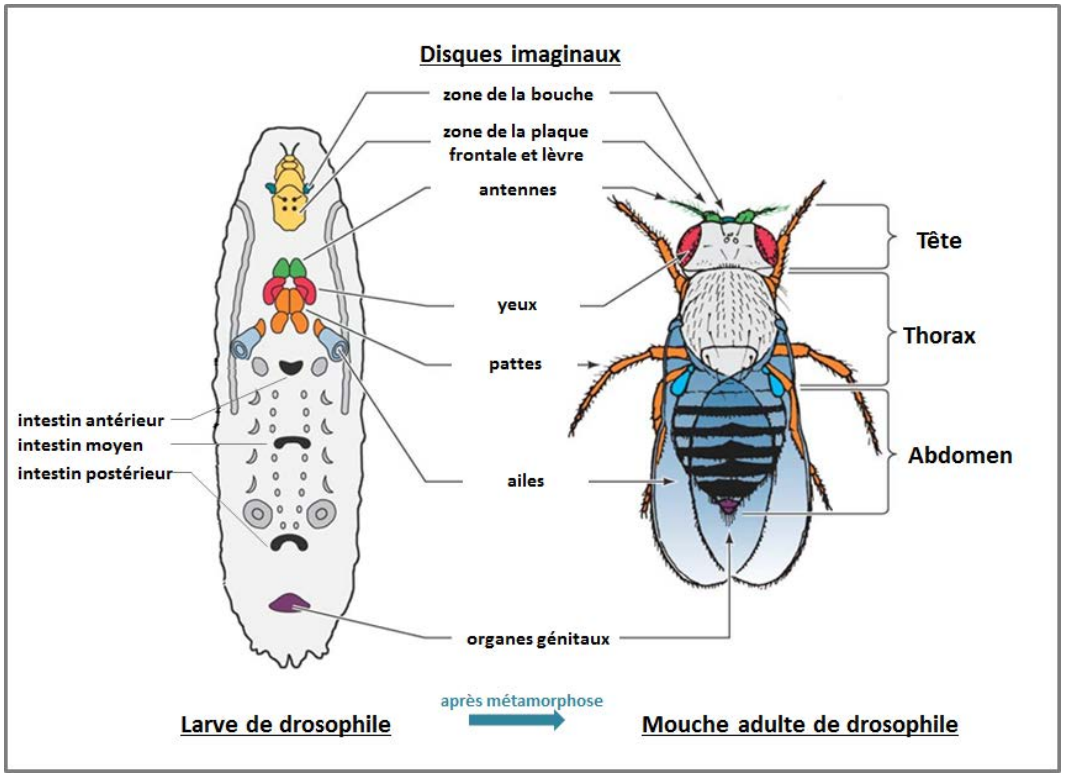


Figure 29 : Territoires présomptifs des tissus adultes de drosophile après métamorphose

Les disques imaginaux sont des structures embryonnaires initialement constituées d'une cinquantaine de cellules épithéliales. Ces dernières vont proliférer au cours du développement larvaire jusqu'à augmenter près de 1000 fois leur nombre. Au cours de la métamorphose, ces disques vont se différencier pour donner les tissus adultes.

régulés par une action combinée entre des voies de signalisation, telles que les voies insuline/TOR (Target Of Rapamycin) qui régulent le taux de croissance, et des hormones, en particulier les ecdystéroïdes qui régulent le temps de croissance ainsi que les transitions développementales entre les différentes stades larvaires et au moment de la métamorphose chez la mouche. L'organisme est ainsi capable de moduler et coordonner le temps de développement de l'ensemble des organes et tissus, qui peuvent parfois présenter des vitesses de croissance légèrement différentes. Ce point fera précisément l'objet de la première partie de ce chapitre. Dans un deuxième temps, j'aborderai quelques mécanismes qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en contexte de croissance anormale ou perturbée d'un organe au cours du développement.

Il est important de préciser que dans le cas particulier du modèle d'étude de drosophile qui est un insecte à métamorphose complète (holométabole) (Figure 28), la taille des adultes est définie par la taille finale des larves. En effet, la taille des tissus adultes est définie par la taille des disques imaginaux à la fin du développement larvaire, c'est-à-dire avant la métamorphose (Figure 29).

B. Régulation de la croissance tissulaire au sein d'un organisme

1. Contrôle environnemental

Différents facteurs environnementaux tels que le niveau d'oxygène (Callier et al., 2013), la température (Ghosh et al., 2013), les infections (Arnold et al., 2013) ou plus particulièrement l'accessibilité aux ressources nutritives (Vijendravarma et al., 2012), peuvent affecter le taux de croissance des cellules et donc la taille finale des organismes. Chez la drosophile, il existe une phase de croissance larvaire dépendante de la disponibilité en nutriments qui prédétermine la taille adulte de cet organisme avant le stade de pupaison qui est une phase de développement indépendante de l'accès aux ressources nutritives. A l'état larvaire, ce mode de croissance dépendant des ressources énergétiques a contribué à l'émergence du concept de « masse critique » (paramètre fixe, génétiquement déterminé) que doit atteindre la larve avant son entrée en pupaison pour lui assurer *in fine* une taille adulte idéale. L'entrée en stade pupal s'accompagne d'une immobilisation de la larve qui n'a alors plus accès aux ressources nutritives ; la drosophile se développe à partir de ses propres réserves. Une restriction nutritive avant d'atteindre cette masse critique, à l'état larvaire, suspend la croissance et retarde la progression développementale. Si la restriction intervient après ce point de contrôle, la drosophile ne subira pas de retard d'entrée en pupaison. En réalité, elle ne pourra seulement plus bénéficier d'une croissance supplémentaire, pendant la période de transition entre la fin du stade larvaire et le début du stade pupale, qui influence la taille définitive de l'organisme. Il est également important de mentionner l'existence d'un autre poids critique qui se réfère au « poids minimal de viabilité ». Ce dernier correspond à la taille minimale larvaire qui

suppose un stockage suffisant de nutriments pour assurer sa survie pendant la métamorphose sans nourriture additionnelle (Mirth and Riddiford, 2007) (Mirth and Shingleton, 2012a). Une restriction nutritive avant l'atteinte de ce poids minimal de viabilité provoque une mort à l'état larvaire sans tentative de réalisation d'une métamorphose. Généralement, ces deux poids sont atteints presque simultanément ce qui rend leur distinction difficile.

De façon intéressante, plusieurs études ont démontré l'importance des voies insuline et TOR pour l'évaluation de la masse critique et la détermination de la taille finale de l'organisme (Brogiolo et al., 2001) (Ikeya et al., 2002) (Kim et al., 2002) (Oldham and Hafen, 2003) (Caldwell et al., 2005) (Colombani et al., 2005) (Grewal, 2009). Ces deux voies considérées comme des senseurs nutritionnels, sont souvent regroupées en une même cascade (insuline/TOR) car elles partagent notamment un certains nombres de régulateurs clés tels que la kinase Akt et le facteur de transcription Forkhead box O (FoxO) (Figure 30). Une mutation affectant l'un de ces acteurs est suffisante pour provoquer des modifications de la taille et du nombre des cellules dans le tissu (Bateman and McNeill, 2004). L'environnement nutritionnel détermine la quantité de *Drosophila* insulin-like peptide (Dilp) produite. Il existe 8 de ces peptides, classés de 1 à 8 et dont l'expression est tissu-spécifique au cours du développement. *Dilp1, 2, 3 et 5* sont fortement exprimés dans les cellules neurosécrétrices : IPC (Insulin-Producing Cells) localisées dans le cerveau de drosophile (Figure 30). Ces peptides ligands vont se fixer sur leur récepteur insulinique (InR), qui est unique chez la drosophile, afin d'activer une cascade de signalisation dont les effecteurs ont pour effet de promouvoir la prolifération et la croissance cellulaire chez les larves bien nourries. Une ablation des IPC conduit à un phénotype de taille adulte réduite mais néanmoins normalement proportionnée. Ceci est lié à une réduction de la taille et du nombre des cellules (Rulifson et al., 2002). Cette étude met en évidence l'importance de la sécrétion des Dilp par les IPC dans la régulation de la croissance.

La sécrétion des Dilp au niveau des IPC est régulée par le corps gras qui représente un tissu de stockage et sert de senseur vis-à-vis de la disponibilité en nutriments. D'une part, la voie TOR contrôle la sécrétion par le corps gras d'un facteur non identifié et nommé fat body-derived signal (FDS) qui stimule les IPC pour libérer les Dilp. D'autre part, ce même tissu peut aussi sécréter, par un mécanisme inconnu, un peptide signal similaire aux cytokines de type I : Unpaired 2 (Upd2) qui est un des ligands de la voie JAK/STAT. Cette signalisation est alors activée au niveau d'une population neuronale de type GABAergique située dans le cerveau, qui conduit indirectement à la sécrétion des Dilp par les IPC (Rajan and Perrimon, 2012) (Figure 30). En condition de restriction nutritive, la croissance se stoppe et les Dilp ne sont plus sécrétés, ils s'accumulent dans les IPC (Géminard et al., 2009) (Rajan and Perrimon, 2012).

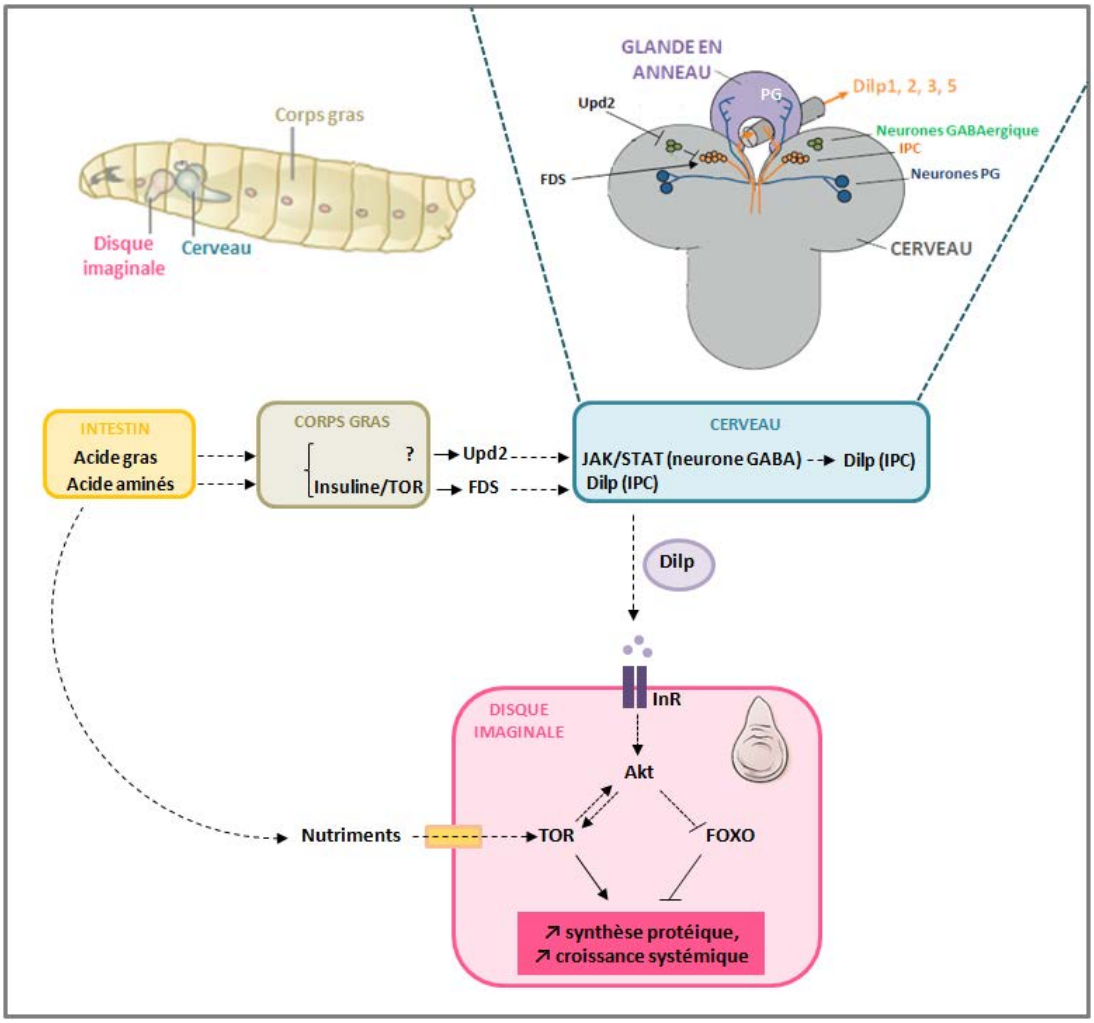


Figure 30 : Interactions physiologiques entre les tissus larvaires et les disques imaginaux afin de contrôler la croissance chez la drosophile

Afin d'assurer une croissance optimale et harmonieuse, la larve doit coordonner l'état des réserves nutritives et la croissance cellulaire avec l'entrée en métamorphose. Les nutriments absorbés par l'intestin ne sont pas les seuls signaux qui déclenchent la croissance cellulaire, différents peptides dénommés Dilp assurent l'activation de la voie insuline dont l'action est de promouvoir la prolifération et la croissance cellulaire. L'activité de cette voie est coordonnée avec l'état des ressources nutritives qui sont détectées par le corps gras (analogue du foie et des tissus adipeux chez les vertébrés). Afin de contrôler la croissance systémique, le cerveau et la glande en anneau forment un complexe qui intègre l'ensemble des signaux provenant des différents tissues larvaires et notamment ceux provenant du corps gras. Ce dernier, produit des signaux FDS qui sont liés à l'activité de la voie TOR et du signal Upd2 (via un mécanisme encore inconnu) pour renseigner le cerveau sur la disponibilité des ressources nutritives et le statut métabolique de la larve. Ces signaux vont agir respectivement de façon directe ou indirecte (via l'action inhibitrice d'Upd2 sur les neurones GABAergiques) sur les IPC pour induire la sécrétion des Dilp 2, 3, 5. Ces ligands pourront alors activer leur récepteur InR au niveau des tissus périphériques larvaires et activer ainsi une cascade de phosphorylation qui permet notamment l'activation de la kinase Akt. Cette dernière phosphoryle le facteur de transcription FOXO, dans le but d'empêcher sa localisation nucléaire et donc l'expression de ses cibles transcriptionnelles qui s'opposent à la croissance cellulaire. Akt peut également activer TOR qui favorise la synthèse protéique et la croissance cellulaire. *Abréviations : Dilp : Drosophila insulin-like peptide, FDS : fat body-derived signal, TOR : target of rapamycin, Upd2 : Unpaired, IPC : insulin-producing cell, InR : Insulin Receptor, FOXO : Forkhead box O, PG : prothoracic gland*

2. Contrôle hormonal

a. L'ecdysone

Les signaux nutritifs ne sont pas les seuls à moduler la croissance des tissus. Le système endocrinien de la larve, qui est constitué du cerveau, de la glande prothoracique (PG) qui est localisée dans la glande en anneau, assure la production d'hormones spécifiques qui sont essentielles et requises pour réguler ce processus développemental. L'une d'entre elles est l'hormone stéroïdienne 20-hydroxyecdysone (20E) qui contrôle les transitions développementales et régule donc la durée des phases de croissance cellulaire (Thummel, 2002). Cette hormone est produite à partir de cholestérol et fait intervenir toute une cascade d'enzymes qui regroupe notamment les membres de la famille Halloween (Gilbert et al., 2002) (Gilbert and Warren, 2005). Son précurseur, l'ecdysone, est synthétisé au niveau de la PG. Une fois sécrétée dans l'hémolymphe, cette hormone est convertie en sa forme biologiquement active : la 20-hydroxyecdysone (20E) pour agir au niveau des tissus périphériques.

Lorsqu'en début de troisième stade larvaire (L3) la masse critique est atteinte, le cycle de développement progresse vers la pupaison et ceci coïncide également avec la sécrétion périodique d'une série de trois faibles pics d'ecdysone (Warren et al., 2006). Même si leur rôle n'est pas totalement compris, ces pics d'ecdysone contribuent à l'arrêt de la prise alimentaire par les larves en croissance et initient les changements physiologiques et comportementaux nécessaires pour transformer une larve L3 en recherche de nourriture, en une pupe immobile qui ne pourra plus se nourrir. L'évènement majeur et définitif qui assure cette transition est un fort pic d'ecdysone en fin de stade L3 qui déclenche la pupaison et initie la métamorphose (Figure 31). Le mode d'action de l'ecdysone passe par sa fixation sur un récepteur hormonale nucléaire hétérodimérique composé de deux récepteurs : Ecdysone Receptor (EcR) et Ultraspiracle (Usp) (Yao et al., 1992) (Yao et al., 1993) (Talbot et al., 1993). Ces derniers activent transcriptionnellement des gènes qui régulent les changements morphologiques, physiologiques et comportementaux liés à la mue et la métamorphose (Gilbert et al., 2002) (Yamanaka et al., 2013). Cette réponse à l'ecdysone inclut un arrêt de la croissance systémique (Riddiford, 1993) et une destruction des tissus larvaires obsolètes en induisant des acteurs de la mort cellulaire (Baehrecke, 2000). Elle active également des acteurs impliqués dans la morphogenèse et la différenciation des disques imaginaux qui seront à l'origine des tissus adultes après la métamorphose (Siaussat et al., 2007).

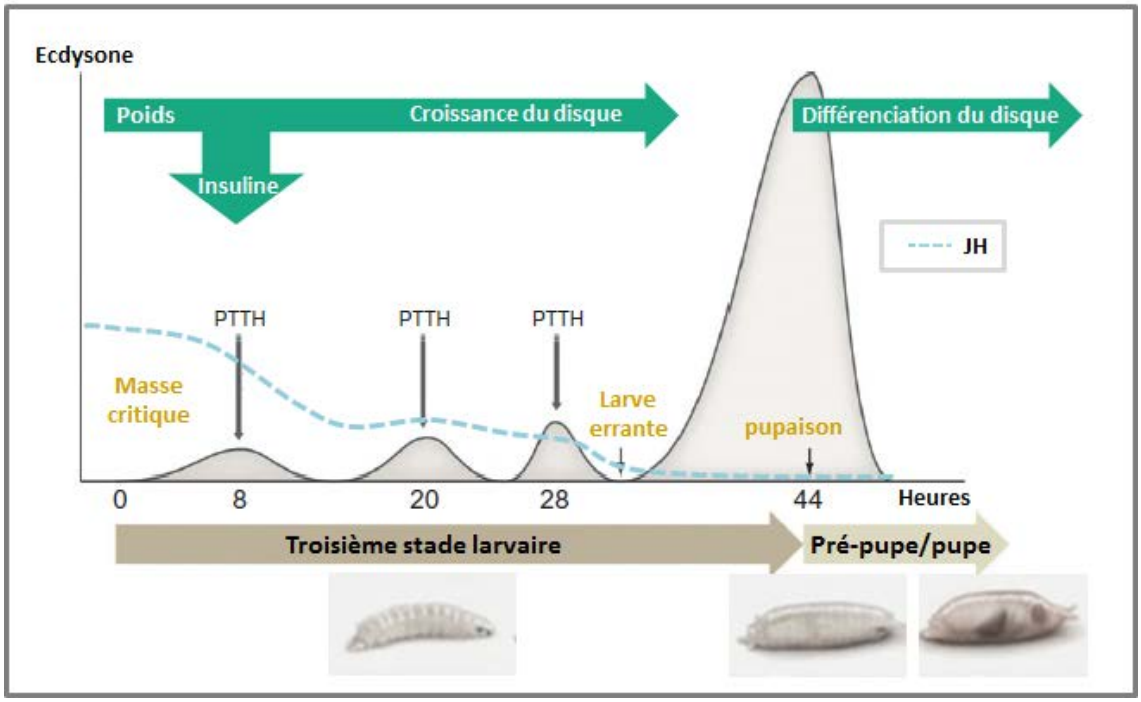


Figure 31 : Points de contrôles du développement avant la métamorphose

Dans les stades larvaires précoces, l'accumulation de nutriments permet à la larve de croitre et d'atteindre une masse critique prédéfinie qui est notamment dépendante de la production d'insuline. Cette phase de croissance est également favorisée par la circulation de l'hormone juvénile JH. L'atteinte de cette masse critique constitue un premier point de contrôle qui autorise la poursuite du cycle de développement *via* notamment une baisse de la quantité de JH qui jusqu'ici avait pour rôle d'antagoniser la sécrétion du neuropeptide PTTH. Dès lors, le cerveau de la larve peut sécréter PTTH afin que ce dernier puisse rythmer et stimuler la sécrétion de l'ecdysone. Ainsi, une série de faibles pics hormonaux d'ecdysone sont observés au cours du troisième stade larvaire et participent à la progression développementale, amenant la larve à devenir « errante » c'est-à-dire à chercher un site pour s'immobiliser et s'empuper. Enfin, l'ultime point de contrôle qui assure la transition entre la fin du troisième stade larvaire et la métamorphose, est un fort pic d'ecdysone en fin de stade larvaire qui déclenche l'entrée en pupaison et donc initie la métamorphose. *Abréviations : JH : Juvenile Hormone, PTTH : prothoracicotropic Hormone.* Adapté de Rewitz et al., 2013.

b. Régulation de la synthèse de l'ecdysone dans la PG

(1) La voie insuline/TOR

Une fois la masse critique atteinte, la synthèse de l'ecdysone est en partie régulée par la voie insuline/TOR qui, en apportant, des informations sur le statut nutritionnel de la larve au niveau de son cerveau, en profite pour réguler positivement l'expression des enzymes impliquées dans la conversion du cholestérol en ecdysone au niveau de la PG (Caldwell et al., 2005) (Colombani et al., 2005) (Mirth et al., 2005). Ce lien apporte un mécanisme de couplage entre le statut nutritionnel et la sécrétion d'une hormone qui contrôle les transitions développementales. En accord avec ces données, une augmentation de l'activité de la voie insuline dans les IPC est suffisante pour induire une sécrétion prématurée de l'ecdysone et déclencher une pupaison précoce conduisant à un phénotype adulte de taille réduite (Walkiewicz and Stern, 2009). A l'inverse, une répression de cette voie diminue la concentration en ecdysone circulante en début de stade L3, ce qui cause un retard d'entrée en pupaison sans affecter le processus de métamorphose (Caldwell et al., 2005) (Mirth et al., 2005) (Layalle et al., 2008). Ainsi, la voie insuline/TOR semble réguler la croissance relative des tissus *via* à la fois une action directe sur ces derniers et une action indirecte médiée par une régulation de la synthèse hormonale de l'ecdysone au niveau de la PG.

(2) La voie PTTH/MAPK et son antagoniste la JH

Il se trouve que la synthèse et la sécrétion de l'ecdysone au niveau de la PG sont également régulées par une autre signalisation qui dépend de l'hormone prothoracicotropique (PTTH). Ce neuropeptide est synthétisé par une paire de neurones (neurones PG) située dans chacun des lobes du cerveau, et qui innervent la PG. PTTH se lie sur le récepteur tyrosine kinase Torso situé au niveau de la PG (Rewitz et al., 2009) et de cette façon conduit à la phosphorylation et à l'activation d'un certain nombre d'intermédiaires dont la MAPK Erk qui favorise l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ecdysone (Gibbens et al., 2011). Ainsi, la voie PTTH/Erk MAPK contribue à la production d'un signal développemental qui stimule la biosynthèse de l'ecdysone avant chaque mue afin de favoriser la progression des stades développementaux (McBrayer et al., 2007) (Figure 31). D'ailleurs, une ablation génétique des neurones PG provoque un retard d'entrée en métamorphose. Cependant certaines larves peuvent néanmoins entrer en pupaison et elles présentent, après la métamorphose, un phénotype de taille adulte augmentée qui est le fruit d'un prolongement de la phase de croissance durant laquelle les larves pouvaient se nourrir (McBrayer et al., 2007). Ainsi, PTTH n'est pas nécessairement requise pour la métamorphose mais elle est plutôt impliquée dans le contrôle du timing de cette phase et donc influence la taille finale des organismes. Il est important de préciser qu'une restriction nutritionnelle n'affecte pas le niveau de PTTH, cette signalisation ne fait

pas de lien entre la croissance cellulaire et l'environnement nutritionnel comme nous avons pu le voir avec la voie insuline/TOR. En réalité, la voie PTTH communique surtout une information d'ordre temporelle qui permet au cerveau de la larve de rythmer l'expression de l'ecdysone.

De façon intéressante, l'hormone PTTH n'est pas sécrétée tant que la larve n'a pas atteint sa masse critique. Des travaux ont montré que lorsque ce point de contrôle est atteint, une hormone de croissance, jusqu'ici circulante dans l'hémolymphe, disparait : il s'agit de l'hormone juvénile (JH) (Mirth and Riddiford, 2007) (Hiruma and Kaneko, 2013). Comme son nom l'indique, JH maintien le développement juvénile des insectes en favorisant la prolifération cellulaire et en faisant perdurer la phase de croissance dépendante du statut nutritionnel des larves (Mirth and Shingleton, 2012b). Même si le mode d'action de JH dans la régulation de la production d'ecdysone chez la drosophile n'est pas bien défini, il semble que la baisse de quantité circulante de cette dernière, une fois la masse critique atteinte pendant le stade larvaire, autorise une libération de PTTH par le cerveau afin de stimuler la synthèse de l'ecdysone et promouvoir la métamorphose (Truman and Riddiford, 2007) (Figure 31). Ainsi, JH qui est sécrétée à partir des *corpora allata* (CA) (glandes endocrines situées à l'arrière du cerveau) antagonise la production d'ecdysone en réprimant la sécrétion de PTTH.

(3) La voie TGFβ/Activine

Une récente étude a révélé l'existence d'une troisième voie de régulation de la synthèse de l'ecdysone. En effet, l'inhibition de la voie TGFβ/Activine, spécifiquement dans la PG, provoque un arrêt développemental à l'état larvaire, qui est causé par une perte d'induction de la synthèse de l'ecdysone (Gibbens et al., 2011). En réalité, cette signalisation assure l'expression des récepteurs des voies PTTH et insuline/TOR, respectivement Torso et InR. Voies qui sont elles-mêmes respectivement impliquées dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des enzymes qui assurent la biosynthèse de l'ecdysone dans la PG. Ainsi, la PG apparait comme un centre décisionnaire pour l'orchestration des transitions développementales, où la voie de l'activine module et permet une interaction synergique ente les signalisations insuline/TOR et PTTH/Erk (Figure 32).

C. Quelques mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire

Comme décrit précédemment, la croissance d'un tissu est finement régulée par un ensemble de processus qui lui permettent d'acquérir une forme et une taille idéale afin que ce dernier puisse assurer sa fonction. Ce maintien de l'intégrité tissulaire est essentiel pour la survie des organismes aussi bien au cours de leur développement qu'à l'âge adulte. Lorsqu'un tissu est endommagé ou qu'il est soumis à un stress, les cellules défectueuses subissent très souvent une apoptose. Ceci a pour conséquence de provoquer un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire. Afin de corriger cet état

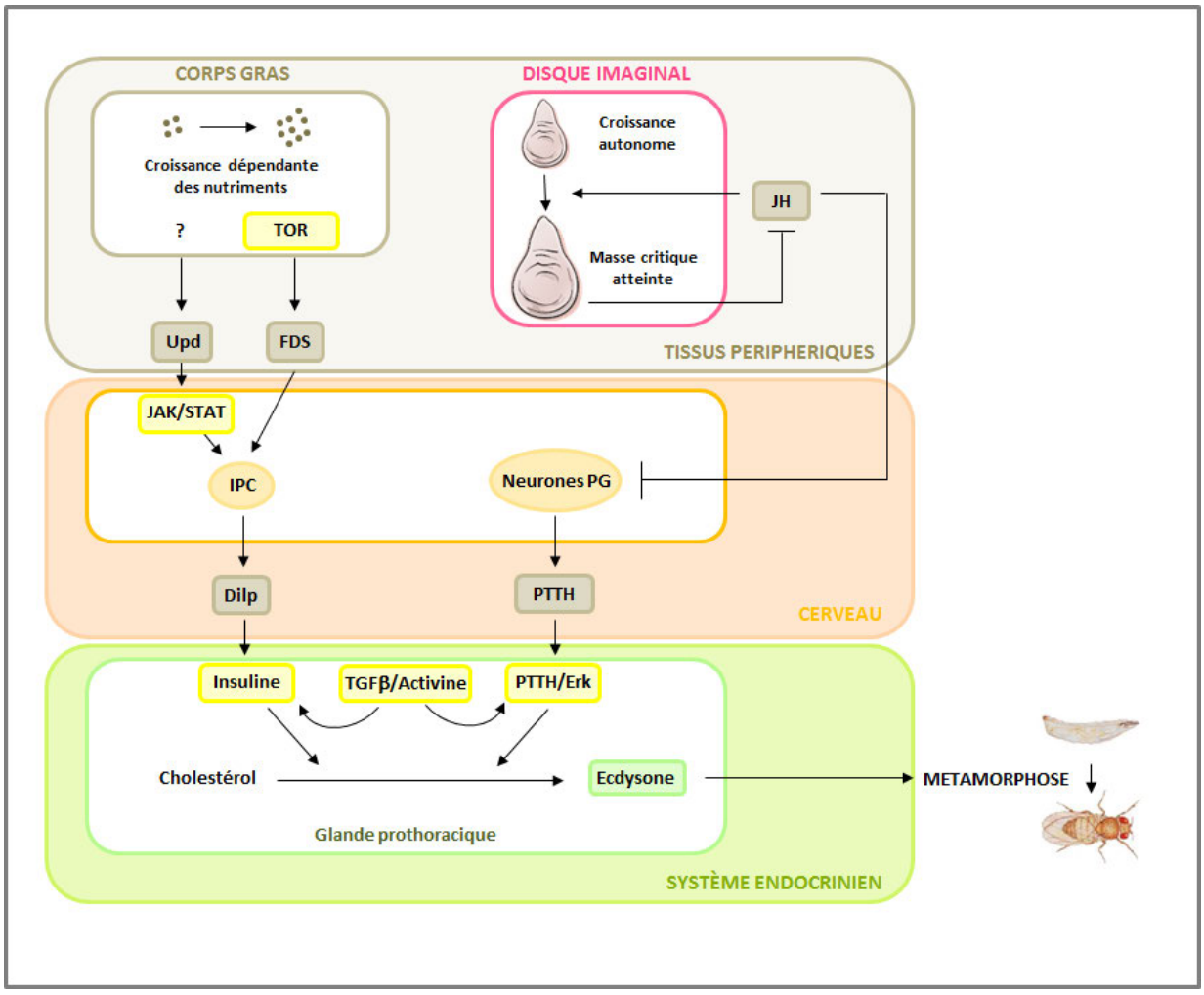


Figure 32 : La glande prothoracique (PG), le centre intégrateur et décisionnaire pour la progression développementale

Le corps gras agit comme un senseur nutritionnel qui coordonne la prise alimentaire avec la croissance systémique et la cinétique développementale. En condition environnementale favorable pour la croissance, le corps gras sécrète des signaux (FDS et Upd) qui stimulent la libération des Dilp 2, 3, 5 par les cellules IPC dans le cerveau de la larve, afin qu'ils agissent au niveau de la PG pour favoriser la synthèse et la sécrétion d'ecdysone à partir de cholestérol. En plus du statut nutritionnel de la larve, le programme développemental détecte également l'état de croissance des disques imaginaux. Lorsque ce paramètre est validé, la sécrétion de PTTH par le cerveau de la larve, jusqu'ici inhibée par l'hormone juvénile (JH), favorise la libération de l'ecdysone au niveau de la glande prothoracique. Enfin, au niveau de la PG, la voie TGFβ/Activine assure la synthèse des récepteurs des voies de l'insuline et de PTTH, qui sont requises pour la sécrétion de l'ecdysone, l'hormone qui assure l'initiation de la métamorphose. *Abréviations: TOR: target of rapamycin, Upd: Unpaired, FDS: fat body-derived signal, IPC: insulin-producing cell, Dilp: Drosophila insulin-like peptide, JH: Juvenile Hormone, PG: prothoracic gland, PTTH: Prothoracicotropic Hormone.* Adapté de Rewitz et al., 2013.

défavorable pour la survie du tissu et de l'organisme, des réponses cellulaires sont induites par les cellules endommagées elles-mêmes ou par les cellules saines du tissu environnant. Cette capacité à remplacer ou reconstruire la partie endommagée d'un organe/tissu, pour au final retrouver un organe/tissu pleinement formé et parfaitement fonctionnel, est la définition du processus de régénération. Il est important de préciser que ce processus opère via différents mécanismes qui dépendent du stade développemental, de la nature du tissu et de la blessure et qu'il semble conservé au cours de l'évolution, aussi bien chez l'hydre, que la souris ou encore la drosophile. D'ailleurs chez la larve de drosophile, le disque imaginal est un modèle particulièrement utilisé pour étudier les mécanismes impliqués dans la régénération. En effet, Hadron et ses collaborateurs ont réalisé des expériences d'ablation d'une partie du disque imaginal d'aile, qu'ils ont ensuite transplanté dans l'abdomen d'une femelle adulte et ils ont pu constater une régénération du disque initialement fragmenté (Hadorn and Buck, 1962) (Hadorn, 1968). Plus récemment, une ablation génétique via l'expression transitoire de gènes pro-apoptotiques tels que *reaper, hid* ou *eiger* au sein de ces tissus en développement, constitue également un autre modèle d'étude de la régénération tissulaire (Smith-Bolton et al., 2009) (Bergantiños et al., 2010) (Herrera et al., 2013). Grâce au développement de modèles d'étude de la régénération, certains mécanismes de compensation ont pu être mis en évidence. Ainsi, l'apoptose n'apparaît plus seulement comme une voie qui assure l'élimination des cellules endommagées, elle permet également de stimuler la prolifération des cellules voisines (Martín et al., 2009a) (Mollereau et al., 2013). L'apoptose peut aussi induire une réponse systémique chez la drosophile, en modulant cette fois le temps de développement (Hussey et al., 1927) (Halme et al., 2010) (Mirth and Shingleton, 2012a). Enfin, une étude récente menée sur la drosophile indique que des cellules en état post-mitotique peuvent subir une croissance cellulaire hypertrophique sans division cellulaire afin de contribuer à la réparation des tissus endommagés (Tamori and Deng, 2014). Ce mécanisme semble reposer sur la détection d'une perte de volume tissulaire indiquant ainsi la présence d'espaces intercellulaires inoccupés (Neufeld et al., 1998) (Lecuit and Le Goff, 2007). Dès lors, les cellules du disque imaginal, qui ne peuvent plus se diviser, convertissent le cycle mitotique en cycle d'endoréplication via l'activation de la voie de l'insuline, pour ne pas perturber la croissance globale et la structure du tissu en développement (Figure 33). Seuls les deux premiers mécanismes évoqués seront développés dans la suite de chapitre.

1. La prolifération compensatoire

En 1977, Haynie et Bryant ont mis en évidence la capacité de régénération du disque imaginal d'aile. En effet, l'irradiation de ce dernier au troisième stade larvaire provoque une perte massive par apoptose de 40 à 60% des cellules qui constituent le tissu. Toutefois, les auteurs ont pu constater, à l'issu du développement larvaire, que les adultes présentaient des ailes parfaitement normales

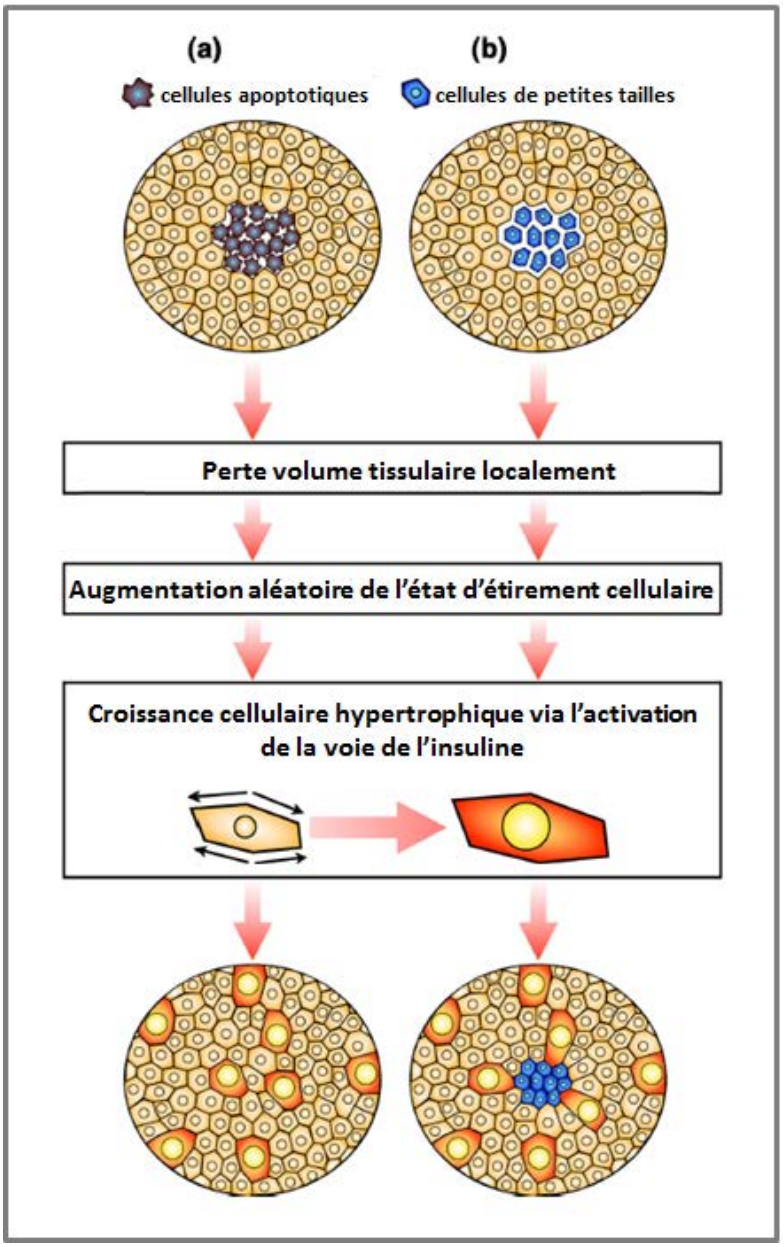


Figure 33 : Modèle de croissance cellulaire compensatoire de type hypertrophique (CCH) dans des cellules épithéliales post-mitotiques

La CCH est induite par une perte locale du volume tissulaire résultant (a) d'une mort cellulaire induite par l'expression de gènes pro-apoptotiques ou (b) d'un défaut de croissance entrainant une petite taille des cellules. Dès lors, une augmentation aléatoire de l'étirement cellulaire se met en place via l'activation de la voie insuline dans les cellules environnantes, afin de combler l'espace inoccupé entre les cellules. Ce mécanisme contribue à maintenir l'intégrité d'un tissu. Adapté de Tamori and Deng, 2014.

(Haynie and Briant, 1977). En réalité, la perte cellulaire a été compensée par une prolifération additionnelle médiée par les cellules survivantes du tissu. En d'autres termes le nombre de cellules qui se sont divisées a égalé le nombre de cellules apoptotiques afin de maintenir l'équilibre entre mort et division cellulaire au sein de ce tissu. Ce processus qui permet de restaurer un tissu endommagé afin qu'il recouvre sa taille, sa structure et sa fonction d'origine est connu sous le nom de prolifération compensatoire. Le signal à l'origine de l'induction de cette prolifération est totalement inconnu. Initialement, une hypothèse émise était qu'il dérivait au moins en partie des cellules qui mourraient. Dans la mesure où ces dernières sont rapidement éliminées du tissu, il a fallu développer un système modèle qui permette d'étudier cette question, il s'agit des modèles de cellules « undead » (Figure 34).

a. Le modèle de cellule « undead »

Ce système de cellules « undead » repose sur l'initiation du processus de mort cellulaire et du blocage de son exécution, afin de maintenir ces cellules en vie (Huh et al., 2004) (Ryoo et al., 2004) (Pérez-Garijo et al., 2004) (Wells et al., 2006). Ceci est possible grâce à l'inactivation très en aval de la cascade apoptotique *via* l'expression de *p35*, un inhibiteur des caspases effectrices DrIce et Dcp-1. Générer de telles cellules conduit à un phénotype d'hyperplasie tissulaire chez l'adulte qui illustre un phénomène de surprolifération cellulaire en réponse à ce type particulier de cellules apoptotiques.

La caractérisation de ce modèle d'étude a montré une expression ectopique des morphogènes *decapentaplegic* (*dpp*) et *wingless* (*wg*) qui agissent comme des mitogènes afin de promouvoir la prolifération des cellules saines dans le disque imaginal d'aile de drosophile (Pérez-Garijo et al., 2004) (Pérez-Garijo et al., 2005). Dans la mesure où ces cellules « undead » ne sont pas éliminées du tissu, elles produisent ces mitogènes indéfiniment tant que le stimulus apoptotique persiste. Ceci explique que les cellules environnantes prolifèrent de façon non restreintes et conduisent alors à un phénotype d'hyperplasie (Morata et al., 2011). Ces données sont confirmées par l'utilisation de mutants perte de fonction pour *dpp* et *wg* qui réduisent significativement la surprolifération des cellules voisines ainsi que le phénotype adulte d'hyperplasie (Ryoo et al., 2004) (Pérez-Garijo et al., 2009). Ce modèle d'étude a également permis de mettre en évidence l'implication de la signalisation JNK dans la régulation de ce phénomène de prolifération compensatoire. En effet, l'inhibition de la voie JNK dans ce modèle réduit considérablement la croissance cellulaire conduisant ainsi à une taille du disque normale (Ryoo et al., 2004). Cette signalisation apparaît en fait nécessaire pour l'expression autonome et ectopique des morphogènes *wg* et *dpp*, en contexte cellulaire « undead » (Pérez-Garijo et al., 2009).

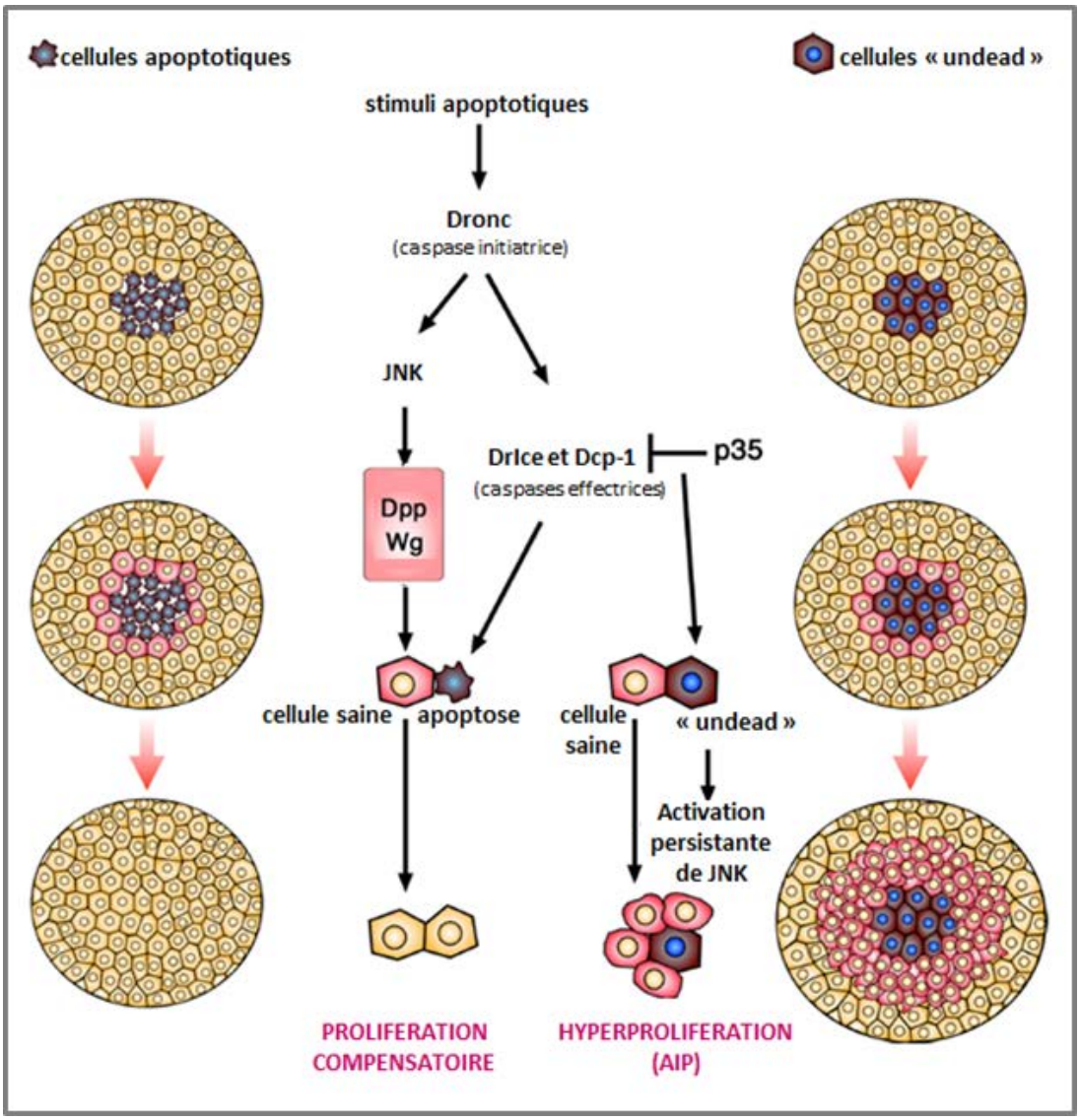


Figure 34 : La prolifération compensatoire dans un tissu épithéliale chez la drosophile

Quand l'apoptose est induite par un stimulus apoptotique, la caspase initiatrice DRONC clive ses substrats spécifiques incluant les caspases effectrices DrIce et Dcp-1 afin de les activer et déclencher le programme de mort cellulaire. Dans les cellules apoptotiques, l'activation de JNK par DRONC induit l'expression de signaux mitogènes tels que *dpp* et *wg* pour promouvoir la prolifération compensatoire des cellules saines voisines. L'expression de *p35* supprime la fonction effectrice des caspases, ce qui engendre une activation continue de la voie JNK dans les cellules « undead » et conduit à l'hyperprolifération des cellules voisines. *Abréviation : AIP : prolifération induite en réponse à l'apoptose en contexte « undead cell »*. Adapté de Fan et al., 2014

Toutefois, il est important de préciser que dans la mesure où ces cellules apoptotiques ne sont pas éliminées de ce système expérimental, on ne peut pas vraiment considérer qu'il y a véritablement compensation. Dans ce cas particulier, on parle de prolifération induite en réponse à l'apoptose (AIP) afin de la distinguer de « l'authentique » prolifération compensatoire (Mollereau et al., 2013). Dès lors, on peut se demander si les mécanismes moléculaires mis en évidence dans ce système d'AIP reflètent réellement les évènements qui se déroulent dans les cellules apoptotiques en absence de p35?

b. Modèle de prolifération compensatoire en absence de p35

D'autres approches ont été développées chez la drosophile, basées sur l'induction d'une mort cellulaire ectopique (*via* l'expression de gènes pro-apoptotiques) dans un domaine restreint du disque et sur une période temporelle limitée (Smith-Bolton et al., 2009) (Bergantiños et al., 2010) (Sun and Irvine, 2011) (Herrera et al., 2013). L'étude de ces modèles conditionnels d'induction de mort cellulaire, a permis de mettre à nouveau en évidence l'implication de la voie de signalisation JNK dans la régulation de ce processus de prolifération compensatoire (Fan et al., 2014). Toutefois, le lieu d'activation de cette voie semble différent entre les deux modèles d'études. En effet, en condition d'expression de *p35*, il est décrit que l'activité de JNK se produit seulement dans les cellules « undead » (Ryoo et al., 2004), mais en absence de p35, ce point est beaucoup moins clair. Initialement, l'activation de la voie JNK a été rapportée uniquement dans les cellules survivantes voisines (Bergantiños et al., 2010), mais une étude récente semble indiquer que cette signalisation est activée aussi bien dans les cellules apoptotiques que dans les cellules saines environnantes (Herrera et al., 2013). En dehors du fait que l'ensemble de ces travaux s'accorde à dire que la voie JNK joue un rôle crucial dans l'induction de cette prolifération compensatoire, à ce jour, le mécanisme et les acteurs impliqués dans l'activation de cette signalisation ne sont pas identifiés.

Le rôle des morphogènes *dpp* et *wg* dans ces différents modèles d'étude est à nouveau peu clair. En effet, bien qu'ils soient exprimés dans les cellules apoptotiques dites « classiques » tout comme dans les cellules « undead », leur implication dans ce processus de compensation est toutefois nettement moins évidente en absence de l'expression de *p35*. D'une part, *wg* ne semble pas exprimé dans les cellules qui meurent mais plutôt dans les cellules qui prolifèrent en contexte de mort induite transitoirement dans le disque d'aile *via* l'expression de *rpr* notamment (Smith-Bolton et al., 2009). D'autre part, en contexte mutant pour *dpp* et/ou *wg*, aucune modification du processus de compensation n'a été constaté (Pérez-Garijo et al., 2009) (Herrera et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère que l'expression des mitogènes *wg* et *dpp* n'est pas requise pour le processus de

prolifération compensatoire. Dès lors, le signal à l'origine de l'induction de ce phénomène dans les cellules saines voisines reste à identifier.

De façon intéressante, une étude montre que la voie JNK agit comme un modulateur de l'activité de la voie Hippo (Sun and Irvine, 2011), qui est connue pour son rôle dans le contrôle de la croissance au cours du développement normal (Irvine and Harvey, 2015). Cette étude indique que le coactivateur transcriptionnel de la voie, Yorkie, promeut la prolifération cellulaire des cellules saines et participe ainsi à la régénération du disque (Sun and Irvine, 2011). Plus récemment, l'activation de la voie EGFR en aval de la signalisation JNK a été impliquée dans ce mécanisme compensatoire aussi bien dans un modèle d'AIP dans le disque d'aile que dans un modèle de régénération dans le disque d'œil (Fan et al., 2014).

En lien avec ce dernier point, il est important de préciser que la prolifération compensatoire induite en réponse à l'apoptose n'est pas limitée au tissu prolifératif. Ce mécanisme existe aussi dans les tissus en cours de différenciation tels que le disque imaginal d'œil (Fan et al., 2014). Le morphogène *Hedgehog* (*Hh*) est exprimé dans ce tissu pour induire la prolifération compensatoire, en stimulant les cellules à reprendre une activité mitotique (Fan and Bergmann, 2008). Ces travaux suggèrent qu'il existe différentes voies de prolifération compensatoire qui varient en fonction du stade de développement du tissu considéré.

2. Le retard d'entrée en métamorphose

Il est bien connu qu'une lésion du disque imaginal chez la larve de drosophile, induite à la suite d'un dommage mécanique, d'une irradiation ou d'une manipulation génétique, provoque un retard d'entrée en métamorphose qui apparait proportionnel la sévérité des dommages imposés (Bryant and Levinson, 1985) (Hussey et al., 1927) (Simpson et al., 1980) (Poodry and Woods, 1990) (Stieper et al., 2008) (Halme et al., 2010). L'inhibition de ce mécanisme de retard, *via* l'ajout d'ecdysone à l'état larvaire afin de forcer la poursuite du cycle de développement, empêche la formation d'une aile adulte normale lorsque le disque imaginal d'aile tissu a subi des dommages (Halme et al., 2010). Ce délai d'entrée en métamorphose semble également dépendre du stade développemental auquel la lésion survient. Par exemple, une blessure imposée en fin de stade larvaire, une fois la taille critique larvaire atteinte, n'induit pas de retard d'entrée en pupaison (Smith-Bolton et al., 2009) (Halme et al., 2010) (Hackney et al., 2012). En revanche, des dommages causés au cours des premiers stades larvaires (L1 et L2) déclenche un délai d'entrée en métamorphose sans pour autant modifier les transitions développementales L1-L2 et L2-L3 (Halme et al., 2010) (Parker and Shingleton, 2011). Ce mécanisme de compensation permet d'accorder un lapse de temps supplémentaire au tissu endommagé ou dont la croissance est perturbée, pour se régénérer et atteindre sa taille idéale avant

la métamorphose. Il s'agit d'une augmentation du temps de prolifération sans augmentation du taux de prolifération dans ce tissu en réparation.

L'enjeu d'un tel mécanisme est de pouvoir coordonner, synchroniser la croissance du disque lésé avec le programme développemental à l'échelle de l'organisme, c'est-à-dire avant le stade pupal. De façon intéressante, l'entrée en pupaison d'une larve privée d'un disque imaginal ou comportant un disque de très petite taille aura une cinétique développementale parfaitement normale (Simpson et al., 1980). En d'autres termes, il semble que le disque imaginal lésé sécrète un signal de nature inhibitrice pour empêcher l'initiation de la métamorphose, tant que ce dernier n'a pas parfaitement complété son programme de croissance.

Pendant plusieurs années, la nature de ce signal est restée inconnue, mais récemment deux équipes, travaillant sur des modèles de croissance néoplasique et de croissance ralentie chez la drosophile, ont identifié une nouvelle hormone peptidique qui appartient à la famille de l'insuline : il s'agit de Drosophila insulin-like peptide 8 (Dilp8) (Colombani et al., 2012) (Garelli et al., 2012). Cette hormone est un signal sécrété par le disque endommagé qui inhibe la production d'ecdysone en agissant à distance sur le cerveau de la larve. Il apparait que *Dilp8* est exprimé de façon basale au niveau des disques imaginaux, du corps gras et des cellules IPC de la larve, et qu'une augmentation de son expression suffit à induire un retard de développement. Son expression semble régulée par la voie JNK (Colombani et al., 2012). En effet, l'expression de *puc* (cible de la voie qui exerce un rétrocontrôle négatif sur cette dernière) inhibe l'expression du signal *Dilp8*. Ainsi, cette hormone sécrétée dans l'hémolymphe, apporte une explication mécanistique concernant le couplage entre le statut de croissance d'un tissu et la progression du programme développemental. Par ailleurs, la voie de biosynthèse de l'acide rétinoïque est également un modulateur de l'expression de *ptth*, en réponse à un dommage tissulaire, au cours du développement de la larve (Halme et al., 2010). Cette voie existe aussi chez les vertébrés et est décrite pour contribuer au maintien de l'homéostasie tissulaire (Hind and Maden, 2004) (Maden and Hind, 2004). A ce jour, on ne sait pas si Dilp8 fonctionne via ou en parallèle de la voie de l'acide rétinoïque pour inhiber la sécrétion d'ecdysone et induire ainsi un retard d'entrée en métamorphose (Figure 35). Une déplétion de Dilp8 associée à l'inactivation de la voie des rétinoïdes, n'empêche pas le retard d'entrée en métamorphose (Garelli et al., 2012). Ceci suggère au moins, l'existence d'une troisième voie de signalisation qui contrôle cette entrée en pupaison.

Cette découverte a également contribué à la compréhension du phénomène de la croissance coordonnée entre tous les tissus et organes d'un individu afin de générer un adulte proportionné. Nous venons de voir que des lésions au niveau d'un disque imaginal d'une larve de drosophile,

provoque un retard de sortie de la phase larvaire du développement afin de prolonger ce stade pour compenser les dommages occasionnés. Mais cet effet est associé à une coordination de la croissance régénérative des tissus lésés avec celle des tissus intacts qui doivent alors procéder à un ralentissement de leur taux de croissance, afin d'obtenir des tissus et organes de tailles équivalentes à l'issue du cycle développemental (Parker and Shingleton, 2011). Dès lors, la question se pose de savoir comment ces tissus en plein processus de régénération communiquent avec les tissus non-endommagés pour coordonner leur croissance à l'échelle de l'organisme? Une explication potentielle serait que le tissu endommagé produirait lui-même un signal qui influencerait de façon directe ou non, la croissance des tissus intacts. Dans ce contexte, le signal Dilp8 apparaît être un candidat idéal, puisqu'à l'inverse des autres Dilp, il agit pour limiter la croissance. En accord avec cette hypothèse, l'induction spécifique de l'expression de Dilp8 dans le disque d'aile n'induit pas seulement un retard d'entrée en pupaison, il conduit également à un retard de croissance des disques et du corps larvaire (Colombani et al., 2012) (Garelli et al., 2012). De plus, une larve nourrie avec de l'ecdysone, pour forcer la progression du développement, ne présente aucun couplage de croissance entre les disques lésés et les disques intacts (Parker and Shingleton, 2011). Par ailleurs, un organisme mutant pour Dilp8, présente des imperfections de symétrie bilatérale ainsi qu'une variation considérable de la taille finale des organes (Garelli et al., 2012). L'ensemble de ces données illustre bien la fonction inhibitrice de Dilp8 vis-à-vis de la croissance. Cet effet semble également passer par une suppression du niveau basal d'ecdysone dépendante de Dilp8.

Quel peut être le mode d'action de Dilp8 dans cette régulation coordonnée de la croissance tissulaire et du retard de développement ? Ces deux réponses pourraient être liées puisqu'une restriction de croissance conduit à un retard de développement (Poodry and Woods, 1990) (Stieper et al., 2008). A l'inverse, elles pourraient refléter deux mécanismes distincts dépendants de l'expression de *Dilp8*. Nous avons vu que l'entrée en métamorphose est au moins en partie régulée par l'inhibition de l'expression de *ptth* au niveau des neurones PG, afin d'inhiber la voie de biosynthèse de l'ecdysone dans la glande prothoracique de la larve. Deux approches complémentaires ont montré que ce signal Dilp8 régule l'expression de *ptth* (Colombani et al., 2012) (Garelli et al., 2012).

Une hypothèse simple concernant le mode d'action de Dilp8 dans la régulation de la croissance des tissus intacts serait que ce peptide puisse agir directement sur son récepteur (InR) à la surface des tissus sains pour antagoniser son activité et limiter ainsi la croissance. Des données récentes sont plus en faveur d'un rôle de la nitric oxide synthase (NOS) (Jaszczak et al., 2015) qui produit de l'oxyde nitrique (NO), un radical libre qui régule de nombreux processus biologiques tels que l'activité neuronale, l'immunité ou encore la régulation vasculaire. En effet, une altération de l'activité de la NOS au cours du développement de la drosophile produit des changements de croissance du tissu

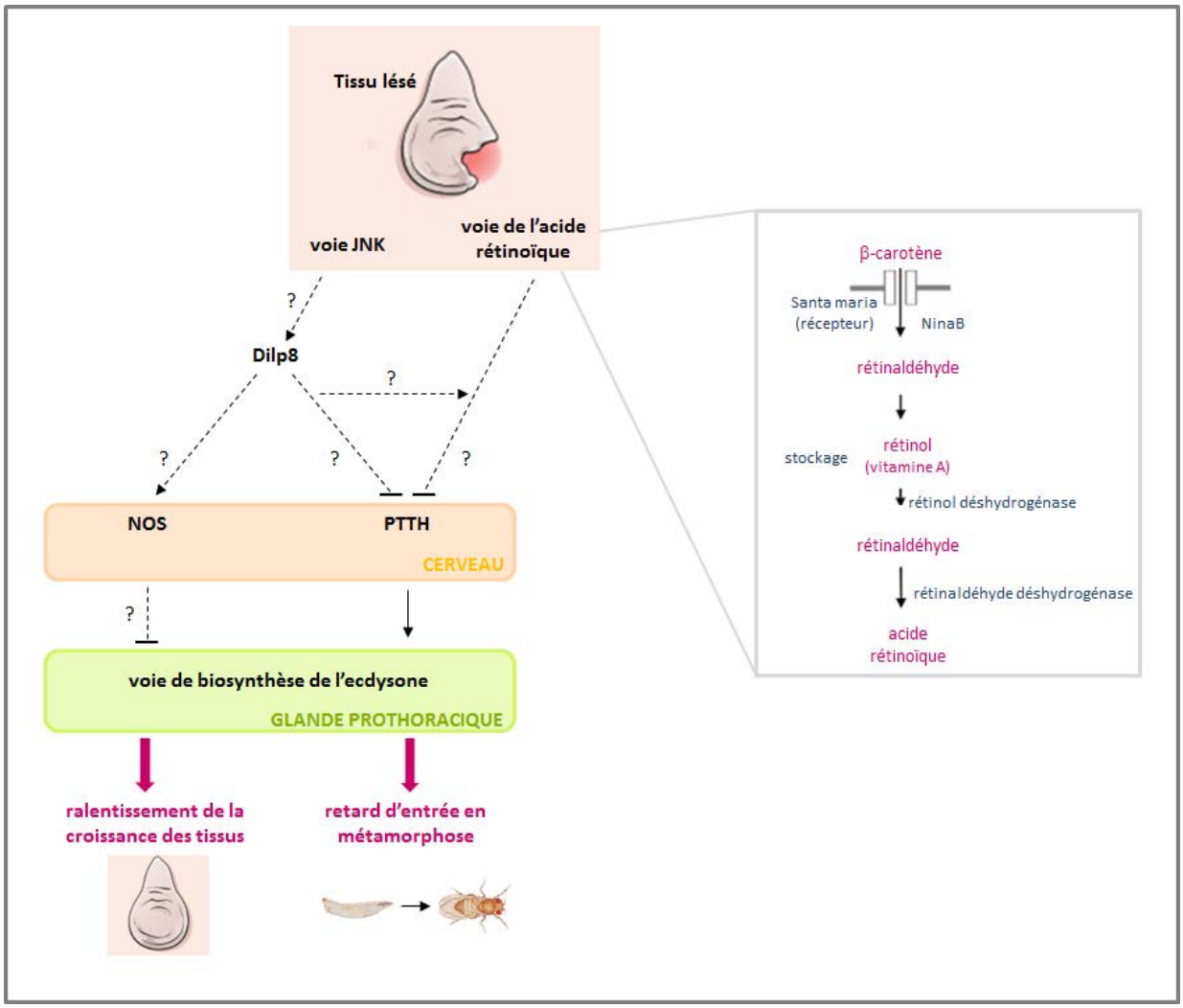


Figure 35 : Régulation de la progression développementale, en présence d'un tissu endommagé

Le tissu lésé en cours de développement active la voie de l'acide rétinoïque (détails de la voie dans l'encadré gris clair) ainsi que la voie JNK afin d'inhiber, par des mécanismes moléculaires encore inconnus, l'expression de *ptth* dans le cerveau de la larve. Ceci a pour conséquence d'inhiber la sécrétion d'ecdysone dans la circulation et donc de provoquer un retard d'entrée en métamorphose. En parallèle de ce mécanisme qui est en partie médié par le peptide Dilp8, lui-même sécrété via l'activation de la voie JNK, Dilp8 module également, par un mécanisme inconnu, l'activité de la NOS qui inhibe l'expression d'enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'ecdysone. Ceci a pour conséquence de ralentir la croissance des tissus, afin d'obtenir *in fine* un organisme adulte proportionnel. *Abréviations: Dilp8: Drosophila insulin-like peptide 8, PTTH: Prothoracicotropic Hormone, NOS: nitric oxide synthase.*

larvaire (Kuzin et al., 1996) (Cáceres et al., 2011). Cette récente étude propose que des pics de NOS au niveau de la glande prothoracique et au cours du stade L3, engendrerait une inhibition de la croissance des disques imaginaux, en réprimant la voie de biosynthèse de l'ecdysone (Jaszczak et al., 2015) (Figure 35). Cette croissance régénérative au sein des tissus lésés peut tout de même survenir malgré une diminution de sécrétion de l'ecdysone, car elle présente probablement des besoins en croissance différents de ceux requis par les tissus intacts. Ainsi l'activité de NOS dans la glande prothoracique coordonne la croissance tissulaire grâce à une régulation des signaux endocriniens, dont le mécanisme d'action reste à découvrir. Il est important de préciser que NOS est nécessaire pour réguler la croissance des tissus intacts mais ne l'est pas pour l'induction du retard d'entrée en métamorphose. Pour résumer, les disques endommagés sécrètent le peptide signal Dilp8 qui, par des mécanismes différents, permet d'une part de déclencher un retard de développement médié par une inhibition de l'expression de *ptth*, et d'autre part de provoquer une restriction de la croissance *via* l'activité de NOS, au sein de la glande prothoracique.

Pour conclure, la découverte de Dilp8 offre potentiellement de nouvelles perspectives pour identifier l'existence d'un éventuel homologue chez les vertébrés puisque des cas d'inflammation chronique, d'infection, de retard de croissance ou encore de réparation tissulaire sont souvent associés à un retard de puberté chez l'homme (Kennedy and Mitra, 1963) (Frisch and Revelle, 1970) (Cassidy and Hillman, 1997) (Ballinger et al., 2003) (Burnham et al., 2004) (Ezri et al., 2012). Ceci suggère donc l'existence de mécanismes similaires chez les vertébrés, pour coordonner la croissance des organes avec le programme de développement de l'individu.

III. Situation du sujet

Comme nous l'avons vu, le réticulum endoplasmique (RE) est un organite essentiel assurant de nombreuses fonctions cellulaires (conformation et modifications post-traductionnelles des protéines, synthèse lipidique, métabolisme cellulaire et signalisation calcique), ce qui en fait un site crucial pour réguler le maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire des organismes multicellulaires. Des altérations des fonctions du RE conduisent à l'accumulation de protéines mal-conformées. En condition physiologique, divers mécanismes compensatoires, communément connus sous le nom de réponse aux protéines mal conformées (Unfolded Protein Response (UPR) en anglais), permettent à la cellule de supprimer les sources et conséquences de ce stress. Néanmoins, l'intensité et la chronicité du stress du RE entrainent une modification de l'UPR qui conduit alors à l'élimination de la cellule par apoptose. A ce jour, les processus moléculaires sous-jacent qui permettent à l'UPR d'induire cette apoptose restent flous. Pourtant ce phénomène est observé dans de nombreuses pathologies humaines telles que des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques. Par ailleurs,

chez le modèle drosophile, l'étude de ces problématiques n'a débuté que très récemment. Il n'existe dans la littérature, que deux modèles d'études de maladies (l'un portant sur l'ADRP et l'autre sur un type de diabète lié à l'accumulation d'une forme mal-conformée de proinsuline humaine) qui sont associés à un stress du RE chez cet organisme (Kang et al., 2012) (Park et al., 2014). De plus, ce déséquilibre de l'homéostasie tissulaire, en faveur de la mort cellulaire, induit potentiellement divers mécanismes conservés au cours de l'évolution dont la prolifération compensatoire et/ou une modulation du temps de développement, afin de compenser cette perte cellulaire. L'implication de l'UPR dans la régulation de ces processus compensatoires à la suite d'un stress du RE, n'a jamais été étudiée.

Dans un premier temps, j'ai participé à la caractérisation d'un modèle de stress chronique du RE dans le disque imaginal d'aile de drosophile, où deux voies parallèles et indépendantes régulent le maintien de l'homéostasie tissulaire. Cette étude a donné lieu à une publication dont je suis deuxième auteure. Puis dans un second temps, j'ai voulu généraliser ce premier modèle de stress à deux autres modèles, dépendants ou non d'une dérégulation des flux calciques. J'ai ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une même voie de signalisation dépendante de l'UPR et régulant le maintien de l'homéostasie tissulaire, entre ces différents modèles de stress du RE. Les signalisations impliquées se distinguent des mécanismes déjà observés dans d'autres modèles décrits dans la littérature, et permettent de mettre en évidence une spécificité tissulaire des signalisations déclenchées en réponse à un stress chronique du RE. Ces travaux font l'objet d'une publication dont je suis première auteure. Le chapitre « Résultats » sera organisé en trois sections, les deux premières seront dédiées aux publications mentionnées ci-dessus, puis la troisième à des résultats complémentaires en lien avec la caractérisation de ces modèles de stress du RE.

INTRODUCTION

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas eurêka (j'ai trouvé), mais plutôt tiens c'est marrant… »

Isaac Assimov

RÉSULTATS

DISCUSSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I. ARTICLE 1

The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress Drosophila model

Le RE joue un rôle majeur dans la maturation et la conformation des protéines. L'accumulation de protéines mal-conformées dans cette organite déclenche une réponse adaptative connue sous le nom de *Unfolded Protein Response* (UPR) pour résoudre ce stress du RE. Si ce stress reste non résolu, alors l'UPR induit l'apoptose des cellules stressées. Pour comprendre comment ces cellules activent l'apoptose et comment l'homéostasie tissulaire est rétablie suite à cette perte cellulaire, nous avons développé un nouveau modèle de stress chronique chez la drosophile. En effet, un unique modèle était décrit chez la drosophile dans la littérature. Ce dernier reposait sur la surexpression dans le disque imaginal d'œil d'un transgène codant une forme mutante de la Rhodopsine-1 qui est associée à la rétinite pigmentaire autosomale dominante (ADRP). Dans ce modèle, la voie d'induction de l'apoptose a été étudiée mais ce n'est pas le cas des potentiels mécanismes compensatoires activés pour rétablir l'homéostasie tissulaire.

Nous avons choisi de surexprimer dans le domaine *vestigial* du disque imaginal de larve de drosophile un transgène codant la Préséniline (Psn). En effet, une telle surexpression a été décrite dans la littérature comme pouvant déclencher un stress du RE dans des modèles cellulaires de mammifères. Dans ce système, nous avons d'une part validé l'induction d'un stress chronique du RE et d'autre part, que la branche PERK/ATF4 de l'UPR y exerce un rôle essentiel. En effet, cette voie de l'UPR (i) promeut une apoptose dépendante des caspases en réprimant l'expression de *diap1* et (ii) induit l'expression de *dilp8 via* l'activation de la voie Rac1/Slpr/JNK. Cette réponse systémique au stress du RE, entraîne un accroissement du temps de développement de l'organisme et donc de la phase de prolifération du tissu affecté par la mort cellulaire. Elle favorise ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire en condition d'un stress du RE.

Ma contribution à cette étude est la suivante:

- J'ai réalisé des immunomarquages pour co-détecter l'activation de la branche IRE1 de l'UPR (avec un rapporteur *Xbp1::EGFP*) et l'apoptose (Fig.1b).

- Après avoir généré la lignée *vg>Psn; dronc* ^{I24}, j'ai effectué un marquage de la mort cellulaire avec la méthode TUNEL en contexte mutant homozygote pour la caspase initiatrice Dronc, ce qui a contribué à montrer que la mort cellulaire induite par la surexpression de *Psn* est dépendante des caspases (Fig.1c).

- Par ailleurs, j'ai pu confirmer que la réduction de la quantité de la protéine Diap1, observée en contexte de surexpression de *Psn*, n'est pas due à une perte des cellules provoquée par l'apoptose (Fig.1c). Pour cela, j'ai établi les lignées: *UAS-nGFP; UAS-EGFP* et *UAS-nGFP; UAS-p35*, puis j'ai réalisé des immunomarquages anti-Diap1 chez des larves exprimant ces transgènes et subissant un stress du RE.

- J'ai participé à la mise au point du protocole permettant de tester si le temps de développement participe au maintien de l'homéostasie tissulaire, en contexte de surexpression de *Psn*. Cette approche est basée sur l'analyse du temps de développement des mouches et de leurs phénotypes d'ailes adultes, après avoir nourri les larves avec un milieu complété ou non avec de l'ecdysone.

- J'ai mis au point l'extraction des ARN, réalisé et analysé les expériences de qRT-PCR de cette étude (Fig.2f-g).

- J'ai également participé à la mise en évidence de l'activation de la voie JNK (immunomarquages anti-MMP1 et anti-β-Gal) dans notre modèle de stress chronique du RE, ainsi qu'à l'identification des membres de cette voie de signalisation impliqués dans la régulation de l'expression de *dilp8*.

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2014) 5, e1452; doi:10.1038/cddis.2014.403
© 2014 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041 4889/14
www.nature.com/cddis

The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model

Y Demay[1], J Perochon[1], S Szuplewski[1], B Mignotte[1] and S Gaumer*[,1]

The endoplasmic reticulum (ER) has a major role in protein folding. The accumulation of unfolded proteins in the ER induces a stress, which can be resolved by the unfolded protein response (UPR). Chronicity of ER stress leads to UPR-induced apoptosis and in turn to an unbalance of tissue homeostasis. Although ER stress-dependent apoptosis is observed in a great number of devastating human diseases, how cells activate apoptosis and promote tissue homeostasis after chronic ER stress remains poorly understood. Here, using the *Drosophila* wing imaginal disc as a model system, we validated that *Presenilin* overexpression induces chronic ER stress *in vivo*. We observed, in this novel model of chronic ER-stress, a PERK/ATF4-dependent apoptosis requiring downregulation of the antiapoptotic *diap1* gene. PERK/ATF4 also activated the JNK pathway through Rac1 and Slpr activation in apoptotic cells, leading to the expression of *Dilp8*. This insulin-like peptide caused a developmental delay, which partially allowed the replacement of apoptotic cells. Thanks to a novel chronic ER stress model, these results establish a new pathway that both participates in tissue homeostasis and triggers apoptosis through an original regulation.
Cell Death and Disease (2014) **5**, e1452; doi:10.1038/cddis.2014.403; published online 9 October 2014

Protein folding is a major role of the endoplasmic reticulum (ER) that can be challenged by modification of calcium homeostasis, elevated protein synthesis, glucose deprivation, hypoxia and altered protein glycosylation, leading to unfolded or misfolded protein accumulation in the ER. If this accumulation exceeds the folding capacity of chaperones, ER-stress is induced, triggering an adaptive response known as the unfolded protein response (UPR) to resolve the stress or eliminate the cell.[1,2] Unresolved ER stress-induced apoptosis is observed in a great number of devastating diseases including neurodegenerative and renal diseases, diabetes and atherosclerosis.[3] Three principal arms of the UPR have been identified and are particularly well characterized in mammals.[4] Each branch is regulated by a different sensor transmembrane protein, that is, IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), PERK (double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR) – like ER Kinase) or ATF6 (Activating Transcription Factor 6) – which senses unfolded protein accumulation and leads to the transcriptional activation of genes involved in the UPR. All three sensors of the UPR are conserved, though ATF6 has not yet been linked to the UPR in *Drosophila*.[5–7] How cells activate apoptosis after a chronic ER stress remains poorly understood. This accidental programmed cell death can lead to an unbalance of tissue homeostasis. Surprisingly, the UPR has never been shown to play a role in tissue homeostasis after ER stress-mediated cell death.

Well-known strategies that allow tissue homeostasis in *Drosophila* wing imaginal discs are compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation.[8] Tissue homeostasis depends on the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway that is activated either in apoptotic or in proliferating cells according to the apoptotic stimuli.[9–11] Both the mechanism of activation and the role of this pathway remain unclear. Indeed, the JNK signaling has been reported to be controlled by either *Drosophila* inhibitor of apoptosis (DIAP1) or the initiator caspase Dronc.[12–14] Nevertheless, the JNK pathway components that would be targets of DIAP1 or Dronc remain unidentified. In *Drosophila* as in mammals, the transcription factor that represents the last component of this pathway, dAP-1, is a dimer of Jra and Kay, which are homologous to Jun and Fos.[15] It is activated through a cascade of phosphorylations. Although three JNKs exist in mammals, Bsk is the only one in *Drosophila*. Similarly, the complexity of the pathway is lower in dipterans than in mammals with two JNKKs, six JNKKKs and many regulators of the JNKKKs described in *Drosophila*.[16,17] The literature supports the idea that signaling specificity could be driven by the JNKKK and by the combination of activated kinases.[18]

[1]Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-le-Bretonneux, France
*Corresponding author: S Gaumer, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France. Tel: +33 1 70 42 94 17; Fax: +33 1 70 42 95 03, E-mail: sebastien.gaumer@uvsq.fr
Abbreviations: 20E, 20-Hydroxyecdysone; ADRP, autosomal dominant retinitis pigmentosa; AED, after egg deposition; ATF6, activating transcription factor 6; Bsk, Basket; DIAP1, Drosophila inhibitor of apoptosis 1; Dilp8, Drosophila insulin-like peptide 8; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GADD34, growth arrest and DNA damage-inducible 34; ER, endoplasmic reticulum; Hep, Hemipterous; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; JNKKK, c-Jun N-terminal kinase kinase kinase; MMP1, matrix metalloproteinase; Msn, Misshapen; PERK, double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase; PH3, phospho-histone H3; PSN, presenilin; Puc, Puckered; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; UPR, unfolded protein response; vg, vestigial; XBP1, X-box binding protein 1
Received 24.1.14; revised 15.8.14; accepted 18.8.14; Edited by E Baehrecke

The JNK pathway has also been identified as mediating developmental delay by controlling *Drosophila insulin-like peptide 8* (*Dilp8*) expression.[19] Previous studies have demonstrated that damaged imaginal discs delay the onset of metamorphosis, thus permitting tissue regeneration.[20–22] This developmental delay is the result of a depletion of the Prothoracicotropic hormone (Ptth), a neuropeptide which promotes the release of the steroid hormone ecdysone that regulates developmental transitions in ecdysosoans such as *Drosophila*. Dilp8 and retinoids have been identified as secreted signals produced by damaged discs to promote *ptth* transcription inhibition.[19,22,23]

Although numerous studies have shown that ER stress can be induced by various stimuli, ER stress-induced cell death has only been studied once in *Drosophila*. This recent work showed that a strong chronic ER stress induces apoptosis in the eye imaginal discs of *Drosophila* thanks to a CDK5/MEKK1/JNK signaling pathway.[5,24] This model of ER-induced apoptosis relies on a *rhodopsin-1* mutant allele mimicking autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). The *Presenilin* gene encodes an eight to nine-pass transmembrane protein best described to function as the catalytic subunit of the γ-secretase multiprotein complex after an endoproteolytic processing, but also as a regulator of calcium flux in the ER. It has been previously shown that *Presenilin* overexpression could modify calcium homeostasis in *Drosophila* wing discs[25] and in cultured mammalian cells.[26] This expression induces ER stress in mammalian cells. Full-length Presenilin is primarily located on the ER membrane.[27,28] The overexpression of mammalian *Presenilin* in cultured cells induced the accumulation in the ER membrane of Psn with unmodified catalytic activity.[29,30] Therefore, we hypothesized that the overexpression of the *Drosophila Presenilin* gene (*Psn*) could be an appropriate model to induce ER stress in this multicellular organism.

In this study, we validate that *Psn* overexpression in wing imaginal discs induces an ER stress and we show that this ER stress triggers both cell death and a regulation of tissue homeostasis. Indeed, a consequence of this overexpression is the induction of a PERK-dependent apoptosis through the activation of the transcription factor ATF4 that downregulates the antiapoptotic *diap1* gene. This ER stress-induced cell death does not induce apoptosis-induced proliferation. ATF4 also activates the JNK pathway through Rac1 and Slpr activation in apoptotic cells. Interestingly, the JNK pathway does not control cell death in this model, but upregulates *Dilp8,* which participates in tissue homeostasis maintenance by controlling the developmental clock. In summary, we present a novel *in vivo* model of chronic ER stress that greatly differs from the previously established ER stress model and we show that the PERK/ATF4 branch of the UPR can trigger a developmental delay favoring tissue regeneration through the Rac1/Slpr/JNK pathway in *Drosophila* wing imaginal discs.

Results

Overexpression of *Presenilin* leads to both ER stress and PERK/ATF4-dependent cell death. To test if the overexpression of *Psn* could be an appropriate model to induce ER stress in *Drosophila*, this gene was overexpressed in part of the *vestigial* (*vg*)-expression domain, which covers the wing-pouch dorsoventral boundary (i.e., the cells corresponding to the adult wing margin) and a part of the hinge and notum, thanks to the *GAL4–UAS* system (Figure 1a, top panel).[31] *Psn* overexpression in this domain led to a notched-wing phenotype of variable expressivity (Supplementary Figure S1A). As Psn is involved in the Notch pathway, this adult phenotype could suggest that *Psn* overexpression inhibits the Notch pathway. However, consistent with the data indicating that *Psn* overexpression does not affect Psn catalytic activity,[29,30] *Psn* overexpression and Notch depletion induced different phenotypes in third-instar wing imaginal discs. Notch depletion by using an RNAi transgene induced a complete extinction of Wg expression on the dorsoventral boundary that was not observed in discs overexpressing *Psn*. Conversely, *Psn* overexpression induced apoptosis, which was not observed upon Notch depletion (Supplementary Figure S1B).

Overexpression of *Psn* triggered ER stress and activated the IRE1 branch of the UPR (Figure 1b), as reported by an *xbp1::EGFP* (enhanced green fluorescent protein) reporter, which allows EGFP protein synthesis only when ER stress stimulates IRE1-dependent XBP1 mRNA splicing.[32] Cells expressing *xbp1::EGFP* were dying as assayed by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Figure 1a) and an anti-activated caspase-3 labeling that reveals Dronc activity[33] (Figure 1b). Moreover, expression of the caspase inhibitor baculovirus protein p35 and *dronc* loss-of-function inhibited ER stress-induced cell death (Figures 1a and c). These observations show that *Psn* overexpression induces both ER stress- and Dronc-dependent cell death.

To determine if this apoptosis depends on ER stress, we tested whether affecting the IRE1 and PERK branches of UPR could modulate it. Depleting components of the IRE1 branch (XBP1 or IRE1) by using efficacious RNAi transgenes did not modify TUNEL staining (data not shown and Supplementary Figure S2A), suggesting that this branch is not the main inducer of the apoptosis. Depletion of GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage–inducible 34), the phosphatase that negatively regulates PERK activity,[34] increased the cell death level specifically in *Psn*-overexpressing discs (Supplementary Figure S2B and data not shown). Conversely, TUNEL staining was strongly decreased upon depletion of either PERK (Supplementary Figure S2B) or its effector, ATF4 (Figure 1d). These results seemed specific and were not due to GAL4 titration as numerous transgenes inserted at the same locus revealed no effect or opposite effects to PERK and ATF4 depleting transgenes. Therefore, *Psn* overexpression triggers an ER stress-induced cell death that is mainly ATF4 dependent.

To better characterize the ER stress-induced cell death pathway, we focused on DIAP1, the major regulator of caspases in *Drosophila*. The DIAP1 protein level appeared to be decreased in the *vg* domain labeled by GFP (Figure 1d). Depletion of ATF4 was sufficient to re-establish a normal level of DIAP1 (Figure 1d). To rule out that this DIAP1 recovery was due to the reduction of the apoptosis observed in ATF4

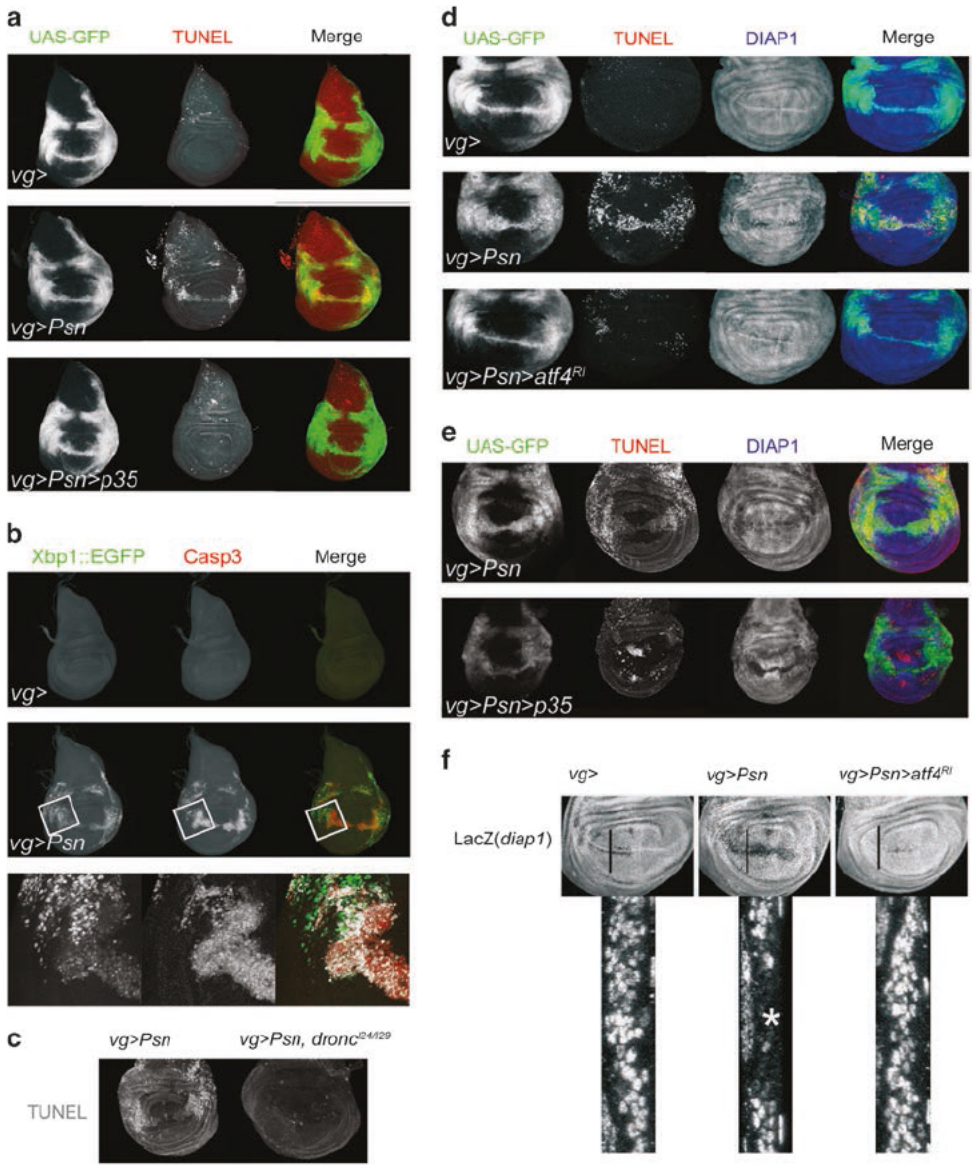


Figure 1 The PERK/ATF4 pathway is responsible for *Psn* overexpression-induced loss of DIAP1 and apoptosis. (**a**) Third-instar imaginal wing discs with the *Psn*-expressing domain detected thanks to GFP (green) and TUNEL staining (red) to detect apoptosis. Genotypes are *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (middle) and *UAS-p35/+; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (bottom). (**b**) Third-instar imaginal wing discs carrying an *xbp1::EGFP* reporter transgene (green) to detect ER stress and immunostained with an anti-activated Caspase 3 staining (red) to detect apoptosis. Genotypes are *vg-GAL4/+; xbp1::EGFP/+* (top row) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; xbp1::EGFP/+* (middle row). Bottom row images are enlargement of boxed regions. Colocalization between anti-activated Caspase 3 staining and Ire1 activity reporter is highlighted in white thanks to the ImageJ Colocalization plugin in the merge enlargement. Note that developmental apoptosis is only observed in the notum (top). (**c**) TUNEL staining of *Psn*-expressing third-instar imaginal wing discs in the absence or presence of *dronc* mutations. Genotypes are *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (left) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dronc^{I24}/dronc^{I29}* (right). (**d**, **e**) Third-instar imaginal wing discs with the *Psn*-expressing domain detected thanks to GFP (green), TUNEL stained (red) to detect apoptosis and immunostained with an anti-DIAP1 antibody (blue). (**d**) Genotypes are *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (middle) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/UAS-atf4-RNAi* (bottom). (**e**) Genotypes are *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn /UAS-nGFP; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-nGFP; UAS-p35/+* (bottom) (**f**) Anti-β-Galactosidase staining to detect *diap1^{J5C8}* reporter expression in *vg-GAL4/+; diap1^{J5C8}/+* (left column) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1^{J5C8}/+* (center); and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1^{J5C8}/UAS-atf4-RNAi* (right column) third-instar wing imaginal discs. The black lines correspond to the projection of the corresponding enlarged transverse XZ sections shown under disk images. Enlarge areas are oriented with their basal side to the left. The asterisk indicates the *diap1* expression reduction (center)

depletion condition, we inhibited ER stress-induced apoptosis by expressing p35. The decrease of DIAP1 level was still observed (Figure 1e). A GAL4 titration effect could also be ruled out as the number of UAS transgenes did not affect the results. These data indicate a control of DIAP1 by the PERK/ATF4 branch of the UPR.

To test the existence of a *diap1* transcriptional regulation, we used a *PlacZ* enhancer-trap insertion that monitors *diap1* transcription.[35] We observed a decrease of anti-β-Galactosidase staining in the ER-stressed domain, which was restored by ATF4 depletion (Figure 1f), demonstrating that ATF4 negatively regulates *diap1* transcription after ER stress.

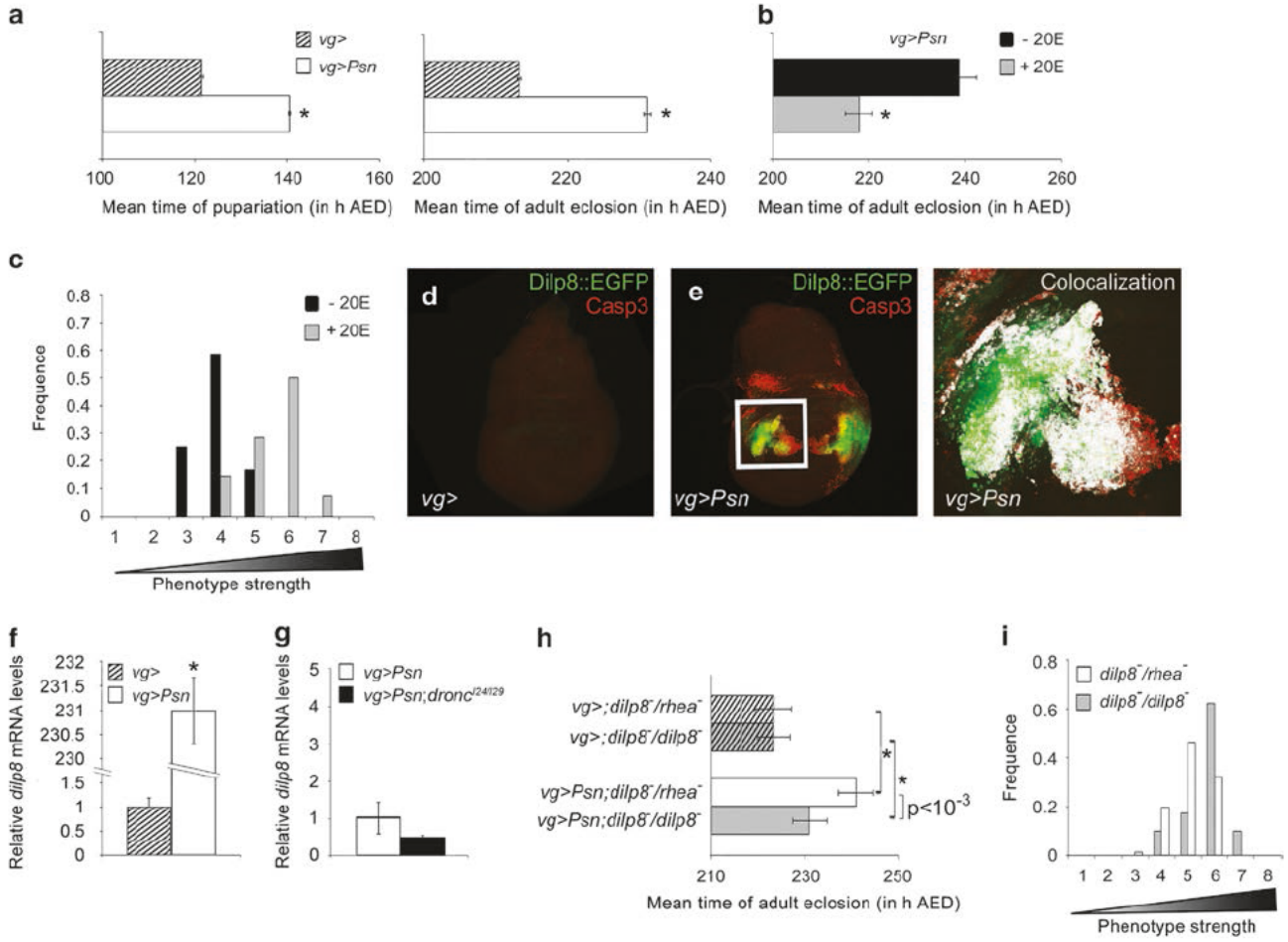


Figure 2 Dilp8-induced developmental delay favors tissue homeostasis after ER stress. (**a**) Effects of *Psn* overexpression on pupariation and adult eclosion timing. Hatched bar (*vg-GAL4/+*) and open bar (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*) represent mean time in hours AED of pupariation (left) or adult eclosion (right). Error bars represent the S.E. of the mean. Asterisks indicate a significant difference with the control (Left: n 4, $P<10^{-5}$, ANOVA), (Right: n 6, $P<10^{-7}$, ANOVA). (**b**) Effects of 20E food supplementation of 92 h AED old *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* larvae on adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. of three independent experiments (asterisk: $P<5\%$, ANOVA). (**c**) Distribution of notched-wing phenotypes after 20E supplementation (gray bars) or not (black bars) according to their strength in a representative experiment (n 3, $P<5\%$, ANOVA). (**d**, **e**) Third-instar wing imaginal discs carrying Dilp8::EGFP (green) and immunostained with an antiactivated caspase 3 antibody (red). Genotypes are *vg-GAL4/+; dilp8^{MI00727}/+* (**d**) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8^{MI00727}/+* (**e**). The enlargement of the boxed area in **e**, shows signal colocalization highlighted in white thanks to the ImageJ Colocalization plugin. (**f**, **g**) *dilp8* RNA levels measured by quantitative reverse PCR. Data represent mean ± S.E.M. of three independent experiments. RNA was extracted from control (*vg-GAL4/+*, hatched bar, (**f**) or ER stressed (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*, open bar, f and **g**) or ER-stressed *dronc* mutant (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dronc^{I24}/ dronc^{I29}*, black bar, **g**) wing imaginal discs. The asterisk indicates a significant difference with the control ($P<10^{-4}$, Student's t-test). (**h**). Effects of *dilp8* homozygous mutation (*dilp8^{MI00727}/dilp8^{MI00727}*, gray bars) compared with *dilp8* heterozygosity (*dilp8^{MI00727}/rhea^{MI00296}*, white bars) on adult eclosion of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) and *vg-GAL4/+* (hatched bars) on mean time of adult eclosion. The *rhea^{MI00296}* strain is commonly used as the control for *dilp8^{MI00727}* genetic background.[23] Asterisks indicate significant difference from the corresponding control that does not express *Psn* ($P<10^{-4}$, ANOVA). Error bars represent the S.E.M. of six independent experiments. (**i**) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8^{MI00727}/dilp8^{MI00727}*flies (gray bars) compared with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8^{MI00727}/rhea^{MI00296}* flies (open bars) (n 3, $P<10^{-6}$, ANOVA)

ER stress-induced cell death does not induce proliferation but causes a general *Dilp8*-dependent developmental delay. Previous studies have demonstrated that compensatory or apoptosis-induced proliferation could be activated in damaged imaginal discs to maintain tissue homeostasis.[10,11,36–39] We did not observe any difference in the number of mitotic cells labeled by an anti-Phospho-Histone H3 (PH3) immunostaining when compared with control discs (Supplementary Figure S3). Thus, ER stress-induced apoptosis does not seem to increase the cell proliferation rate in the surrounding tissue.

Damages to an imaginal disc can extend the larval development to allow coordination of tissue growth and regeneration within the organism.[22] Indeed, *Psn* overexpression in the *vg* domain exhibited a 20-h delay before pupariation and adult eclosion (Figure 2a). To determine if this developmental delay participates to tissue homeostasis, we shortened the third larval stage by transferring larvae at 92 h after egg deposition (AED) to food supplemented with 20-Hydroxyecdysone (20E), which is the active form of the steroid hormone that promotes the 120 h AED transition from the larval to the pupal stage.[40] This treatment suppressed the ER stress-induced delay of adult eclosion (Figure 2b) and aggravated the notched-wing phenotypes that result from the ER stress (Figure 2c), showing that the developmental delay participates to tissue homeostasis. Therefore, the

developmental delay favors regeneration after an ER stress in the wing imaginal disc.

Recently, *dilp8* expression has been reported to induce developmental delay in challenged imaginal discs.[19,23] Indeed, accumulation of EGFP, reporting *dilp8* expression thanks to $dilp8^{MI00727}$,[23] was observed in cells in which caspases were activated (Figures 2d and e) and *dilp8* mRNA was increased by 230-fold in ER stressed wing imaginal discs when compared with unstressed wing discs (Figure 2f). This increase was not significantly modified in *dronc* mutant wing imaginal discs (Figure 2g, $P=27\%$, paired t -test), suggesting that the caspase activation is not the major control of *dilp8* expression. A significant decrease of the adult eclosion delay (Figure 2h) as well as a shift toward stronger notched-wing phenotypes (Figure 2i) were observed in $dilp8^{MI00727}$homozygous mutants in which *dilp8* mRNA levels are strongly reduced.[23] Altogether, these results indicate that Dilp8 is a major contributor to both developmental delay and tissue homeostasis after ER stress that is not directly controlled by caspase activation.

The JNK pathway activation in apoptotic cells depends on PERK/ATF4 and controls a developmental delay. The JNK signaling has been previously reported to regulate *dilp8* expression but also to be activated by ER stress-induced cell death in the *Drosophila* model of ADRP.[5,19] We also observed a JNK pathway activation after ER stress induction, thanks to the accumulation of the matrix metalloproteinase 1 (MMP1; Figures 3a and a'), as well as the expression of *PlacZ* enhancer traps that report the expression of downstream effectors of the JNK pathway, that is, *misshapen* (*msn*; Figures 3b and b') and *puckered* (*puc;* Figures 3c and c').[41] *puc-lacZ* colocalized with TUNEL (Figure 3d) labeling but not with an anti-PH3 staining (Figure 3d'). Similar results were found with *msn-lacZ* (Supplementary Figure S4). Therefore, the JNK signaling is not activated in proliferating cells in response to the ER stress but in apoptotic cells.

We thus asked whether the ER stress-induced apoptosis was JNK dependent. To address this question, we checked whether the inhibition of the JNK signaling was able to modify ER stress-induced cell death. Neither the expression of a dominant negative form of the JNK Basket (Bsk^{DN}) nor the RNAi-mediated depletion of the *Drosophila* JNKK MMK7 homolog, Hemipterous (Hep), had any obvious effect on apoptosis (Figures 3e and e"). The interfering RNA was verified for its efficacy on Eiger-induced cell death and was validated by Marchal *et al.*[42] This could suggest that our model of ER stress differs from the Retinitis Pigmentosa model, in which apoptosis induction involves a CDK5-dependent activation of JNK signaling.[5] Confirming our hypothesis, *CDK5* depletion did not modify the ER stress-induced cell death triggered by *Psn* overexpression (Figure 3e'"). These results indicate that, although activated, the JNK pathway does not regulate ER stress-induced apoptosis in our model of ER stress.

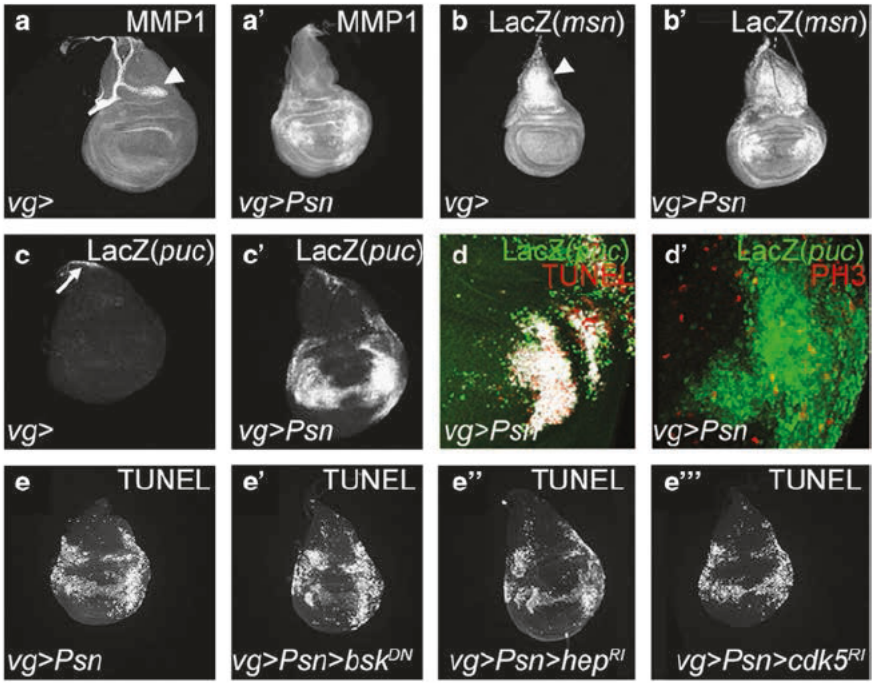


Figure 3 *Psn* overexpression induces a JNK pathway-independent apoptosis. (**a**, **a'**) Anti-MMP1 staining in *vg-GAL4/+* (**a**) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (**a'**) third-instar wing imaginal discs. (**b**–**c'**) Anti-β-Galactosidase staining to detect the expression of *msn-* (**b**) or *puc-lacZ* (**c**, **d**) reporters in *vg-GAL4/+; msn^{06946}/+* (**b**), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn^{06946}/+* (**b'**), *vg-GAL4/+; puc^{E69}/+* (**c**) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc^{E69}/+* (**c'**) third-instar wing imaginal discs. Note MMP1 staining (**a**) and *msn-lacZ* expression (**b**) in the notum (white arrowheads) are constitutive and independent from *Psn* overexpression. Note that *puc-lacZ* expression at the tip of the notum reflects the JNK pathway activation required for thorax closure (**c**, white arrow). (**d**, **d'**) Colocalization (white) between anti-β-Galactosidase staining (green) to detect *puc* expression and either TUNEL labeling (**d**, red) to detect apoptosis or anti-PH3 (**d'**, red) to detect mitotic cells in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc^{E69}/+* third-instar larvae wing imaginal discs. (**e**–**e'''**) TUNEL staining in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (**e**), *UAS-bsk^{DN}/+ vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (**e'**), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hep-RNAi/+* (**e'**) and in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-cdk5-RNAi* (**e'''**) third-instar wing imaginal discs

Next, we tested whether the JNK pathway could modulate ER stress-induced *dilp8* expression and therefore developmental timing. Reducing the JNK activity by overexpressing *puc*, which encodes a phosphatase negatively regulating JNK signaling,[43,44] significantly rescued the developmental delay (Figure 4a), led to an aggravation of the wing phenotype (Figure 4b) and suppressed *dilp8* expression (Figures 4c and d). Opposite effects on developmental delay, wing phenotype and *dilp8* expression were observed in flies heterozygous for the puc^{E69} loss-of-function mutant allele (Figures 4a–d). Altogether, these results show that JNK signaling is involved in maintaining tissue homeostasis after ER-stress, by stimulating *dilp8* expression.

To address the question of the mechanism of activation of the JNK pathway, we tested whether the JNK signaling depends on DIAP1/Dronc. Given that the ER stress involved Dronc activation (Figures 1a and c) and DIAP1 downregulation (Figures 1d and f), we overexpressed both *Psn* and *diap1* to counteract DIAP1 decrease and block Dronc activation. Under these conditions, caspase activation was strongly suppressed but no significant modification of the JNK activation was revealed by anti-MMP1 staining or by detecting *dilp8* expression (Figures 5a and b). Altogether, these results suggest that JNK signaling is not mainly controlled by DIAP1/Dronc.

We next checked whether the components of the PERK branch of the UPR could modulate the JNK pathway activation. Depletion of ATF4 strongly reduced the JNK activation that was directly assayed by an anti-MMP1 staining or indirectly by detecting *dilp8* expression (Figures 5c and d). Similar results were observed by reducing the dosage of the ATF4-encoding gene, *crc*, thanks to crc^{1} and $crc^{BG00047}$ hypomorphic mutant alleles (data not shown). In agreement with *dilp8* expression reduction, ATF4 depletion also suppressed the ER stress-induced developmental delay (Figure 5e). Similar results were found by depleting PERK and converse effects were observed when GADD34 was depleted (Supplementary Figure S5), confirming that the PERK/ATF4 branch of the UPR activates JNK signaling. Therefore, tissue homeostasis is maintained when ER stress induces cell death thanks to a developmental delay controlled by the JNK pathway in an ATF4-dependent manner.

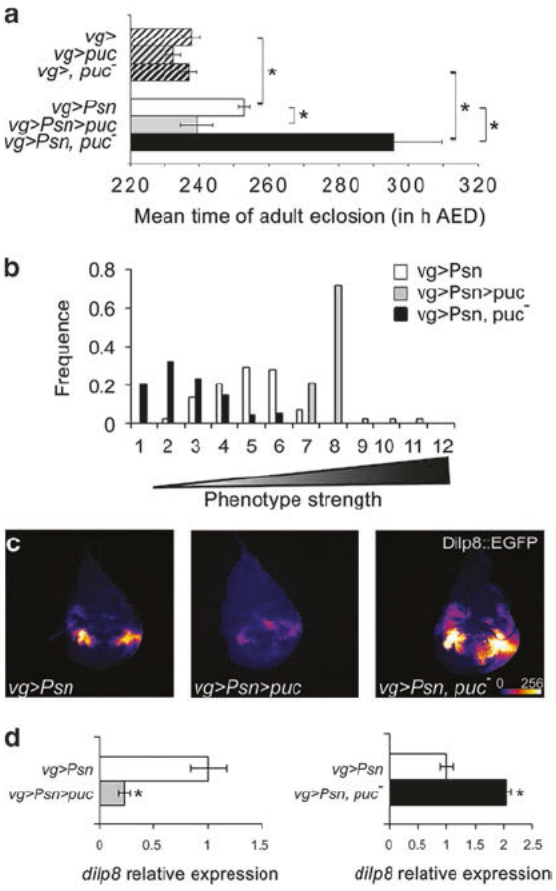


Figure 4 The JNK pathway regulates a Dilp8-dependent developmental delay. (**a**) Effects of *puc* overexpression (*UAS-puc*) (gray) and *puc* mutant heterozygosity (puc^{E69}/+) (black) compared with control (white) in a *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) or *vg-GAL4/+* (hatched bars) background on the mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. (n 4). Asterisks indicate significant difference ($P<10^{-4}$, ANOVA). (**b**) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-puc/+* (gray bars) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+;* puc^{E69}/+ (black bars) flies compared with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* flies (open bars). (**c, d**) Intensity of GFP reflecting *dilp8* expression in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+;* $dilp8^{MI00727}$/+ (**c** left, **d** white bars), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+;* $dilp8^{MI00727}$/*UAS-puc* (**c** center, **d** gray bar), and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+;* $dilp8^{MI00727}$/puc^{E69} (**c** right, **d** black bar) third-instar wing imaginal discs. Error bars represent the S.E.M. of at least eight independent experiments. Asterisks indicate significant difference ($P<10^{-3}$, ANOVA)

A Rac1/Slpr-dependent JNK pathway regulates developmental delay after ER-stress. The core of the JNK pathway is composed by Jra and Kay, which dimerize to form the dAP-1 transcription factor, and the unique JNK, Bsk. We observed that *Jra* or *kay* depletion, which had no effect in the absence of ER stress, aggravated the wing phenotype (Supplementary Table S1), showing that the JNK pathway core is involved in tissue homeostasis after an ER stress.

We decided to identify the upstream JNK pathway components that promote ER stress-induced developmental delay. A shift toward stronger wing phenotypes was observed when the JNKKs dMKK4 and Hep (Supplementary Table S1) or the JNKKK Slpr were depleted by RNAi in the presence of ER stress-induced cell death (Figure 6a,Supplementary Table S1). These depletions did not have any detectable effect by themselves (data not shown). Slpr depletion also decreased *dilp8* expression and the ER stress-induced developmental delay (Figures 6d, g and j). Slpr can be activated by direct interaction with either Msn or the Rac1 GTPase.[45] We thus examined if these interactors participate to ER stress-associated JNK signaling. Surprisingly, *msn* depletion induced a distribution shift toward weaker phenotypes (Figure 6b). It also increased both *dilp8* expression (Figures 6e and h) and developmental delay (Figure 6k) in response to ER stress. These results suggest that Msn may antagonize JNK signaling, which, to our knowledge, has only been observed once.[46] As ER stress induces *msn* expression (Figure 3b), we thus asked whether this was in a JNK-dependent manner. Indeed, the expression of a Bsk dominant negative form strongly reduced *msn* expression (data not shown), suggesting that Msn could belong to a JNK pathway negative feedback induced after ER stress.

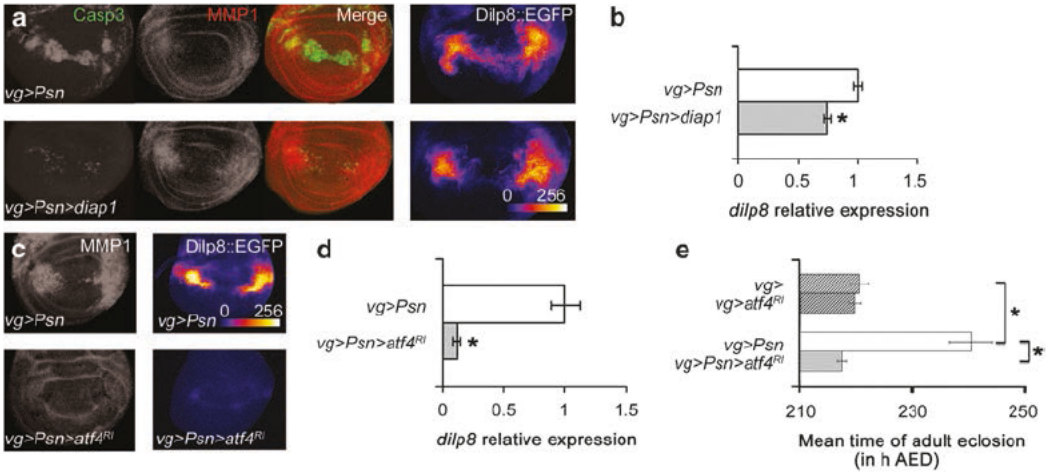


Figure 5 ATF4 activates the JNK pathway. (**a**, left) Anti-activated caspase 3 (green) and anti-MMP1 (red) staining in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-diap1/+* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (**a**, right) Intensity of GFP in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*^{MI00727}*/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*^{MI00727}*/UAS-diap1* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (**b**) Quantification of relative *dilp8::EGFP* expression. Error bars represent the S.E.M. of at least nine independent experiments. The asterisk indicates significant difference between the indicated genotype and the control ($P<10^{-5}$, ANOVA). (**c**) Anti-MMP1 staining (left) and intensity of Dilp8::EGFP detection (right) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-atf4-RNAi* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (**d**) Quantification of relative *dilp8* expression. Error bars represent the S.E.M. of at least four independent experiments. The asterisk indicates significant difference between the indicated genotype and the control ($P<10^{-4}$, ANOVA). (**e**) Effects of ATF4 depletion (gray bars) compared with control (white bars) on *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (solid bars) and *vg-GAL4/+* (streaked bars) on the mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. (*n* 3). The asterisk corresponds to a statistical difference ($P<10^{-3}$, ANOVA)

Finally, depletion of *rac1* induced a shift toward stronger wing phenotypes (Figure 6c) and a decrease of *dilp8* expression (Figures 6f and i) resulting in a developmental delay suppression (Figure 6l). Therefore, Rac1 seems to be the JNK pathway activator that triggers ER stress-induced developmental delay. In conclusion, the developmental delay seems to be dependent of a Rac1/Slpr/JNK pathway.

Discussion

As previously reported in mammalian cells, we have validated that *Psn* overexpression can provoke chronic ER stress in *Drosophila*.[26] In mammalian models, the UPR branches can display opposite roles depending on the model. For example, Perk can be either anti or proapoptotic.[47–49] Thanks to a new model of chronic ER stress, we have demonstrated in this study that the PERK/ATF4 pathway has a fundamental role in *Drosophila* tissue homeostasis (Figure 7). So far, the ADRP model was the only model of strong chronic ER stress reported in *Drosophila*.[5,24] We have validated that *Psn* overexpression can also provoke a chronic ER stress in *Drosophila*, as previously reported in mammalian cells.[26] In both *Drosophila* models, apoptosis is induced by UPR in response to ER stress. Nevertheless, this induction involves totally different pathways. In our chronic ER stress model, cell death induction is PERK/ATF4 dependent and JNK independent, contrarily to the ADRP model in which CDK5 activates JNK signaling that triggers apoptosis.[5] These differences show that the complexity of ER stress-induced signaling found in mammals is conserved in *Drosophila*, thus highlighting the usefulness of ER stress models plurality.

We have shown that the PERK/ATF4 pathway induces a caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* transcription. However, PERK has been described to exert some antiapoptotic activity by inducing *IAP* gene expression in mammals.[47] This effect does not seem to rely on direct targets of PERK, ATF4 and CHOP.[50] Similarly, we did not find any ATF4 consensus binding sequence (5'-RTTRCRTCA-3') in the *diap1* promoter region and no CHOP homolog has been found in *Drosophila*. Therefore, the mechanisms involved in PERK regulation of IAPs remain to be clarified.

In our chronic ER stress model, the JNK pathway is activated in apoptotic cells to favor tissue homeostasis without stimulating cell proliferation. This is in contrast to a JNK activation in cells neighboring apoptotic cells, which results in an increase of the proliferation rate.[11] Similar to our observation, JNK activation in apoptotic cells has been observed in 'undead cell' models.[9,12–14] In these models, the JNK pathway could be activated by DIAP1 or DRONC, whereas JNK signaling seems to be primarily independent from DIAP1/DRONC in our model. In a mammalian model of chronic ER stress, the IRE1 branch of the UPR activated the JNK pathway to trigger apoptosis thanks to TRAF2/ASK1.[51] In our ER stress model, depletion of *traf2* or *ask1* had no effect (Supplementary Table S1 and data not shown). Instead, we have shown for the first time that JNK pathway activation mainly depends on the PERK/ATF4 pathway. Interestingly, this particular JNK pathway is not mainly activated by apoptosis and does not modulate cell death or proliferation.

We have also shown that PERK/ATF4 regulates an ER stress-induced developmental delay. As previously reported, we observed that Dilp8 is a major contributor to developmental delay.[19,23] An obvious candidate for a Dilp8-independent developmental delay regulation was the retinoic acid signaling that has been reported to modulate an irradiation-induced developmental delay.[22] We have tested if this pathway could also regulate the developmental delay caused by *Psn*

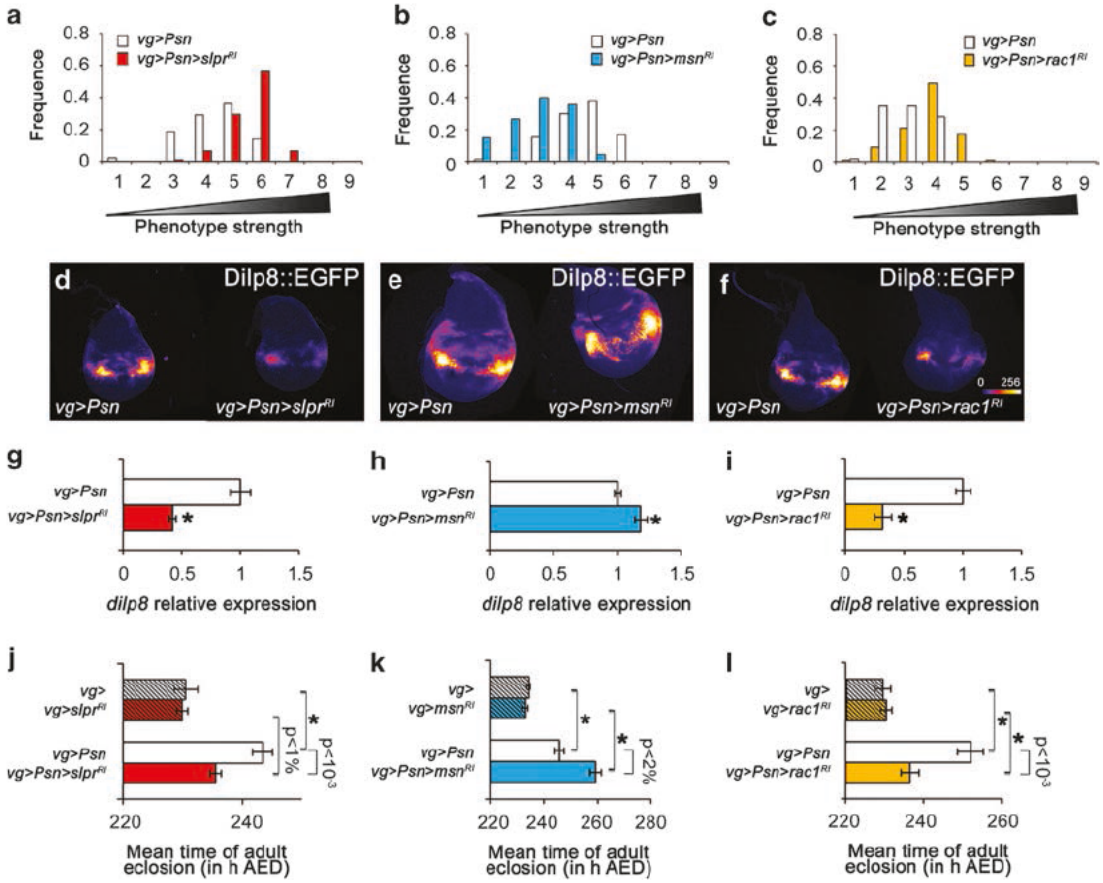


Figure 6 The Rac1/Slpr JNK pathway triggers an ER stress-induced developmental delay negatively controlled by Msn. (**a**–**c**) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-slpr-RNAi/+* (**a**, red), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-msn-RNAi/+* (**b**, blue) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Rac1-RNAi/+* (**c**, yellow) flies compared with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* flies (**a**–**c**, white). (**d**–**i**) Intensity of GFP emitted by the *dilp8::EGFP* reporter in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (**d**–**i**), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-slpr-RNAi/+* (**d**, **g**), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-msn-RNAi/+* (**e**, **h**) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Rac1-RNAi/+* (**f**, **i**) third-instar wing imaginal discs. Error bars represent the S.E.M. of at least six independent experiments. Asterisks indicate significant difference between the indicated genotype and its control ($P<10^{-4}$). (**j**–**l**) Effects of Slpr (**j**, red), Msn (**k**, blue) and Rac1 (**l**, yellow) depletion compared with the control (white) in a *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) or *vg-GAL4/+* (hatched bars) background on mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. of seven independent experiments. Asterisks correspond to significant difference between controls without *Psn* (hatched bars) and the indicated genotype ($P<10^{-4}$, ANOVA)

overexpression. No wing phenotype modification was detected upon the downregulation of this pathway (data not shown).

We have characterized the components of the JNK signaling that is activated in response to chronic ER stress in *Drosophila* wing imaginal discs (Figure 7). The small GTPase Rac1 would activate the JNKKK Slpr, which in turn would activate JNK signaling core to regulate *dilp8* expression and ultimately favor development delay and tissue homeostasis maintenance. How the ATF4/PERK branch activates Rac1 remains to be elucidated. Our results also suggest the existence of a negative feedback loop regulating the JNK pathway, which would involve the JNKKKK, Msn. This is in agreement with a genetic and phosphoproteomic study showing that Msn is able to inhibit the phosphorylation of Jun.[46] Considering that the JNK pathway induces *dilp8* expression in abnormally growing imaginal discs in other stress models,[19] one may wonder whether the same JNK pathway is implicated in these models. Moreover, one may wonder whether *dilp8* control during tissue homeostasis-associated developmental delay is always JNK-dependent and relies on a Rac1/Slpr pathway.

To summarize, we have shown in this study that in response to an ER stress induced by *Psn* overexpression, the PERK pathway is activated resulting in a Janus-faced ATF4 role. On one hand, ATF4 induces caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* expression and on the other hand, it favors tissue homeostasis maintenance through the induction of a Rac1/Slpr/JNK pathway and the resulting *dilp8* expression. More investigations on this new *Drosophila* chronic ER-stress model should allow the identification of novel regulators of UPR-dependent tissue and organism homeostasis that may be conserved in mammals.

Materials and Methods

***Drosophila* crosses and strains.** Flies were raised on standard corn-agar medium. All crosses were performed at 25 °C. The *Drosophila* strains used carried *vg-GAL4*,[52] *puc*^{E69},[41] *UAS-puc*,[43] *UAS-Psn* (Psn+14),[53] *UAS-xbp1::EGFP reporter*,[32] *UAS-diap1*,[54] *UAS-EGFP9.2*,[55] *UAS-p35* (BI#6298), *msn*^{06946}(BI#11707), *th*^{5C8} (BI#12093),[35] *UAS-bsk*^{DN} (BI#108773),[56] *dilp8*^{MI00727} (BI#33079). The *UAS-cdk5-RNAi* (BI#35287), *UAS-atf4-RNAi* (BI#25985), *UAS-Rac1-RNAi* (BI#28985) strains from the Transgenic RNAi Project (TRIP) were provided by the Bloomington

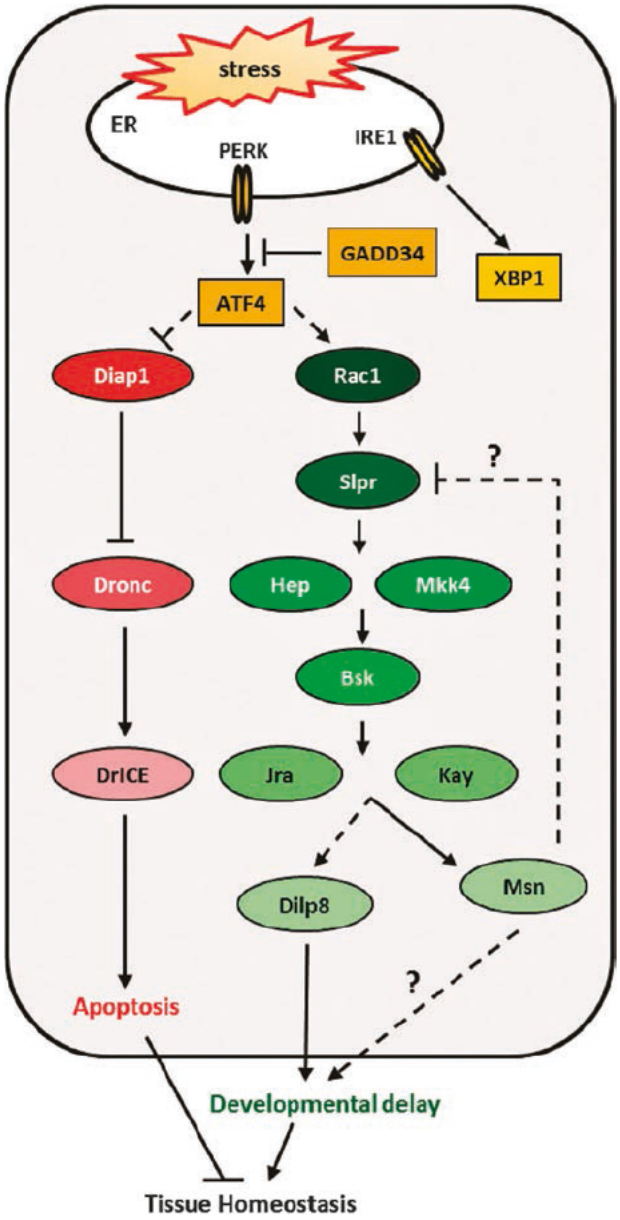


Figure 7 Model of tissue homeostasis maintenance after an ER stress. Chronic ER stress activates the PERK pathway, which results in ATF4 expression. ATF4 has two antagonistic functions. On one hand, ATF4 induces a caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* expression. On the other hand, it favors tissue homeostasis through the induction of *dilp8* expression by Rac1/Slpr/JNK pathway activation. The role of Msn in the control of the observed developmental delay remains to be elucidated. It could either negatively regulate the JNK pathway or have a JNK pathway-independent mechanism of action

Drosophila Stock Center (BDRC, Bloomington, IN, USA). The *UAS-slpr-RNAi* (ID 106449) and *UAS-msn-RNAi* (ID 101517) strains were obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria), while the *UAS-hep-RNAi* (4353R2) strain was provided by the National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Kyoto, Japan). Genetic background control strains were adapted to the different transgenic lines we used. The $rhea^{MI00296}$ (BI#30955) strain was used as the control for $dilp8^{MI00727}$ (BI#33079) genetic background, the *y,w[1118];P{attP,y[+],w[3]}* (ID 60100) line was the control of the KK library hosted by the VDRC, the $y^1 v^1$; *P{UAS-GFP.VALIUM10}attP2* (BI#35786) was used as a control for the TRIP V10 library and $y^1 sc^1 v^1$ *P{nos-phiC31\int.NLS}X; P{CaryP}attP2* (BI#25710) for the TRIP V20 library. Canton S flies were used as reference for all the other strains.

Immunostaining, TUNEL assay and microscopy. Wing discs of third-instar male larvae were dissected in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde for 20 min at room temperature. Samples were then washed thrice in PBT 0.3%. TUNEL staining was performed following manufacturer's instructions (ApopTag Red *in situ* apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Immunostaining was always performed, according to standard protocols, before the TUNEL assay. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1 : 20), mouse anti-β-galactosidase (40-1a, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1 : 200), mouse anti-MMP1 (5H7B11, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1 : 30), mouse anti-DIAP1 (kind gift from B Hay, 1 : 200). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 568 or 647 were purchased from Molecular Probes (Eugen, OR, USA 1 : 400). Discs were mounted in Citifluor (Biovalley, Marne-La-Vallée, France). Images were captured using a Leica SPE confocal laser-scanning microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Images were processed and treated with ImageJ and Adobe Photoshop 8.0. We used the Colocalization plugin (Pierre Bourdoncle, 2003), which considers that two signals colocalize if their respective intensities are strictly higher than the threshold of their channels and if their ratio of intensity is strictly higher than the ratio setting value (here, 75%). Transverse sections were computationally generated after reslicing confocal stacks using ImageJ. GFP mean intensity of the $Dilp8^{MI00727}$-encoded protein trap was evaluated using the 'measure' function of ImageJ.

Developmental timing and 20E treatment. Eighty females were crossed to 40 males and transferred to fresh food after 2 days for 1 h to deposit eggs on culture medium. Flies reaching adulthood or pupariating were then counted every 3 h. Addition of ecdysteroid (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was performed accordingly to standard protocols.[22] Each experiment was realized at least thrice independently and data were statistically analyzed by ANOVA.

Genetic interaction test. Genetic interactions were tested based on the modulation of the severity of *Psn* overexpression-dependent notched-wing phenotype. Wings were categorized according to the number and size of notches observed in their margin (Supplementary Figure S1A). To control the genetic background, mutant strains and control strains were first crossed with males containing reference chromosomes carrying markers, that is, *Bl* for chromosome II and *Dr* for chromosome III. Male progeny carrying *Bl, Dr* and the mutation to be tested were crossed with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn* flies. To rule out any effect by itself of the tested strains, control crosses with *vg-GAL4* females were performed for each strain. Only the results obtained with males are depicted in figures although all data were statistically analyzed by ANOVA, which allows to determine the effect of the chromosome of interest compared with the same chromosome in the control genetic background.

RNA extraction and RT-qPCR. Fifty wing imaginal discs were dissected in the RNA XS NucleoSpin kit's lysis buffer on ice for each genotype. Total RNAs were extracted using this kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RT was performed using 4.8 μg of RNA incubated with random primer oligonucleotides and Recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA). Real-time PCR was performed using the ABI Prism 7700 HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) with SYBRGreen mastermix (Abgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 11 ng of cDNA. The real-time PCR primers (Invitrogen, Life Technologies) were designed as in Garelli *et al*.[23] Three independent RT experiments were performed and data were normalized against *rp49* mRNA levels.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. Confocal image acquisition and analysis were performed on CYMAGES imaging facility. We thank S Netter, B Limbourg-Bouchon, B Hay, J-A Lepesant and ME Fortini for providing fly stocks and antibodies. We are very grateful to S Netter and I Guenal for suggestions on the manuscript and helpful discussions throughout this work. We thank C Pirou, P Gandille, C Wintz and our team for their contribution to this project. This article is dedicated to the memory of Didier Contamine who succumbed to a long illness after initiating this project. We acknowledge the NIG (National Institute of Genetics, Kyoto, Japan), Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria) and Bloomington Stock center (Bloomington, IN, USA) for providing fly stocks.

1. Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 349 355.
2. Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; **18**: 575 599.
3. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; **110**: 1389 1398.
4. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; **334**: 1081 1086.
5. Kang MJ, Chung J, Ryoo HD. CDK5 and MEKK1 mediate pro apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 409 415.
6. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; **14**: 996 1007.
7. Ryoo HD, Steller H. Unfolded protein response in *Drosophila*: why another model can make it fly. *Cell Cycle* 2007; **6**: 830 835.
8. Mollereau B, Perez Garijo A, Bergmann A, Miura M, Gerlitz O *et al*. Compensatory proliferation and apoptosis induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 181.
9. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 2004; **7**: 491 501.
10. Perez Garijo A, Shlevkov E, Morata G. The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* 2009; **136**: 1169 1177.
11. Bergantinos C, Corominas M, Serras F. Cell death induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* 2010; **137**: 1169 1179.
12. Huh JR, Guo M, Hay BA. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* 2004; **14**: 1262 1266.
13. Wells BS, Yoshida E, Johnston A. Compensatory proliferation in *Drosophila* imaginal discs requires Dronc dependent p53 activity. *Curr Biol* 2006; **16**: 1606 1615.
14. Kondo S, Senoo Matsuda N, Hiromi YMiura M. DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7258 7268.
15. Perkins KK, Dailey GM, Tjian R. Novel Jun and Fos related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP 1. *EMBO J* 1988; **7**: 4265 4273.
16. Chen W, White MA, Cobb MH. Stimulus specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49105 49110.
17. Stronach B, Perrimon N. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* 2002; **16**: 377 387.
18. Stronach B. Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. *Dev Dyn* 2005; **232**: 575 584.
19. Colombani J, Andersen DS, Leopold P. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 2012; **336**: 582 585.
20. Hussey RG, Thompson WR, Calhoun ET. The Influence of X Rays on the Development of *Drosophila* Larvae. *Science* 1927; **66**: 65 66.
21. Simpson P, Berreur P, Berreur Bonnenfant J. The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J Embryol Exp Morphol* 1980; **57**: 155 165.
22. Halme A, Cheng M, Hariharan IK. Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol* 2010; **20**: 458 463.
23. Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal discs secrete insulin like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 2012; **336**: 579 582.
24. Ryoo HD, Domingos PM, Kang MJ, Steller H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J* 2007; **26**: 242 252.
25. Michno K, Knight D, Campusano JM, van de Hoef D, Boulianne GL. Intracellular calcium deficits in *Drosophila* cholinergic neurons expressing wild type or FAD mutant presenilin. *PLoS One* 2009; **4**: e6904.
26. Honarnejad K, Jung CK, Lammich S, Arzberger T, Kretzschmar H, Herms J. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2013; **17**: 293 302.
27. Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM, Wojczyk BS, Tanzi RE *et al*. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9223 9228.
28. Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D *et al*. Presenilin 1 controls gamma secretase processing of amyloid precursor protein in pre golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; **147**: 277 294.
29. Levitan D, Lee J, Song L, Manning R, Wong G, Parker E *et al*. PS1 N and C terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 12186 12190.
30. Kim J, Kleizen B, Choy R, Thinakaran G, Sisodia SS, Schekman RW. Biogenesis of gamma secretase early in the secretory pathway. *J Cell Biol* 2007; **179**: 951 963.
31. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993; **118**: 401 415.
32. Souid S, Lepesant JA, Yanicostas C. The xbp 1 gene is essential for development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 2007; **217**: 159 167.
33. Fan Y, Bergmann A. The cleaved caspase 3 antibody is a marker of caspase 9 like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 534 539.
34. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34 mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1011 1022.
35. Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 432 438.
36. Smith Bolton RK, Worley MI, Kanda H, Hariharan IK. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by wingless and Myc. *Dev Cell* 2009; **16**: 797 809.
37. Herrera SC, Martin R, Morata G. Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003446.
38. Bryant PJ, Simpson P. Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol* 1984; **59**: 387 415.
39. Haynie JL, Bryant PJ. Intercalary regeneration in imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1976; **259**: 659 662.
40. Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin Villemant C, Antoniewski C *et al*. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 2005; **310**: 667 670.
41. Ring JM, Martinez Arias A. Puckered, a gene involved in position specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the Drosophila larva. *Dev Suppl* 1993; **121**: 251 259.
42. Marchal C, Vinatier G, Sanial M, Plessis A, Pret AM, Limbourg Bouchon B *et al*. The HIV 1 Vpu protein induces apoptosis in *Drosophila via* activation of JNK signaling. *PLoS One* 2012; **7**: e34310.
43. Martin Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM *et al*. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 1998; **12**: 557 570.
44. McEwen DG, Peifer M. Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK induced apoptosis. *Development* 2005; **132**: 3935 3946.
45. Garlena RA, Gonda RL, Green AB, Pileggi RM, Stronach B. Regulation of mixed lineage kinase activation in JNK dependent morphogenesis. *J Cell Sci* 2010; **123**: 3177 3188.
46. Bakal C, Linding R, Llense F, Heffern E, Martin Blanco E, Pawson T *et al*. Phosphorylation networks regulating JNK activity in diverse genetic backgrounds. *Science* 2008; **322**: 453 456.
47. Hamanaka RB, Bobrovnikova Marjon E, Ji X, Liebhaber SA, Diehl JA. PERK dependent regulation of IAP translation during ER stress. *Oncogene* 2009; **28**: 910 920.
48. Verfaillie T, van Vliet A, Garg AD, Dewaele M, Rubio N, Gupta S *et al*. Pro apoptotic signaling induced by photo oxidative ER stress is amplified by Noxa, not Bim. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **438**: 500 506.
49. Oommen D, Prise KM. Down regulation of PERK enhances resistance to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **441**: 31 35.
50. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J *et al*. ER stress induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 481 490.
51. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K *et al*. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002; **16**: 1345 1355.
52. Simmonds AJ, Brook WJ, Cohen SM, Bell JB. Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* 1995; **376**: 424 427.
53. Ye Y, Fortini ME. Characterization of *Drosophila* Presenilin and its colocalization with Notch during development. *Mech Dev* 1998; **79**: 199 211.
54. Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995; **83**: 1253 1262.
55. Netter S, Faucheux M, Theodore L. Developmental dynamics of a polyhomeotic EGFP fusion *in vivo*. *DNA Cell Biol* 2001; **20**: 483 492.
56. Adachi Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E *et al*. p38 mitogen activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2322 2329.

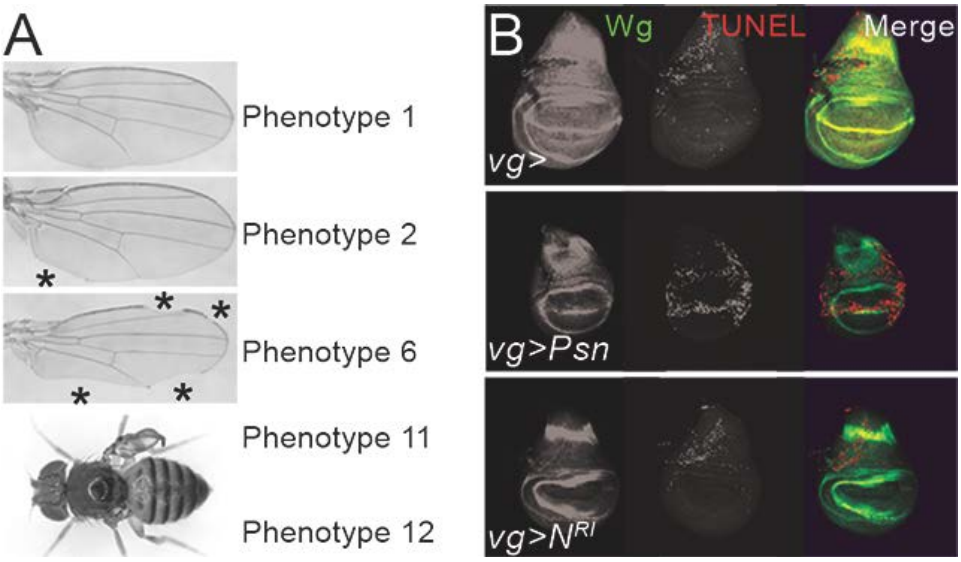
Cell Death and Disease **is an open-access journal published by *Nature Publishing Group*. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

	Genes	Mutations/RNAis	n	p	Stock-ID
Enhancing	*Jra*	*P{Jbz}1*	687	$<10^{-7}$	BL#7217
		P{Jbz}10	746	$<10^{-6}$	BL#7218
		Jra^{IA109}	306	$<10^{-3}$	BL#3273
	kay	kay^{sro-1}	603	$<10^{-3}$	BL#3091
		P{UAS-Fra.Fbz}5	502	$<10^{-3}$	BL#7214
		P{UAS-Fra.Fbz}7	621	$<10^{-14}$	BL#7215
	bsk	*P{NIG.5680R-2}*	544	$<10^{-4}$	5680R-2
		bsk^{1}	407	$<10^{-7}$	BL#3088
	hep	*P{NIG.4353R}*	752	$<10^{-3}$	4353R
	Mkk4	$Mkk4^{e01485}$	529	$<10^{-5}$	BL#17956
		dMKK4[Dfp25]	467	$<10^{-10}$	BL#1944
	slpr	*P{KK100726}*	581	$<10^{-6}$	v106449
		P{TRiP.HMS00742}	879	$<10^{-6}$	BL#32948
	Rac1	$Rac1^{J11}$	404	$<10^{-8}$	BL#6674
		P{TRiP.JF02813}	667	$<10^{-5}$	BL#28985
Suppressing	*puc*	*P{UAS-puc}*	517	$<10^{-14}$	
		puc^{E69}	476	$<10^{-4}$	BL#6762
	msn	*P{TRiP.JF03219}*	695	$<4.10^{-2}$	BL#28791
		P{NIG.16973R}	506	$<10^{-3}$	16973R
		P{KK108948}	548	$<10^{-7}$	v101517
Neutral	*wnd*	*P{KK100521}*	669	$>5.10^{-2}$	v103410
	TAK1	*P{TRiP.JF01384}*	667	$>5.10^{-2}$	BL#31394
		P{KK108611}	586	$>5.10^{-2}$	v101357
	dASK1	*P{GD11408}*	193	$>5.10^{-2}$	v34892
		P{GD11408}	638	$>5.10^{-2}$	v34891
	Tab2	*P{KK105926}*	598	$>5.10^{-2}$	v100326
		$Tab2^{EY00380}$	449	$>5.10^{-2}$	BL#14838
	dTRAF1	*P{KK107398}*	653	$>5.10^{-2}$	v110766
		dTRAF1 GD 21214	354	$>5.10^{-2}$	v21214
	dTRAF2	*P{TRiP.HMS00880}*	467	$>5.10^{-2}$	BL#33931
		P{KK107947}	600	$>5.10^{-2}$	v110266

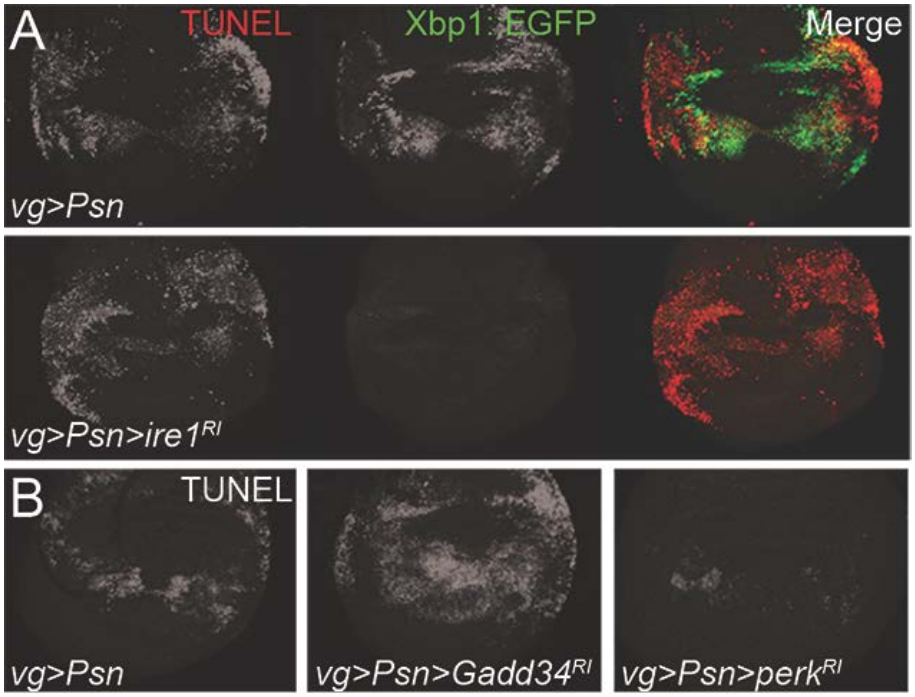
Supplementary Table S1 Status of JNK pathway components toward the adult wing phenotype associated to a chronic ER stress.

n indicates the number of flies counted for the genotype and p indicates the probability found by ANOVA.



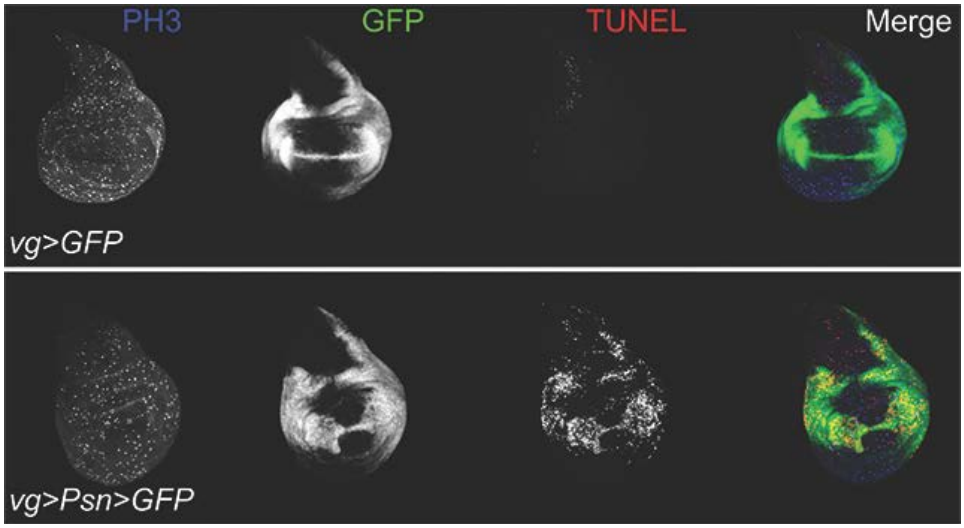
Supplementary Figure S1 *Psn* overexpression-induced phenotypes differ from Notch loss-of-function phenotypes.

(A) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* notched wing phenotypes can be categorized according to the number and size of the wing margin notches (asterisks). They range from a wild-type phenotype (phenotype 1) to the complete absence of a wing (phenotype 12). (B) Anti-Wingless (mouse anti-Wingless, 4D4, DSHB, 1:200, green) and TUNEL (red) stainings in *vg-GAL4/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (middle) and *vg-GAL4, UAS-Notch-RNAi/+* (bottom) third instar wing imaginal discs show that *Psn* overexpression does not turn off *wg* expression but induces apoptosis in the *vg* domain while *Notch* down-regulation has an opposite effect on both stainings. Notch depletion does not recapitulate the effects of an overexpression of *Psn*, thus indicating that *Psn* overexpression-dependent phenotypes are independent from Psn γ-secretase activity.



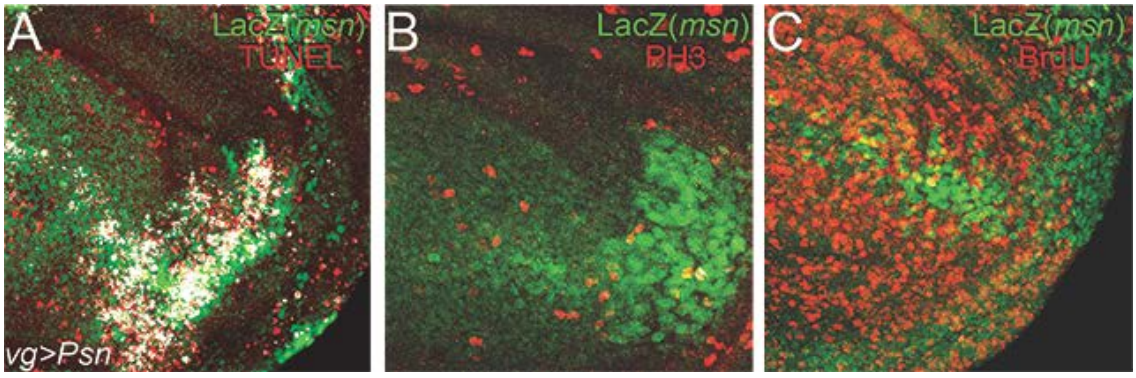
Supplementary Figure S2 The PERK pathway is responsible for *Psn* overexpression-induced apoptosis.

(A) TUNEL staining (red) and detection of Xbp1::EGFP reporter fluorescence (green) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-xbp1::EGFP/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-ire1; UAS-xbp1::EGFP/+* (bottom). (B) TUNEL staining in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (left), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Gadd34-RNAi/+* (center) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-perk-RNAi* (right) third instar wing imaginal discs.



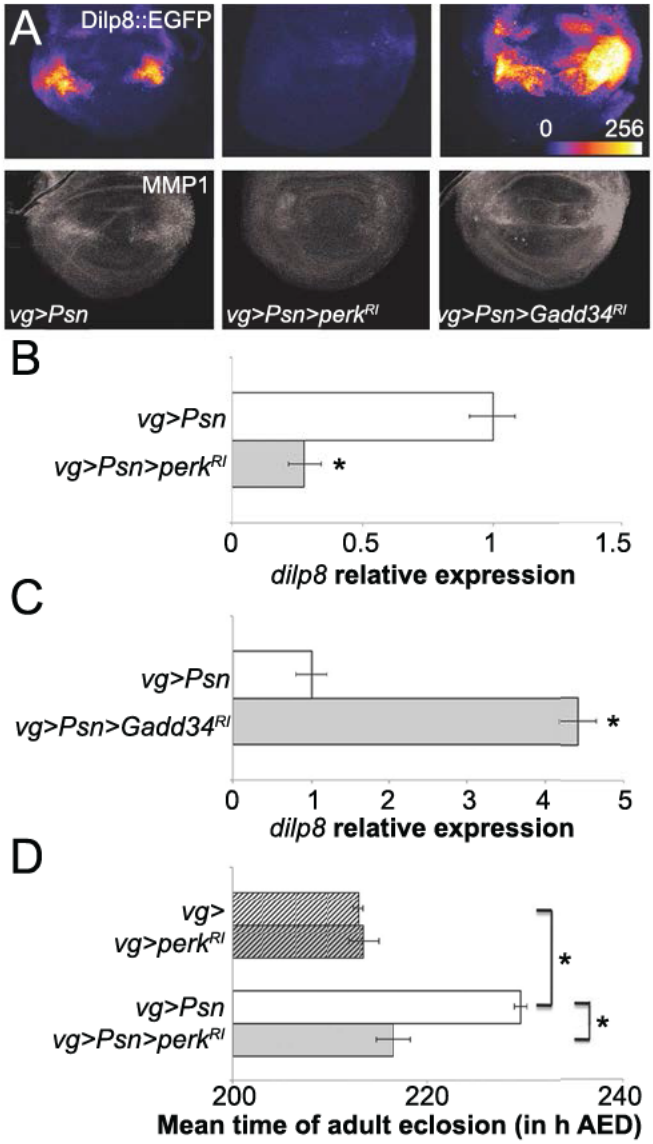
Supplementary Figure S3: ER stress-dependent apoptosis does not induce compensatory proliferation.

Anti-Phospho-Histone 3 (PH3) (rabbit anti-phospho-Histone H3 Ser10, Millipore, 1:1000) staining (blue) to detect mitotic cells, GFP detection (green) to visualize the *vg* expression domain, and TUNEL staining (red) to detect apoptosis in *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top row) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (bottom row) third instar wing imaginal discs.



Supplementary Figure S4 The JNK pathway is activated in apoptotic cells but not in proliferating cells.

Colocalization (white) between anti-β-Galactosidase staining (green) to detect *msn* expression and either TUNEL labeling to detect apoptosis (A, red), anti-PH3 to detect mitotic cells (B, red) or anti-BrdU to detect cells in S-phase (C, red) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn*^{06946}/+ third instar larva wing imaginal discs.



Supplementary Figure S5 The PERK pathway activates the JNK pathway.

(A) Intensity of GFP detection (top) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*^{MI00727}*/+* (left), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-perk-RNAi; dilp8*^{MI00727}*/+* (middle) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*^{MI00727}*/UAS-Gadd34-RNAi* (right) third instar wing imaginal discs. Anti-MMP1 staining (bottom) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (left), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-perk-RNAi* (center) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Gadd34-RNAi/+* (right) third instar wing imaginal discs. (B-C) Relative quantification of *dilp8::GFP* expression. Error bars represent the SEM of at least six independent experiments. Asterisks indicate significant difference between the indicated genotype and the control ($p<10^{-4}$). (D) Effects of PERK depletion (gray bars) compared to control (white bars) on *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) and *vg-GAL4/+* (streaked bars) on the mean time of adult eclosion. Error bars represent the SEM (n=6). Asterisks correspond to a statistical difference between the indicated genotypes ($p<10^{-7}$, ANOVA).

II. ARTICLE 2

Different sources of ER stress trigger a unique wing disc-specific PERK/ATF4 signaling in *Drosophila*

Notre précédente étude (Demay et al., 2014), réalisée avec un modèle de stress chronique du RE déclenché par la surexpression de *Psn* dans le disque imaginal d'aile, met en évidence une apoptose dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR et indépendante de la voie de signalisation JNK. Ces résultats s'opposent à ceux décrits dans le modèle d'étude de l'ADRP. En effet, la surexpression d'un transgène codant une forme mal-repliée de la Rhodopsine-1 (Rh-1^{G69D}) dans le disque imaginal d'œil induit une mort cellulaire dépendante de la voie JNK (Kang et al., 2012). Nous nous sommes donc demandé si la différence observée au niveau de la signalisation responsable de l'induction de la mort cellulaire est liée à la nature de la source de stress ou à la spécificité du type cellulaire considéré.

Afin de répondre à cette question, nous avons testé si nos observations sur le modèle Psn étaient généralisables à d'autres sources de stress du RE dans le disque imaginal d'aile. La première de ces autres sources de stress du RE était l'accumulation d'une protéine à multiples domaines transmembranaires autre que la Psn. Contrairement à la Psn, la Rh-1 ne joue à priori aucun rôle connu dans le tissu d'aile. C'est pourquoi, nous avons surexprimé le transgène codant une forme mal-repliée de la Rhodopsine-1 (Rh-1^{G69D}) dans le disque imaginal d'aile. Outre sa capacité à s'agréger, la Psn est également décrite dans la littérature pour provoquer une dérégulation de l'homéostasie calcique du RE. Nous avons donc produit un stress du RE dû à une perturbation de l'homéostasie calcique en diminuant le niveau de la pompe SERCA grâce à un ARNi. En effet, l'inhibition de cette pompe par une drogue: la thapsigargine est décrite dans la littérature comme une source de stress du RE chez des modèles cellulaires de mammifères en culture ou chez *C. elegans*.

Notre étude comparative a permis de mettre en évidence que le stress induit par la surexpression de *Psn* est au moins en partie dû à une dérégulation de l'homéostasie calcique. Par ailleurs, nous avons observé chez ces nouveaux modèles (i) que la voie d'induction de l'apoptose est JNK-indépendante et ATF4-dépendante et (ii) que la voie de compensation que nous avons décrite dans notre précédente étude est également à l'œuvre, suggérant l'existence d'une spécificité tissulaire des signalisations déclenchées en réponse à un stress chronique du RE.

Title

Different sources of ER stress trigger a unique wing tissue-specific PERK signaling in *Drosophila*

Author names and affiliations

Jessica Perochon, Benjamin Grandon, Christine Wintz, Yohan Demay, Jean-Marc Corsi, Bernard Mignotte, Sébastien Szuplewski *, Sébastien Gaumer *

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Paris-Saclay

*Corresponding authors. Address: Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Paris-Saclay, 2 rue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bx, France.
Phone: +33 1 70 42 94 55
Fax: +33 1 70 42 94 15
E-mail address: sebastien.szuplewski@uvsq.fr (S. Szuplewski) or sebastien.gaumer@uvsq.fr (S. Gaumer)

Author contribution

SS, JP, YD and SG conceived and supervised the study
JP, BG, SS and CW performed experiments
JP, BG, SS and SG analyzed data
JP, BG, JMC, SS, BM and SG wrote the manuscript

Abstract

Accumulation of unfolded proteins and calcium dyshomeostasis induce endoplasmic reticulum stress, which can be resolved by the Unfolded Protein Response. We have previously reported that *Presenilin* overexpression in *Drosophila* wing imaginal discs activates the PERK/ATF4 branch of the UPR that in turn induces both caspase-dependent apoptosis and a Slpr/JNK/Dilp8-dependent developmental delay. Here, we generalize this observation to both a calcium dyshomeostasis induced by SERCA depletion and overexpression of a Rhodopsin-1 mutant prone to aggregate, showing the prevalence of the PERK/ATF4 pathway in wing discs and suggesting that ER stress-induced apoptosis signaling is cell type specific.

Keywords

UPR, PERK, apoptosis, homeostasis, Drosophila, wing imaginal disc

Abbreviations

Unfolded Protein Response (UPR).

Endoplasmic reticulum (ER)

Rhodopsin-1 (Rh-1)

Ryanodine receptor (RyR)

1. Introduction

In eukaryotic cells, the endoplasmic reticulum (ER) is the first compartment of the secretory pathway. After or during their synthesis on this organelle, membrane and secretory proteins are translocated into the ER where they are folded and glycosylated. Failure in these processes results in the accumulation of misfolded and aggregating proteins that tend to become toxic to the cell, leading to devastating pathologies including diabetes, atherosclerosis, neurodegenerative and renal diseases. This accumulation is normally prevented thanks to an adaptive response known as the Unfolded Protein Response (UPR) which resolves the stress or eliminates the cell [1]. In mammals, three major signaling pathways, referred as arms of the UPR, have been described to activate the transcription of genes involved in the ER stress response. They are named according to their upstream ER transmembrane sensor *i.e.* IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1), PERK (double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR)–like ER Kinase) or ATF6 (Activating Transcription Factor 6). This last branch is the only one that has not yet been linked to the UPR in *Drosophila* [2].

An ER stress inducer classically used in studies on mammalian cultured cells is the thapsigargin drug, which inhibits the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum-type Calcium-ATPases (SERCA) [3]. This pump allows the storage of Ca^{2+} in the ER lumen, where it proves essential for protein folding and maturation. Indeed, some ER enzymes such as protein disulfide isomerases and chaperones (*e.g.* Binding immunoglobulin Protein, calnexin, calreticulin) are Ca^{2+}-dependent and buffer this cation. Storage of Ca^{2+} in the ER is tightly regulated and its release can be triggered upon signaling through the ER channels Ryanodine Receptor (RyR) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) [4]. Upon thapsigargin treatment, the cytosolic calcium concentration increases, leading to some defects in protein folding and maturation and thus to UPR induction.

Presenilins are eight to nine-pass transmembrane proteins described to function as the catalytic subunit of the γ-secretase complex. They are also known for their role in Ca^{2+} homeostasis [5][6][7][8]. We have recently reported that overexpression of *Presenilin* (*Psn*), the gene encoding the *Drosophila* Presenilin, provoked a chronic ER stress, which could be due to an unbalanced calcium homeostasis or to Presenilin aggregation [9]. We had chosen to overexpress *Psn* in part of a developing tissue, *i.e.* the larval primordia of the wing that is named wing imaginal disc. This tissue is composed of an undifferentiated cell population, which proliferates until the end of larval stages. *Psn* overexpression activated the PERK/ATF4 pathway, resulting in the transcriptional repression of *diap1 (Drosophila inhibitor of apoptosis 1),* and thus in a caspase-dependent apoptosis. PERK/ATF4 also induced a Slpr/JNK/Dilp8 pathway in the dying cells independently from cell death [9]. The insulin-like

hormone Dilp8 delayed the general development, thus increasing the period of cell proliferation in the wing disc, thereby favoring tissue homeostasis [10] [11].

On the opposite of our ER stress model, expression of the aggregation prone *Rhodospin-1*^{G69D} (*Rh-1*^{G69D}) mutant induces a PERK/ATF4-independent and JNK-dependent cell death [12]. Expression of this allele in the *Drosophila* eye imaginal discs mimics Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (ADRP), displaying a strong chronic ER stress due to the accumulation of misfolded Rh-1. This stress triggers apoptosis thanks to a Cdk5/MEKK1/JNK signaling pathway. Therefore, these two models of chronic ER stress differ by the signal that provokes apoptosis. One may wonder whether this discrepancy relies on the source of stress or is specific of the cell type.

In this study, we validate that the ER chronic stress induced by *Psn* overexpression in wing imaginal discs is at least in part due to an unbalanced Ca^{2+} homeostasis. Indeed, RyR depletion prevents ER stress induced by *Psn* overexpression. Moreover, depletion of *Drosophila* SERCA phenocopies *Psn* overexpression. On the opposite, *Rh-1*^{G69D} expression in the wing disc led to a chronic ER stress, which reveals insensitive to RyR dosage, suggesting that the ER stress is most likely induced by the accumulation of an unfolded Rh-1 independently from a calcic stress in this model. Similarly to unbalanced Ca^{2+} homeostasis, *Rh-1*^{G69D} overexpression triggered both PERK/ATF4-dependent pathways, *i.e.* the Slpr/JNK/Dilp8 pathway and a JNK-independent cell death. Therefore, at least two independent sources of ER stress behave alike in wing discs, strongly suggesting that the ER stress response is cell type specific.

2. **Materials and Methods**

2.1. Drosophila *crosses and strains*

Flies were raised on standard corn-agar medium at 25°C. Transgene overexpression was performed thanks to the UAS-GAL-4 system using the *vg-Gal4* and *GMR-Gal4* drivers, which are respectively specific to wing and eye imaginal discs. The Drosophila strains could carry the *UAS-Psn* transgene *(Psn+14)* [13], the $dilp8^{MI00727}$ mutation (Bl#33079), or the *UAS-xbp1::EGFP* [14] or *TRE-red-2L* [15] reporter genes. The $UAS\text{-}ninaE^{G69D}$ insertion has been generated by a classical remobilization on the third chromosome of the original *P* element insertion described in [16] and selected for its ability to provoke wing notches when driven by *vg-GAL4*. The *UAS-atf4-RNAi* (Bl#25985), *UAS-Ire1-RNAi* (Bl#36743), *UAS-CaP60A-RNAi* (Bl#44581), *UAS-dRyR-RNAi* (Bl#31540, used for Fig. 2) and *UAS-dRyR-RNAi* (Bl#31695) strains from the Transgenic RNAi Project (TRIP) were provided by the Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, Bloomington, IN, USA). The *UAS-slpr-RNAi* (ID 106449), *UAS-Cdk5-RNAi* (ID 104491), *UAS-Mekk1-RNAi* (ID 110339), *UAS-hep-RNAi* (ID 109277), *UAS-bsk-RNAi* (ID 104569) strains were obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). The efficiency of RNAi transgenes targeting *atf4*, *Ire1*, *slpr*, *hep* and *bsk* mRNAs was previously verified [9]. Genetic background control strains were adapted to the different transgenic lines we used. The *y,w[1118];P{attP,y[+], w[3]}* (ID 60100) line was used as the control for the KK library hosted by the VDRC, and *P{CaryP}attP2* (Bl#25710) for the TRIP V20 library. Canton S flies were used as reference for all the other strains.

2.2. Immunostaining, TUNEL assay and microscopy.

Immunostaining, TUNEL assay, microscopy and image processing were realized as described in [9]. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Dcp-1 (Asp216, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:50), rabbit anti-Phospho-eIf2-alpha (Ser51, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:25) and mouse anti-MMP1 (1:1:1: mix of 5H7B11, 3A6B4 and 3B8D12 clones, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1:25). Transverse sections were computationally generated after reslicing confocal stacks using ImageJ.

2.3. Developmental timing

Fifteen females were crossed to nine males and transferred to fresh food after 1 day for 24 h to deposit eggs on culture medium. Flies reaching adulthood were then counted every 3 h. Each experiment was realized at least thrice independently and data were statistically analyzed by ANOVA.

3. Results

3.1. Different ER stress inducers lead to JNK pathway activation, dilp8 expression, developmental delay and cell death in wing imaginal discs

To characterize ER-stress responses in wing imaginal discs, we compared the effects of three stress inducers, *i.e. Psn* overexpression or *Rh-1^{G69D}* ectopic expression or SERCA depletion, in part of the *vestigial* (*vg*)-expression domain thanks to the UAS-GAL4 system [17]. All three conditions triggered and activated IRE1, as reported by the *xbp1::EGFP* (enhanced green fluorescent protein) reporter [14] (Fig. 1A) and the PERK/ATF4 branch of the UPR, as reported by immunohistochemistry with an antibody directed against the phosphorylated form of eIF2α [18] (Fig. 1B). To note, the phenotypes described are fully penetrant and those caused by *Rh-1^{G69D}* expression are stronger than the phenotypes due to *Psn* overexpression. Depletion of SERCA induced the strongest phenotypes. A second RNAi specific to *Ca-P60* -that encodes SERCA- (Bl#25928) was tested and similar but weaker phenotypes were only observed at 29°C (data not shown). We have recently reported the activation of the JNK pathway in response to ER stress induced by *Psn* overexpression [9] (Fig. 1B). Thanks to a *TRE::RFP* transgene [15], we also observed the activity of AP1 -the downstream transcription factor of the JNK pathway- in cells expressing *Rh-1^{G69D}* (Fig. 1B) or depleted of SERCA (Fig. 1B).

The JNK pathway has been identified as mediating developmental delay, and thus promoting tissue homeostasis, by controlling *dilp8* expression [10][9]. As previously shown, *Psn* overexpression induces a JNK-dependent *dilp8* expression [9] (Fig. 1B). We tested if *Rh-1^{G69D}* expression or SERCA depletion could also induce *dilp8* expression by monitoring the expression of a *dilp8::EGFP* reporter [10]. Both led to EGFP accumulation (Fig. 1B) and to a developmental delay (Fig. 1D).

ER stress due to *Psn* overexpression, induced cell death in wing imaginal disc [9] (Fig. 1C). As assayed by TUNEL and by immunostaining with an antibody raised against the cleaved Dcp-1 caspase, we also observed that both *Rh-1^{G69D}* expression and SERCA depletion induced apoptosis (Fig. 1C). Altogether, these results show that the response to various ER stresses is similar in wing imaginal discs.

3.2. Psn overexpression-induced ER stress is Ca^{2+}-dependent

Calcium dyshomeostasis [1] and the accumulation of the mutant Rh-1^{G69D} misfolded protein [19] are known to induce ER stress. *Psn* overexpression also leads to ER stress but the mechanisms that are involved remain unclear. Psn has been reported to play a role in regulating intracellular Ca^{2+} stores [20]. Moreover, a notched wing phenotype induced by *Psn* overexpression was suppressed by *RyR* dosage reduction [21]. We thus tested the implication of Ca^{2+} in Psn-induced ER stress through RNAi-mediated depletion of RyR.

In the absence of ER stress, RyR depletion did not induce cell death, as reported by anti-cleaved Dcp-1 immunodetection (Fig. 2). Similarly, we did not detect any JNK activation with the *TRE*::RFP reporter or with a immunostaining of the product of the *matrix metalloproteinase 1* (*mmp1*) gene that is a known target of the JNK pathway (Fig. 2 and data not shown). As expected, reductions of *RyR* transcript levels decreased cell death induced by SERCA depletion*,* validating the efficiency of the two *RyR-RNAi* we used. On the contrary, these two *RyR-RNAi* had no effect on *Rh-1^{G69D}*-induced cell death and JNK activation, supporting that *Rh-1^{G69D}*-induced ER stress is due to an accumulation of misfolded proteins.

Interestingly, when *RyR RNAi* transgenes were coexpressed with *Psn,* the levels of cell death and JNK activation decreased, suggesting that *Psn* overexpression induces ER stress at least partly by promoting a cytosolic release of Ca^{2+}. Altogether, these data indicate that unlike *Rh-1^{G69D}* overexpression, both *Psn* overexpression and SERCA depletion induce a calcium dyshomeostasis-dependent ER stress. Thus the three stress inducers used in this study act through at least two distinct mechanisms.

3.3. The ER stress-activated JNK pathway does not induce cell death but up-regulates dilp8 expression

ER stress-induced apoptosis due to *Rh-1^{G69D}* expression has been reported to be mediated by a Cdk5/Mekk1/JNK pathway in eye imaginal discs [12]. In the wing imaginal disc *Rh-1^{G69D}* expression also induces apoptosis (Fig. 1C).By contrast, we have previously shown that ER stress-induced cell death is JNK-independent in the wing imaginal disc in response to *Psn* overexpression [9]. Therefore, we tested whether *Rh-1^{G69D}* expression- and SERCA depletion-induced apoptosis depended on the Cdk5/Mekk1/JNK pathway in wing imaginal discs. The JNK Bsk, JNKKs Hep and Mekk1 and Cdk5 were depleted by using specific *RNAi*-producing transgenes in the presence of the stress inducers (Fig. 3). Efficiency of *RNAis* directed against *bsk* and *hep mRNAs* was previously validated [9]. Those directed against *Mekk1* and *Cdk5* mRNAs were able to rescue *GMR-GAL4* driven *Rh-1^{G69D}*-induced lethality. Reduction of transcript levels of *bsk*, *hep*, *Mekk1* or *Cdk5* did not modify cleaved Dcp-1 immunodetection, suggesting that the Cdk5/Mekk1/JNK pathway is not involved in cell death induction in the wing imaginal disc with any of these three stress inducers.

We have previously reported that Psn-induced ER stress activates a JNK pathway involving the MAP3K Slpr to up-regulate *dilp8* expression [9] (Fig. 4A-B). We thus wondered whether this JNK pathway plays a similar role in wing imaginal disc cells depleted of SERCA or expressing *Rh-1^{G69D}*. In both conditions, depletion of Bsk or Slpr significantly reduced *dilp8* expression (Fig. 4C-D), whereas Mekk1 depletion had no effect (Fig. 4C-D). These results indicate that the previously described *Psn* overexpression-induced JNK pathway is also

induced by SERCA depletion and *Rh-1*^{G69D} expression. Altogether, these data show that ER stress in the wing imaginal disc triggers a Slpr-dependent JNK pathway, which is not involved in cell death but triggers a developmental delay.

3.4. Responses to ER stress depend on the PERK/ATF4 branch of the UPR in the wing imaginal disc

The Slpr/JNK pathway is activated by the PERK/ATF4 arm of the UPR in the Psn-induced ER stress model [9] (Fig. 5A), and this branch of ER stress response is activated in cells depleted of SERCA or expressing *Rh-1*^{G69D} (Fig. 1B). We thus tested whether the activation of the Slpr/JNK pathway also depends on ATF4 in these cells. *RNAi*-mediated depletion of ATF4 reduced JNK activation as reported by *TRE::RFP* (Fig. 5A) in both models, confirming the uniqueness of the wing cell response to ER stress.

The PERK/ATF4 pathway also induced apoptosis in wing imaginal discs overexpressing *Psn* [9] (Fig. 5A). Again, we observed a similar behavior in SERCA and *Rh-1*^{G69D} models. Indeed, expression of *atf4-RNAi* strongly diminished anti-cleaved Dcp-1 immunostaining in all ER stress models (Fig. 5A), suggesting a prevalent role of ATF4 in the ER stress response in wing imaginal discs.

Accordingly, the IRE1 branch of the UPR is activated in cells depleted of SERCA or expressing *Rh-1*^{G69D} (Fig. 1A) but depletion of IRE1 did not modulate anti-cleaved Dcp-1 or anti-MMP1 immunostaining, when compared to control conditions (Fig. 5B). Altogether these results suggest that the PERK/ATF4 is the main pathway of the UPR involved in these models of chronic ER stress in Drosophila wing imaginal discs.

4. Discussion

In this study, we generalize our previous observations on the responses to chronic ER stress induced by *Psn*-overexpression in the wing imaginal disc (Demay et al, 2014) thanks to two novel chronic ER stress models, *i.e.* ectopic *Rh-1*^{G69D} expression and SERCA depletion. The induction of ER stress by Rh1^{G69D} has been previously observed in the eye tissue where the protein is expected to be [12], while the induction of ER stress by SERCA depletion is consistent with previous observations of a cytoplasmic accumulation of several transmembrane proteins in tissue clones homozygous for *Ca-P60A* mutations [22] and with the effects of its pharmacological inhibition by thapsigargin [23].

Mutation of *RyR* was isolated as a suppressor in a modifier screen of the *cut-GAL4* driven Psn-induced notched wing phenotype [21]. Both *cut-GAL4* and *vg-GAL4* drivers allow transgene expression in the same cells of the future wing margin, *vg-GAL4* having a slightly broader expression domain. Here, we show that *RyR* depletion significantly reduces both cell death and *dilp8* activation in larval wing discs overexpressing *Psn*, explaining the absence of notching in adult wings. We predict that other modifiers of the notched wing phenotype identified by Van de Hoef *et al.* could affect genes whose products act upstream or downstream of the PERK/ATF4 pathway.

The genetic interaction between *Psn* and *RyR* supports that *Psn*-induced ER stress is at least in part due to a Ca^{2+} dyshomeostasis. It is consistent with a report of deficits in intracellular calcium stores caused by *Psn* overexpression in *Drosophila* cholinergic neurons [20]. This genetic interaction between *Psn* and *RyR* could reflect the physical interaction between their products and the positive regulation of RyR activity by Psn ([24] for review). However, we cannot exclude alternative interpretations. Indeed, if an agreement exists on a role of Psn in Ca^{2+} homeostasis, both its mode of action and effect on Ca^{2+} stores remain controversial [25]. Our results could support a role of Psn as an ER Ca^{2+} leakage channel [26][27], a negative regulator of SERCA [28], or a positive regulator of IP3R [28] or Calmodulin [20].

We have previously reported that the notched wing phenotype induced by *vg-GAL4* driven *Psn* overexpression is due to the imbalance between ER stress-induced cell death and a compensatory proliferation allowed by a Dilp8-dependent developmental delay. Both apoptosis and *dilp8* expression are induced by the PERK/ATF4 pathway [9]. Our results point out that the PERK/ATF4 pathway is the prevalent arm of the UPR in Drosophila wing imaginal discs, whether ER stress depends (*Psn* overexpression or SERCA depletion) or not on Ca^{2+} dyshomeostasis (*Rh-1*^{G69D} expression) (Fig. 6).

However, we detected an IRE1 activity in the three chronic ER stress models. Upon these conditions, IRE1 seems to play a minor role in apoptosis induction and/or tissue homeostasis maintenance. Alternatively, it could be involved in a not yet investigated

process or could have transient effects that cannot be visualized in our chronic stress models. Future work should help clarify the role and the importance of the IRE1 arm in the ER stress response in *Drosophila* wing imaginal discs.

Contrarily to what was observed in eye imaginal discs, *Rh-1*^{G69D} expression does not induce a Cdk5/MEKK1/JNK-dependent, PERK-independent apoptosis in our model [12]. Indeed, *Rh-1*^{G69D}-induced cell death is JNK-independent and PERK/ATF4-dependent in wing imaginal disc. Therefore, the same source of ER stress induces different pathways in different tissues, pointing out the tissue–specificity of ER stress responses. This discrepancy could result from a difference in the cell differentiation status. Indeed, wing imaginal disc cells are mainly undifferentiated and proliferative, whereas differentiation is in progress in eye disc cells expressing the *GMR-GAL4* driver. Our study illustrates the importance to be careful when generalizing ER stress responses between cell types. This should be taken into account when targeting the UPR branches for treatment of various dependent ER stress-diseases such as ADRP or Alzheimer diseases.

Acknowledgements

Confocal image acquisition and analysis were performed on CYMAGES imaging facility. We acknowledge D. Bohmann, B. Mollereau, the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria) and Drosophila Bloomington Stock Center (Bloomington, IN, USA) for providing fly stocks and Developmental Studies Hybridoma Bank, (University of Iowa, IA, USA) for providing monoclonal antibodies.

References

1 Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AFG & Lavandero S (2013) Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **301**, 215–290.

2 Ryoo HD (2015) Drosophila as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep.*

3 Lytton J, Westlin M & Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **266**, 17067–17071.

4 Krebs J, Agellon LB & Michalak M (2015) Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 114–121.

5 Cheung K-H, Shineman D, Müller M, Cárdenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM-Y & Foskett JK (2008) Mechanism of Ca2+ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* **58**, 871–883.

6 Hayrapetyan V, Rybalchenko V, Rybalchenko N & Koulen P (2008) The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction. *Cell Calcium* **44**, 507–518.

7 Rybalchenko V, Hwang S-Y, Rybalchenko N & Koulen P (2008) The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 84–97.

8 Stutzmann GE, Smith I, Caccamo A, Oddo S, Parker I & Laferla F (2007) Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1097**, 265–277.
9 Demay Y, Perochon J, Szuplewski S, Mignotte B & Gaumer S (2014) The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress Drosophila model. *Cell Death Dis.* **5**, e1452.
10 Colombani J, Andersen DS & Léopold P (2012) Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. *Science* **336**, 582–585.
11 Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E & Dominguez M (2012) Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* **336**, 579–582.
12 Kang M-J, Chung J & Ryoo HD (2012) CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat. Cell Biol.* **14**, 409–415.
13 Ye Y & Fortini ME (1998) Characterization of Drosophila Presenilin and its colocalization with Notch during development. *Mech. Dev.* **79**, 199–211.
14 Souid S, Lepesant J-A & Yanicostas C (2007) The xbp-1 gene is essential for development in Drosophila. *Dev. Genes Evol.* **217**, 159–167.
15 Chatterjee N & Bohmann D (2012) A versatile ΦC31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in Drosophila and in tissue culture. *PloS One* **7**, e34063.
16 Colley NJ, Cassill JA, Baker EK & Zuker CS (1995) Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3070–3074.
17 Brand AH & Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev. Camb. Engl.* **118**, 401–415.
18 Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H & Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904.
19 Ryoo HD, Domingos PM, Kang M-J & Steller H (2007) Unfolded protein response in a Drosophila model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**, 242–252.
20 Michno K, Knight D, Campusano JM, Campussano JM, van de Hoef D & Boulianne GL (2009) Intracellular calcium deficits in Drosophila cholinergic neurons expressing wild type or FAD-mutant presenilin. *PloS One* **4**, e6904.
21 van de Hoef DL, Hughes J, Livne-Bar I, Garza D, Konsolaki M & Boulianne GL (2009) Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein. *Genes. N. Y. N 2000* **47**, 246–260.
22 Periz G & Fortini ME (1999) Ca(2+)-ATPase function is required for intracellular trafficking of the Notch receptor in Drosophila. *EMBO J.* **18**, 5983–5993.
23 Price BD, Mannheim-Rodman LA & Calderwood SK (1992) Brefeldin A, thapsigargin, and AlF4- stimulate the accumulation of GRP78 mRNA in a cycloheximide dependent manner, whilst induction by hypoxia is independent of protein synthesis. *J. Cell. Physiol.* **152**, 545–552.
24 Payne AJ, Kaja S & Koulen P (2015) Regulation of ryanodine receptor-mediated calcium signaling by presenilins. *Recept. Clin. Investig.* **2**, e449.
25 Stiller I, Lizák B & Bánhegyi G (2014) Physiological functions of presenilins; beyond γ-secretase. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **15**, 1019–1025.
26 Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee S-F, Hao Y-H, Serneels L, De Strooper B, Yu G & Bezprozvanny I (2006) Presenilins form ER Ca2+ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* **126**, 981–993.
27 Nelson O, Supnet C, Tolia A, Horré K, De Strooper B & Bezprozvanny I (2011) Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore. *J. Biol. Chem.* **286**, 22339–22347.
28 Brunello L, Zampese E, Florean C, Pozzan T, Pizzo P & Fasolato C (2009) Presenilin-2 dampens intracellular Ca2+ stores by increasing Ca2+ leakage and reducing Ca2+ uptake. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3358–3369.

Figure legends

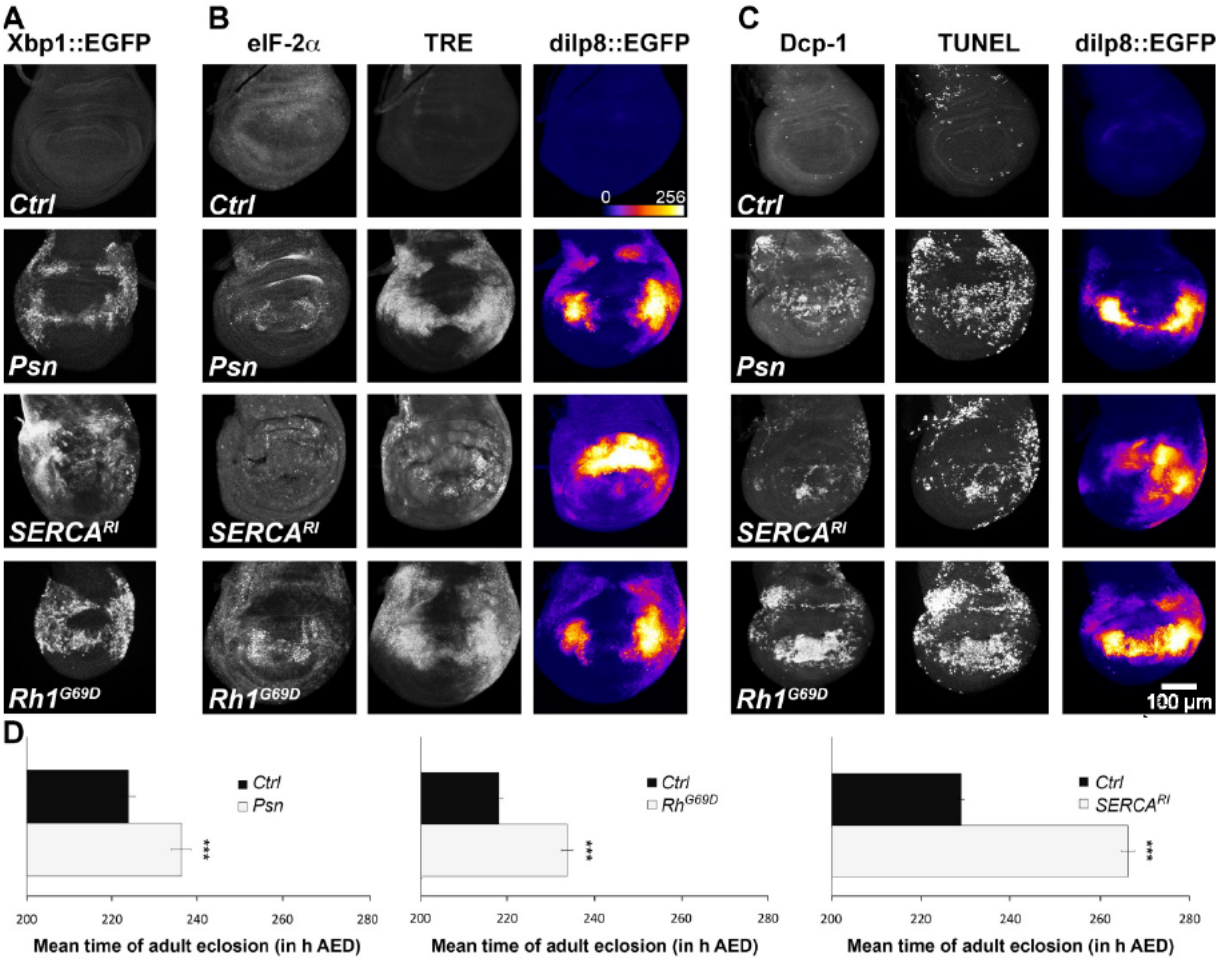


Fig. 1. Characterization of three models of ER stress. (A-C) Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs. (A) Discs expressing an Xbp1::EGFP reporter, detected by anti-GFP immunostaining of the following genotypes (top to bottom) : *vg-Gal4/+*; *Xbp1::GFP/+* (*Ctrl*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/+*; *Xbp1::GFP/+* (*Psn*), *vg-GAL4/+*; *UAS-SERCA-RNAi/Xbp1::GFP* (*SERCA^{RI}*), *vg-GAL4/+*; *UAS-Rh1^{G69D}/Xbp1::GFP* (*Rh1^{G69D}*). (B) Discs immunostained with anti-phosphorylated eIF-2α antibodies (right) and expressing a TRE (middle) and a *dilp8* (left) reporter of the following genotypes (top to bottom): *vg-Gal4/TRE-red-2L*; *dilp8^{MI00727}/+* (*Ctrl*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/TRE-red-2L*; *dilp8^{MI00727}/+* (*Psn*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *dilp8^{MI00727}/UAS-SERCA-RNAi* (*SERCA^{RI}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *dilp8^{MI00727}/UAS-Rh1^{G69D}* (*Rh1^{G69D}*). (C) Discs immunostained with anti-activated Dcp-1 (left), labelled by TUNEL (middle) and expressing a *dilp8* reporter (right) of the following genotypes (top to bottom) : *vg-Gal4/+* ; *dilp8^{MI00727}/+* (*Ctrl*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/+* ; *dilp8^{MI00727}/+* (*Psn*), *vg-GAL4/+* ; *dilp8^{MI00727}/UAS-SERCA-RNAi* (*SERCA^{RI}*), *vg-GAL4/+* ; *dilp8^{MI00727}/UAS-Rh1^{G69D}* (*Rh1^{G69D}*). (D) Effects of *Psn* overexpression (left), *Rh1^{G69D}* expression (center) and SERCA depletion (right) on adult eclosion timing in hours after egg laying (AED). Control genotypes are *vg-GAL4/+* (black bars) and ER stressed flies (open bars) genotypes are (from left to right): *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/+*, *vg-GAL4/+,UAS-Rh^{G69D}/+* and *vg-GAL4/+,UAS-SERCA-RNAi/+*. Error bars represent the S.E.M. and asterisks indicate a significant difference with the control ($p<0.001$).

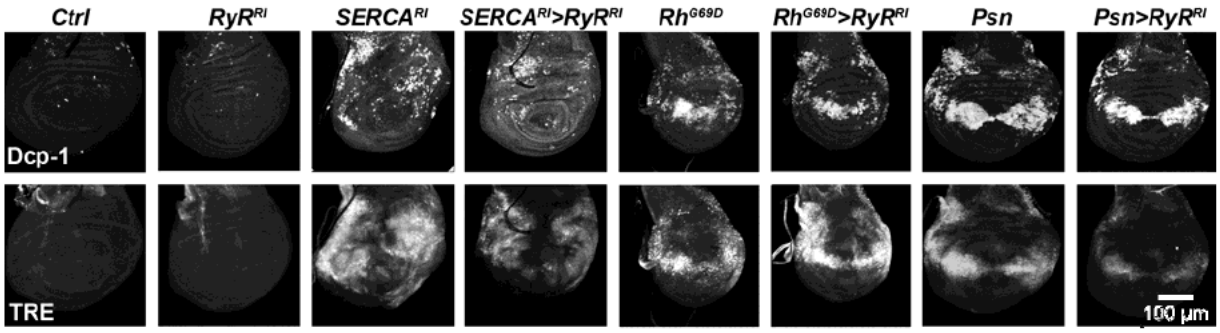


Fig. 2. ER stress in both Presenilin and SERCA models depends on calcium homeostasis. Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs showing activated Dcp-1 immunodetection to reveal apoptosis (top), and the TRE to detect JNK signaling reporter (bottom). Genotypes are (from left to right) *vg-GAL4*/+ (1st column), *vg-GAL4*/+; *UAS-RyR-RNAi*/+ (2nd column), *vg-GAL4*/+; *UAS-SERCA-RNAi*/+ (3rd column), *vg-GAL4*/+; *UAS-SERCA-RNAi/UAS-RyR-RNAi* (4th column), *vg-GAL4*/+,*UAS-Rh^{G69D}*/+ (5th column), *vg-GAL4*/+,*UAS-Rh^{G69D}/UAS-RyR-RNAi* (6th column), *vg-GAL4,UAS-Psn*,*UAS-Psn*/+ (7th column), and *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/+; *UAS-RyR-RNAi*/+ (8th column).

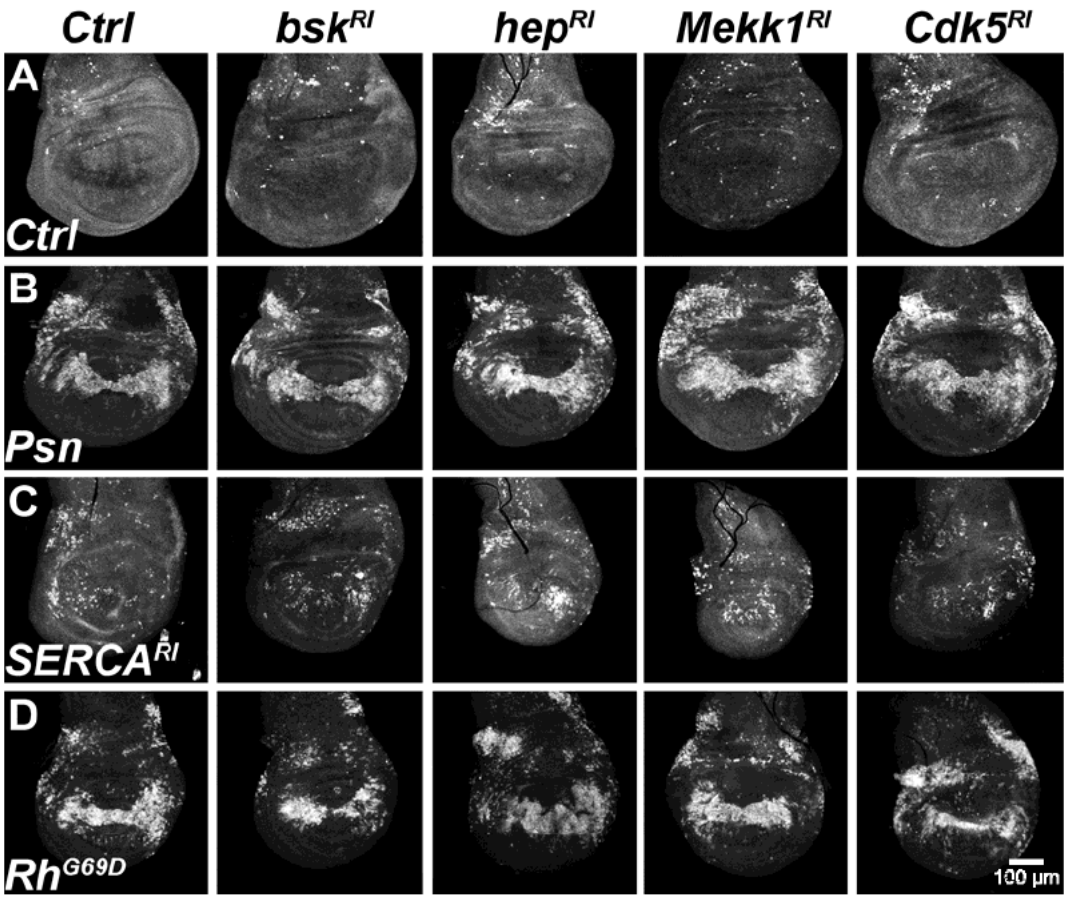


Fig. 3. ER stress-induced apoptosis is independent of the Cdk5/Mekk1/JNK pathway in all three models. Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs stained with an anti-activated Dcp-1 antibody. Control discs (A) genotypes are *vg-GAL4*/+ (1st column), *vg-GAL4*/*UAS-bsk-RNAi* (2nd column), *vg-GAL4*/*UAS-hep-RNAi* (3rd column), *vg-GAL4*/*UAS-Mekk1-RNAi* (4th column), *vg-GAL4*/*UAS-Cdk5-RNAi* (5th column). Psn overexpression (B) is induced in flies of the following genotypes: *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/+ (1st column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/*UAS-bsk-RNAi* (2nd column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/*UAS-hep-RNAi* (3rd column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/*UAS-Mekk1-RNAi* (4th column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn*/*UAS-Cdk5-RNAi* (5th column). The effect of SERCA depletion (C) was observed in flies with the following genotypes: *vg-GAL4*/+; *UAS-SERCA-RNAi*/+ (1st column), *vg-GAL4*/*UAS-bsk-RNAi*; *UAS-SERCA-RNAi*/+ (2nd column), *vg-GAL4*/*UAS-hep-RNAi*; *UAS-SERCA-RNAi*/+ (3rd column), *vg-GAL4*/*UAS-Mekk1-RNAi*; *UAS-SERCA-RNAi*/+ (4th column), *vg-GAL4*/*UAS-Cdk5-RNAi; UAS-SERCA-RNAi*/+ (5th column). Flies expressing ectopically Rh-1^{G69D} (D) display the following genotypes: *vg-GAL4*/+; *UAS-Rh*^{G69D}/+ (1st column), *vg-GAL4*/*UAS-bsk-RNAi*; *UAS-Rh*^{G69D}/+ (2nd column), *vg-GAL4*/*UAS-hep-RNAi*; *UAS-Rh*^{G69D}/+ (3rd column), *vg-GAL4*/*UAS-Mekk1-RNAi*; *UAS-Rh*^{G69D}/+ (4th column), *vg-GAL4*/*UAS-Cdk5-RNAi*; *UAS-Rh*^{G69D}/+ (5th column).

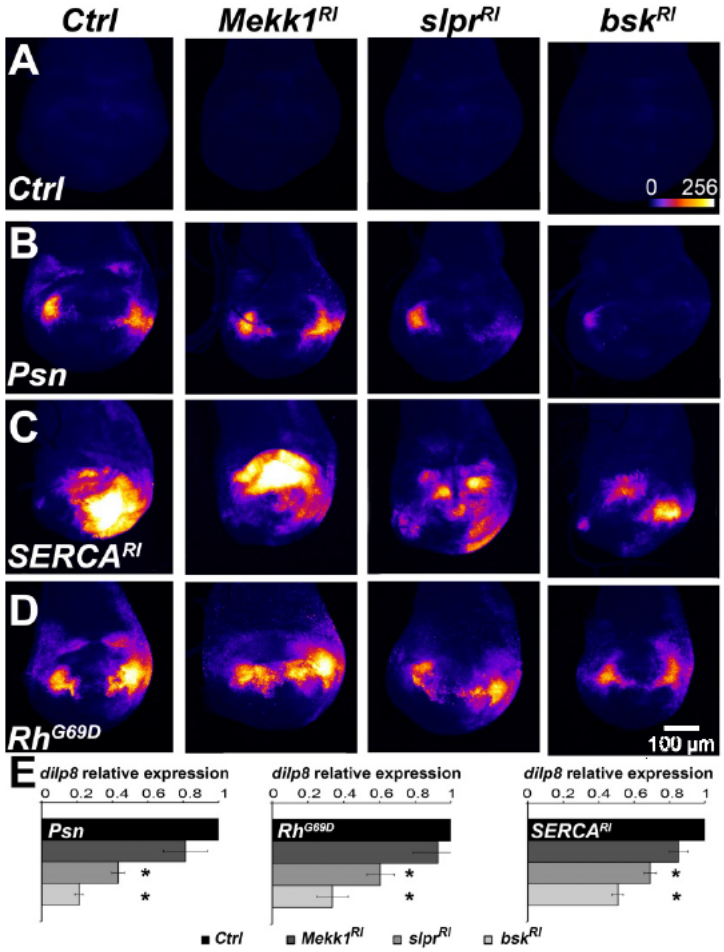


Fig. 4. *Dilp8* expression depends on a Slpr/JNK pathway in all three models of ER stress. (A) Fluorescence intensity of GFP reflecting the expression of a *dilp8::EGFP* reporter transgene in projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs of control genotypes (A): *vg-GAL4/+*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (1st column), *vg-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (2nd column), *vg-GAL4/UAS-slpr-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (3rd column), *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (4th column), *Psn* overexpression genotypes (B): *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/+*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (1st column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/UAS-Mekk1-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (2nd column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/UAS-slpr-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (3rd column), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/UAS-bsk-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/+* (4th column), SERCA depletion genotypes (C): *vg-GAL4/+*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-SERCA-RNAi* (1st column), *vg-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-SERCA-RNAi* (2nd column), *vg-GAL4/UAS-slpr-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-SERCA-RNAi* (3rd column), *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-SERCA-RNAi* (4th column) and *Rh-1*^{G69D} ectopically expression (D) genotypes: *vg-GAL4/+*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-Rh1*^{G69D} (1st column), *vg-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-Rh1*^{G69D} (2nd column), *vg-GAL4/UAS-slpr-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-Rh1*^{G69D} (3rd column), *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi*; *dilp8*^{MI00727}*/UAS-Rh1*^{G69D} (4th column). (E) Quantification of relative *dilp8* expression are performed for the previously described phenotypes which are organized according to the different stress models, *i.e. Psn* overexpression (left), *Rh-1*^{G69D} ectopic expression (center) and SERCA depletion (right), and compared to control discs. Error bars represent the S.E.M of at least 3 independent experiments. The asterisks indicate significant differences between the indicated genotype and its control ($P<0.0001$; ANOVA).

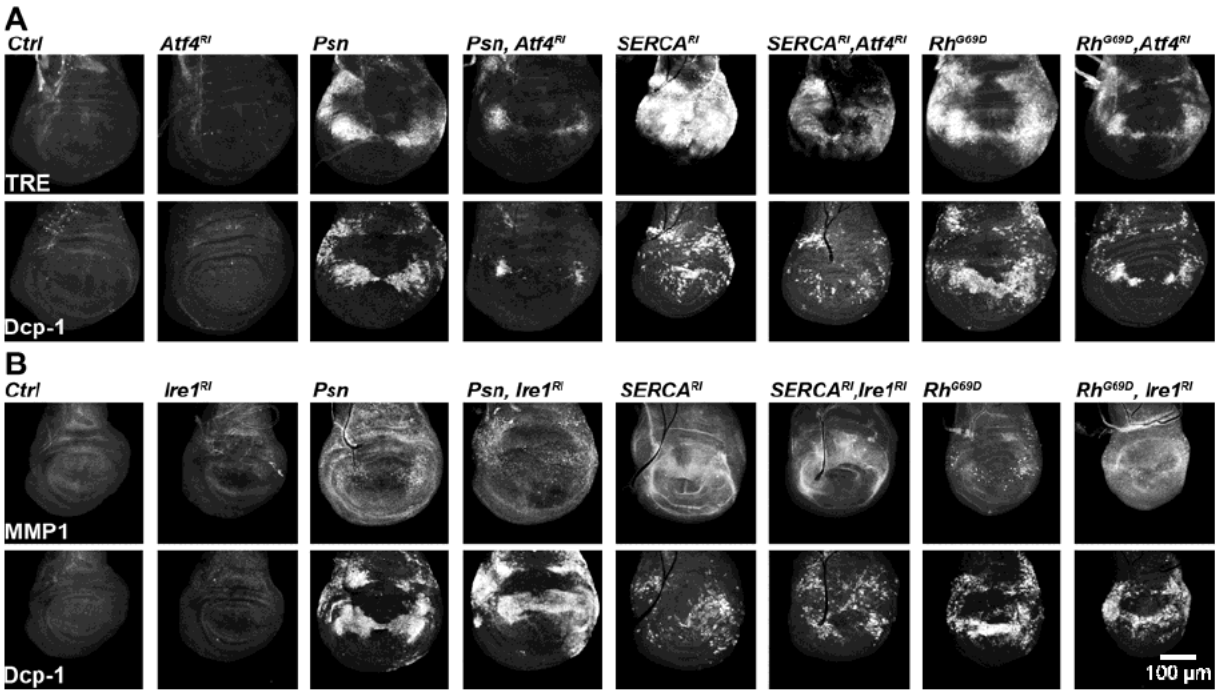


Fig. 5. UPR activation is ATF4-dependent but IRE1-independent in all three models of ER stress. Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs. (A) Discs expressing the *TRE-red-2L* reporter (1st row) and immunostained with an antibody anti-activated Dcp-1 (2nd row) of following genotypes: *vg-Gal4/TRE-red-2L* (*Ctrl*), *vg-Gal4/TRE-red-2L*; *UAS-Atf4-RNAi/+* (*ATF4^{RI}*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/TRE-red-2L* (*Psn*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/TRE-red-2L*; *UAS-Atf4-RNAi/+* (*Psn, Atf4^{RI}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *UAS-SERCA-RNAi/+* (*SERCA^{RI}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *UAS-SERCA-RNAi/UAS-Atf4-RNAi* (*SERCA^{RI}, Atf4^{RI}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *UAS-Rh1^{G69D}/+* (*Rh1^{G69D}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L*; *UAS-Rh1^{G69D}/UAS-Atf4-RNAi* (*Rh1^{G69D}, Atf4^{RI}*). (B) Immunodetection of MMP1 (1st row) and activated Dcp-1 (2nd row) on discs of the following genotypes: *vg-Gal4/+* (*Ctrl*), *vg-Gal4/UAS-Ire1-RNAi* (*Ire1^{RI}*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/+* (*Psn*), *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/UAS-Ire1-RNAi* (*Psn, Ire1^{RI}*), *vg-GAL4/+*; *UAS-SERCA-RNAi/+* (*SERCA^{RI}*), *vg-GAL4/UAS-Ire1-RNAi*; *UAS-SERCA-RNAi/+* (*SERCA^{RI}, Ire1^{RI}*), *vg-GAL4/+*; *UAS-Rh1^{G69D}/+* (*Rh1^{G69D}*), *vg-GAL4/UAS-Ire1-RNAi*; *UAS-Rh1^{G69D}/+* (*Rh1^{G69D}, Ire1^{RI}*).

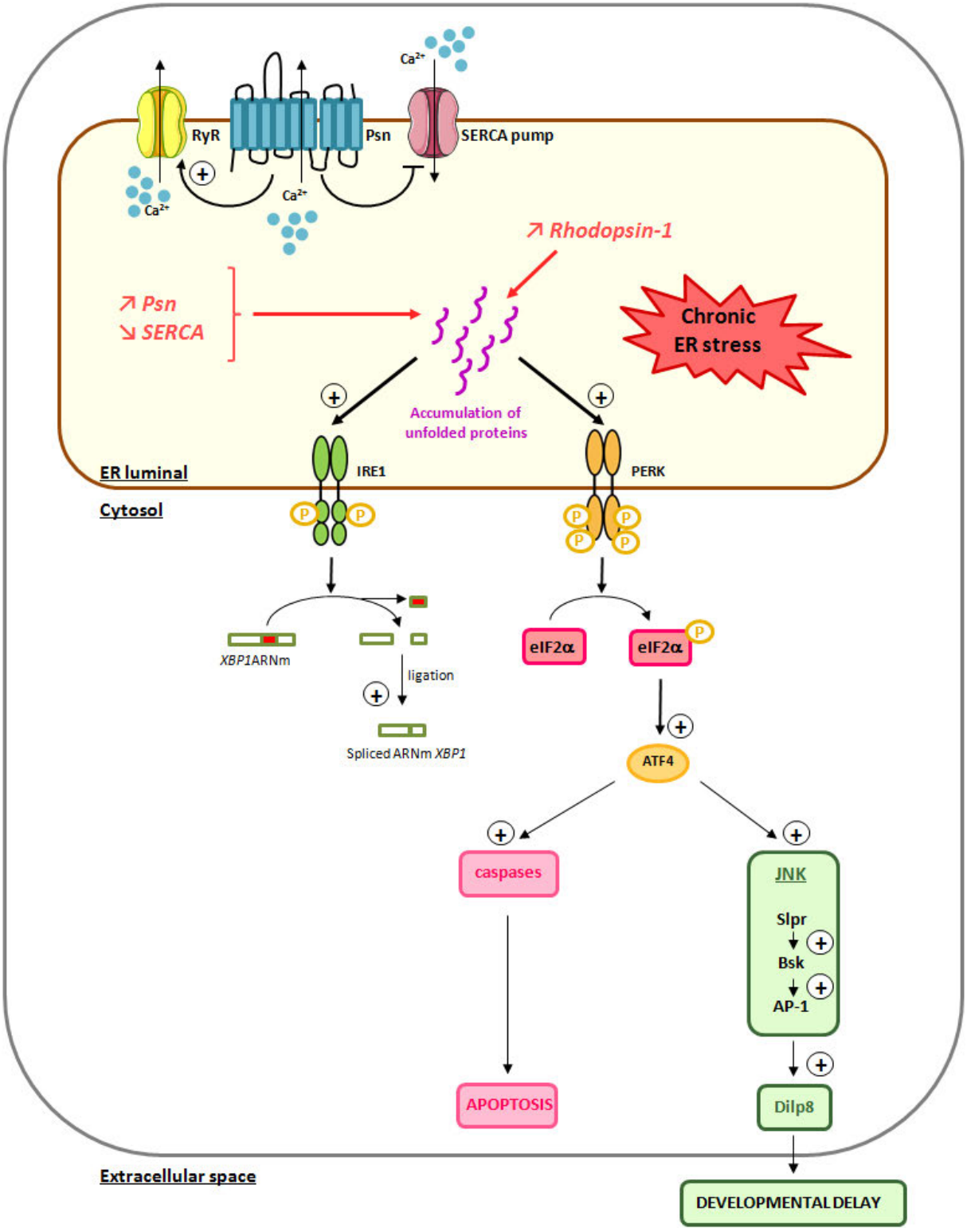


Fig. 6. Model of tissue homeostasis maintenance after a chronic ER stress in *Drosophila* wing imaginal discs. Induction of a chronic ER stress by different stress models resulting in an imbalance of calcium homeostasis, or the accumulation of unfolded proteins. This stress activates the PERK pathway, which results in *atf4* expression. This transcription factor displays two complementary functions: apoptosis induction and favoring tissue homeostasis through a Slpr/Bsk/AP-1-dependent induction of *dilp8* expression.

III. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

A. Caractérisation de la voie de mort et de son impact dans le modèle de surexpression de *Rh-1^{G69D}*

Dans l'article 2, nous montrons que la mort cellulaire induite par les deux nouvelles sources de stress est indépendante de la voie JNK et dépendante d'ATF4. J'ai caractérisé plus en détail la mort due à la surexpression du transgène codant la forme mutante Rh-1^{G69D} dans le domaine *vestigial* (*vg*) (Figure 36), qui couvre notamment la frontière dorso-ventrale située dans la poche du disque imaginal d'aile (Figure 36A, D, G). J'ai mis en évidence qu'il s'agissait d'une mort cellulaire induite selon le même mécanisme que pour le modèle Psn. En effet, l'expression d'un transgène codant l'inhibiteur des caspases p35 de bacculovirus, conduit à une absence de marquage TUNEL dans le domaine *vg* (Figure 36E, H). Par ailleurs, elle est associée à une réduction de la quantité de DIAP1 qui est le principal inhibiteur des caspases chez la drosophile (Figure 36C, F). Cette diminution n'est pas due à une perte des cellules par apoptose car elle est toujours observée dans le domaine *vg* en bloquant la mort cellulaire par expression de *p35* (Figure 36I). Finalement, comme pour le modèle Psn, cette diminution des niveaux de DIAP1 est dépendante d'ATF4 (Figure 37). En effet, la déplétion de ce facteur de transcription, par l'expression d'un ARNi spécifique, est suffisante pour supprimer l'apoptose (Figure 37H) et pour rétablir le niveau protéique normal de DIAP1 dans le domaine *vg* (Figure 37I). Ces résultats mettent donc en évidence le contrôle des niveaux de DIAP1 par la branche PERK/ATF4 de l'UPR.

Dans l'article 2, nous montrons également qu'à l'instar du modèle *Psn* le mécanisme compensatoire de la perte des cellules, due à l'expression de *Rh-1^{G69D}*, repose sur l'induction d'un retard de développement, qui permet un allongement de la période de prolifération cellulaire sans en augmenter son taux. J'ai confirmé l'absence de prolifération compensatoire et de prolifération induite par l'apoptose. En effet, je n'ai observé aucune différence du nombre de cellules mitotiques détectées par un immunomarquage anti-Phospho-Histone H3 (PH3) (Figure 38F) en comparaison avec la condition témoin (Figure 38C). L'apoptose induite par le stress du RE ne semble donc pas augmenter le taux de prolifération des cellules voisines. L'ensemble de ces résultats conforte donc notre conclusion que les surexpressions de *Psn* et de *Rh-1^{G69D}* dans le disque imaginal d'aile ont les mêmes effets.

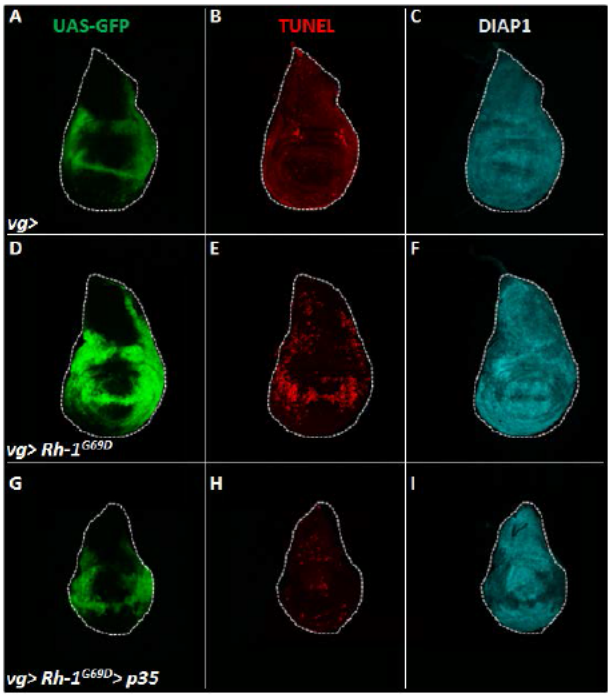


Figure 36 : La mort cellulaire induite par l'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile dépend des caspases et est associée à une diminution de la quantité protéique de DIAP1

(A, D, G) Détection de la GFP qui permet de visualiser le domaine d'expression de *vestigial* (*vg*) dans les disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. (B, E, H) Détection de la mort cellulaire par un marquage TUNEL. (C, F, I) Immunodétection avec un anticorps dirigé contre DIAP1. Génotypes (A, B, C) *vg-GAL4/+ ; UAS-GFP/+*, (D, E, F) *vg-GAL4/+; UAS-Rh-1*^{G69D}*/UAS-GFP*, (G, H, I) *vg-GAL4/UAS-p35; UAS-Rh1*^{G69D}*/UAS-GFP*.

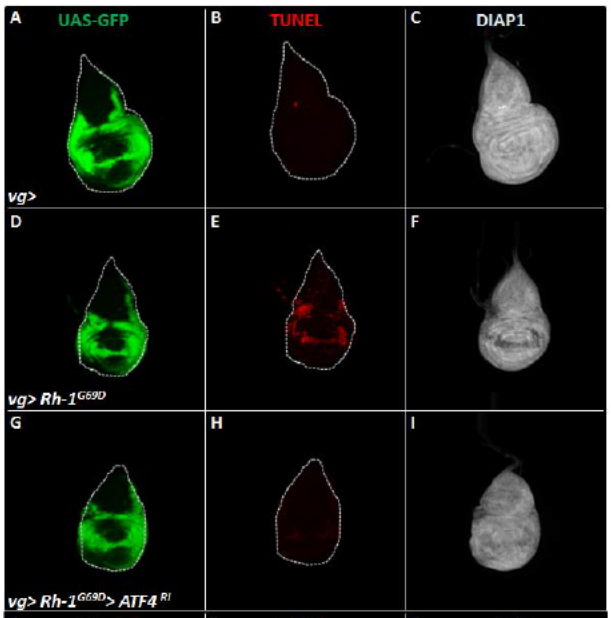


Figure 37 : La diminution de la quantité de DIAP1 est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR en contexte d'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile

(A, D, G) Détection de la GFP qui permet de visualiser le domaine d'expression de *vestigial* (*vg*) dans les disques imaginaux d'ailes de troisième stade larvaire. (B, E, H) Détection de la mort cellulaire par un marquage TUNEL. (C, F, I) Immunodétection avec un anticorps dirigé contre DIAP1. Génotypes (A, B, C) *vg-GAL4/+ ; UAS-GFP/+*, (D, E, F) *vg-GAL4/UAS-GFP; UAS-Rh-1*^{G69D}*/UAS-Témoin*^{RI}, (G, H, I) *vg-GAL4/UAS-GFP; UAS-Rh-1*^{G69D}*/UAS-ATF4*^{RI}.

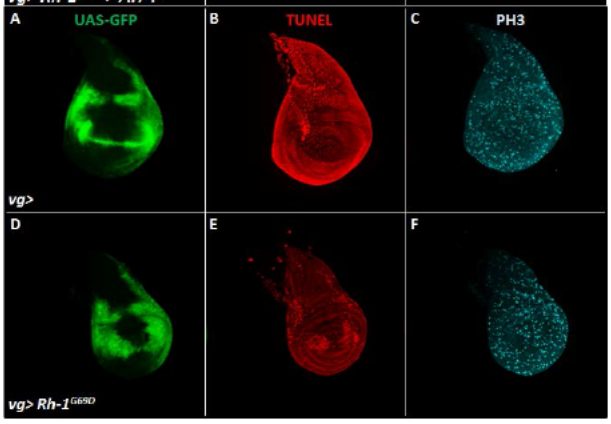


Figure 38 : L'expression de *Rh-1*^{G69D} dans le disque imaginal d'aile n'induit pas une augmentation de la quantité de cellules en mitose

(A, D) Détection de la GFP qui permet de visualiser le domaine d'expression de *vestigial* (*vg*) dans les disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. (B, E) Détection de la mort cellulaire par un marquage TUNEL. (C, F) Immunodétection des cellules en mitose avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H3 (PH3). Génotypes (A, B, C) *vg-GAL4/+ ; UAS-GFP/+*, (D, E, F) *vg-GAL4/+; UAS-Rh-1*^{G69D}*/UAS-GFP*.

B. Implication de l'autophagie dans les modèles Psn et Rh-1^{G69D}

Comme évoqué en introduction, l'autophagie est un programme hautement régulé associé à la survie et au maintien de l'homéostasie cellulaire ainsi qu'à l'adaptation à des conditions environnementales stressantes incluant un stress du RE (Kroemer et al., 2010). Ce processus est notamment essentiel pour le maintien de l'homéostasie protéique en permettant l'élimination des agrégats protéiques polyubiquitinylés (Lamark and Johansen, 2012).

Sachant que la surexpression de *Psn* dans le disque imaginal d'œil conduit à son agrégation (Seeger et al., 1997) et que l'expression d'une forme mal-repliée de *Rh-1^{G69D}* a tendance à s'accumuler dans le RE (Colley et al., 1995) (Kurada and O'Tousa, 1995), je me suis demandée s'il était possible de détecter des agrégats au niveau du disque imaginal d'aile dans ces deux modèles. Pour détecter le produit d'expression de *Psn*, j'ai utilisé une forme de Psn étiquetée avec un épitope Myc (Psn-Myc) (Hu and Fortini, 2003a). Pour visualiser la Rh-1, j'ai utilisé un anticorps anti-Rh-1. Ces immunomarquages ont inclus un anticorps ciblant un marqueur de l'agrégation protéique : Ref(2)P. Cette protéine cargo, orthologue de p62 de mammifères, joue notamment un rôle d'adaptateur dans le processus d'autophagie en orientant les protéines polyubiquitinylées vers les membranes des vésicules autophagiques en formation (Nezis et al., 2008) (Bartlett et al., 2011). J'ai pu constater qu'en absence de stress, un marquage ponctiforme de Ref(2)P n'est pas détecté (Figures 39 1A', 2A'). Par contre, en contexte de stress du RE induit par la surexpression de *Psn* ou l'expression de *Rh-1^{G69D}*, une colocalisation entre les marquages Ref(2)P et Psn-myc est détectée (Figure 39 1B''') ou Ref(2)P et Rh-1 (Figure 39 2B'''). Ces données renforcent l'idée que nos deux modèles de stress du RE sont associés à l'accumulation d'agrégats protéiques.

Je me suis ensuite demandée si la formation de ces agrégats est une cause ou une conséquence de l'activation de l'UPR et donc du stress du RE. Compte tenu du rôle essentiel de la branche PERK/ATF4 dans nos deux systèmes modèles, je me suis appliquée à tester l'effet d'une inhibition de cette voie vis-à-vis de la formation de ces agrégats protéiques. Ainsi, j'ai pu observer que la déplétion d'ATF4 conduit à une diminution drastique de la quantité de marquage de Ref(2)P dans les deux systèmes (Figure 39 1C', 2C') en comparant avec leur condition témoin respective. Par ailleurs, il semble que la quantité d'agrégats détectée dans chacun de ces modèles, soit corrélée à la quantité de cellules en apoptose qui est elle-même dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR (Figure 39 1B-B', 2B-B'). L'ensemble de ces données indique que la formation des agrégats est une conséquence du stress du RE induit et de l'activation de l'UPR.

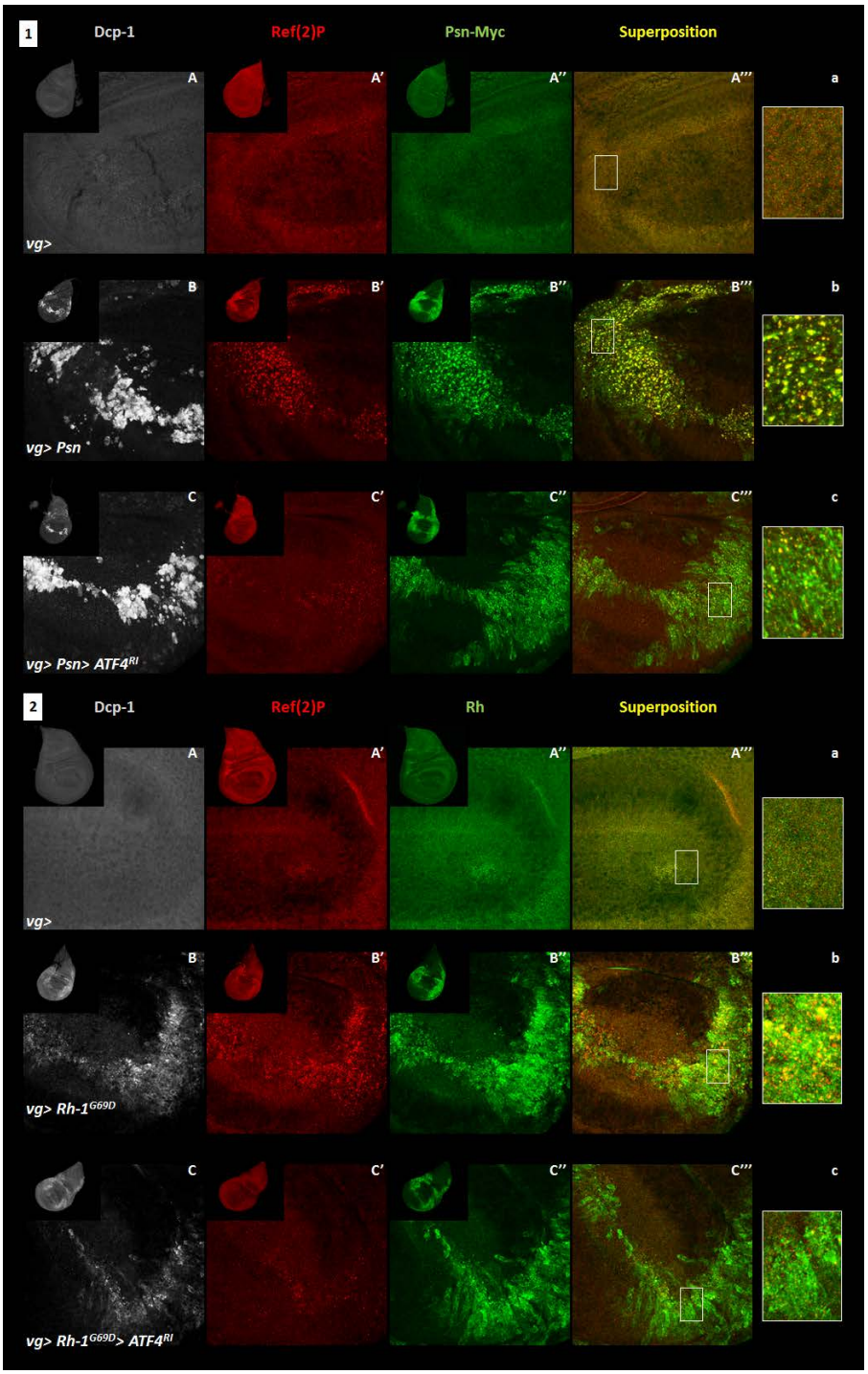


Figure 39 : La formation d'agrégats protéiques en contexte de surexpression de *Psn* et d'expression de *Rh-1^{G69D}* est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR

(A-C) Visualisation de la mort cellulaire avec un immunomarquage dirigé contre la caspase effectrice Dcp-1 clivée (en gris). (A'-C') Identification des agrégats protéiques avec un immunomarquage anti-Ref(2)P (en rouge). (1-A''-C'') Détection de la protéine étiquetée Psn-Myc grâce à un immunomarquage anti-Myc (en vert). (2-A''-C'') Détection de la protéine Rh grâce à un immunomarquage anti-Rh. ((A'''-C''') Superposition des marquages rouge et vert. (a-c) Grossissement de la zone encadrée en blanc en A'''-C'''. Génotypes : (1-A-a) *vg-GAL4/+ ; +/+* (1-B-b) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-Psn-myc/+* (1-C-c) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-Psn-myc/ATF4^{RI}* (2-A-a) *vg-GAL4/+ ; +/+* (2-B-b) *vg-GAL4/+ ; UAS Rh-1^{G69D}/+* (2-C-c) *vg-GAL4/+ ; UAS Rh-1^{G69D}/ATF4^{RI}*.

Il est également important de mentionner que dans ces conditions de déplétions d'ATF4, la réduction de formation des agrégats ne semble pas due à une perte de la quantité de Psn ou Rh-1 puisque ces deux protéines sont toujours détectées (Figure 39 1C'', 2C''). En revanche, la distribution de ces protéines apparait moins ponctiforme et plus diffuse dans les cellules en comparaison avec leur condition témoin respective (en absence de diminution de la quantité d'ATF4). Ceci semble cohérent avec l'absence d'agrégats contenant Ref(2)P.

Dans la mesure où ces agrégats apparaissent dépendants de la branche PERK/ATF4 de l'UPR et que cette branche est notamment responsable de l'induction de la signalisation JNK, j'ai souhaité tester l'implication de la voie JNK dans la formation des agrégats. Je n'ai observé aucune différence de marquage Ref(2)P pour chacun des différents membres de la signalisation JNK déplétés dans ces deux modèles de stress (Figure 40B'-D', B''-D'') en comparant aux conditions contrôle (Figure 40A'-A''). La signalisation JNK ne semble donc pas moduler la formation des agrégats dans nos modèles de stress du RE.

La littérature rapporte que le processus d'autophagie permet l'élimination des agrégats (Nezis, 2012). Je me suis donc demandée si les agrégats que j'observe dans nos modèles représentent des protéines adressées à l'autophagie. En effet, ce mécanisme cytoprotecteur est activé en condition de stress du RE pour soulager le RE en dégradant les protéines mal-repliées qui résident dans la lumière de cet organite (Kroemer et al., 2010). Dès lors, j'ai entrepris plusieurs co-marquages afin de mettre en évidence les étapes précoces de ce mécanisme grâce à l'utilisation d'une forme étiquetée GFP de la protéine Atg8 (Atg8-GFP) qui intervient dans la formation et l'élongation de la membrane des autophagosomes. De plus, j'ai réalisé un marquage fluorescent au Lysotracker qui permet de visualiser spécifiquement les lysosomes. De cette façon, les autolysosomes correspondant à la fusion des autophagosomes avec des lysosomes peuvent être localisés. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence une colocalisation de ces marquages associée à la présence d'agrégats protéiques dans le domaine d'induction du stress du RE par la surexpression de *Psn* (Figure 41B'-B'') et l'expression de *Rh-1*^{G69D} (Figure 41C'-C''). Ces résultats indiquent une augmentation du processus d'autophagie en condition de stress, en comparaison avec la condition normale (Figure 41A'-A'').

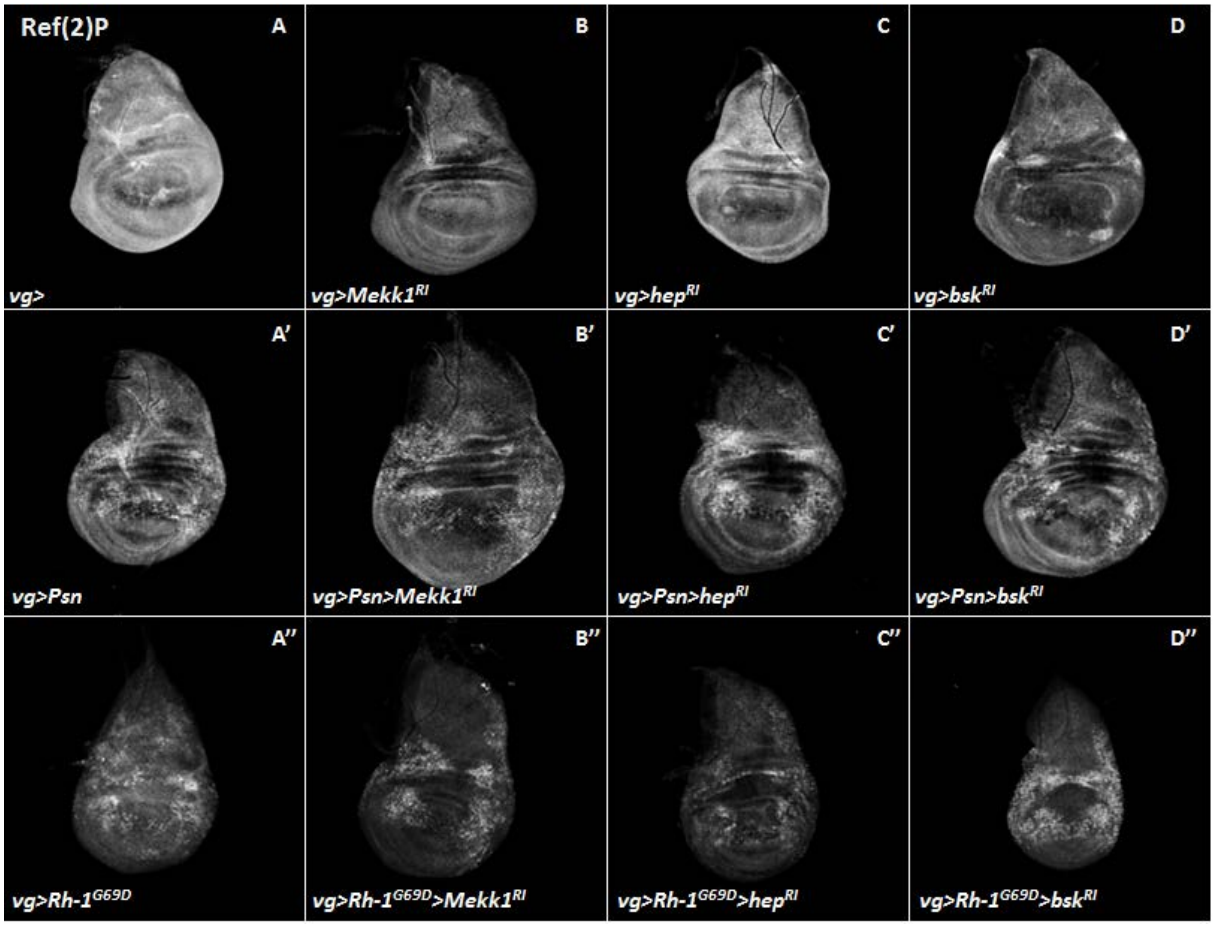


Figure 40 : L'agrégation protéique observée dans nos modèles Psn et Rh-1^{G69D} n'est pas dépendante de la voie JNK

(A-D'') Détection de l'agrégation protéique par immunomarquage avec un anticorps ciblant la protéine Ref(2)P. Génotypes (A) *vg-GAL4 ; + / UAS-Témoin^{RI} ; +* (B) *vg-GAL4 ; +/ UAS-Mekk1^{RI} ; +* (C) *vg-GAL4/UAS-hep^{RI}* (D) *vg-GAL4 ; + / UAS-bsk^{RI} ; +* (A') *vg-GAL4 ; UAS-Psn, UAS-Psn / UAS-Témoin^{RI} ; +* (B') *vg-GAL ;, UAS-Psn, UAS-Psn / UAS-Mekk1^{RI} ; +* (C') *vg-GAL4 ; UAS-Psn, UAS-Psn / UAS-hep^{RI} ; +* (D') *vg-GAL4 ; UAS-Psn, UAS-Psn /UAS-bsk^{RI} ,+* (A'') *vg-GAL4 ; UAS-Rh-1^{G69D} / UAS-Témoin^{RI} ; +* (B'') *vg-GAL4 ; UAS-Rh-1^{G69D} / UAS-Mekk1^{RI} ; +* (C'') *vg-GAL4 ; UAS-Rh-1^{G69D} / UAS-hep^{RI} ; +* (D'') *vg-GAL ; UAS-Rh-1^{G69D} / UAS-bsk^{RI} ; +*

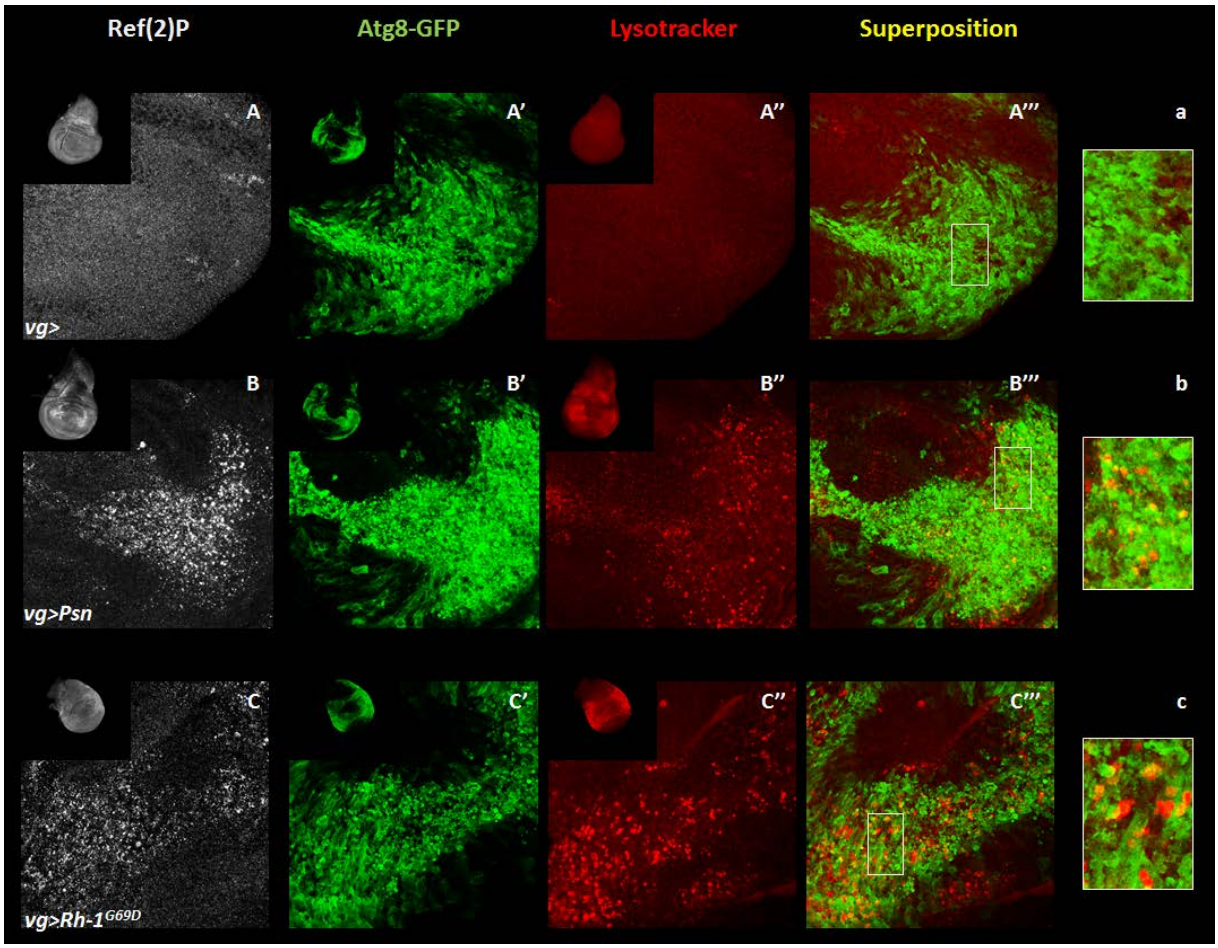


Figure 41 : Les modèles Psn et Rh-1^{G69D} présentent une activation du processus d'autophagie

(A-C) Identification des agrégats protéiques avec un immunomarquage anti-Ref(2)P (en gris). (A'-C') Détection par immunomarquage de la GFP de la protéine Atg8 étiquetée (en vert) qui intervient dans la formation des autophagosomes. (A''-C'') Visualisation des lysosomes grâce à un marquage fluorescent au Lysotracker (en rouge). (A'''-C''') Superposition des marquages rouge et vert ce qui permet de visualiser les autophagolysosomes, étapes terminales du processus d'autophagie. (a-c) Grossissement de la zone encadrée en blanc en A'''-C'''. Génotypes : (A-a) *vg-GAL4/+ ; UAS-Atg8-GFP/+* (B-b) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-Atg8-GFP/+* (C-c) *vg-GAL4/+ ; UAS Rh-1^{G69D}/UAS-Atg8-GFP*.

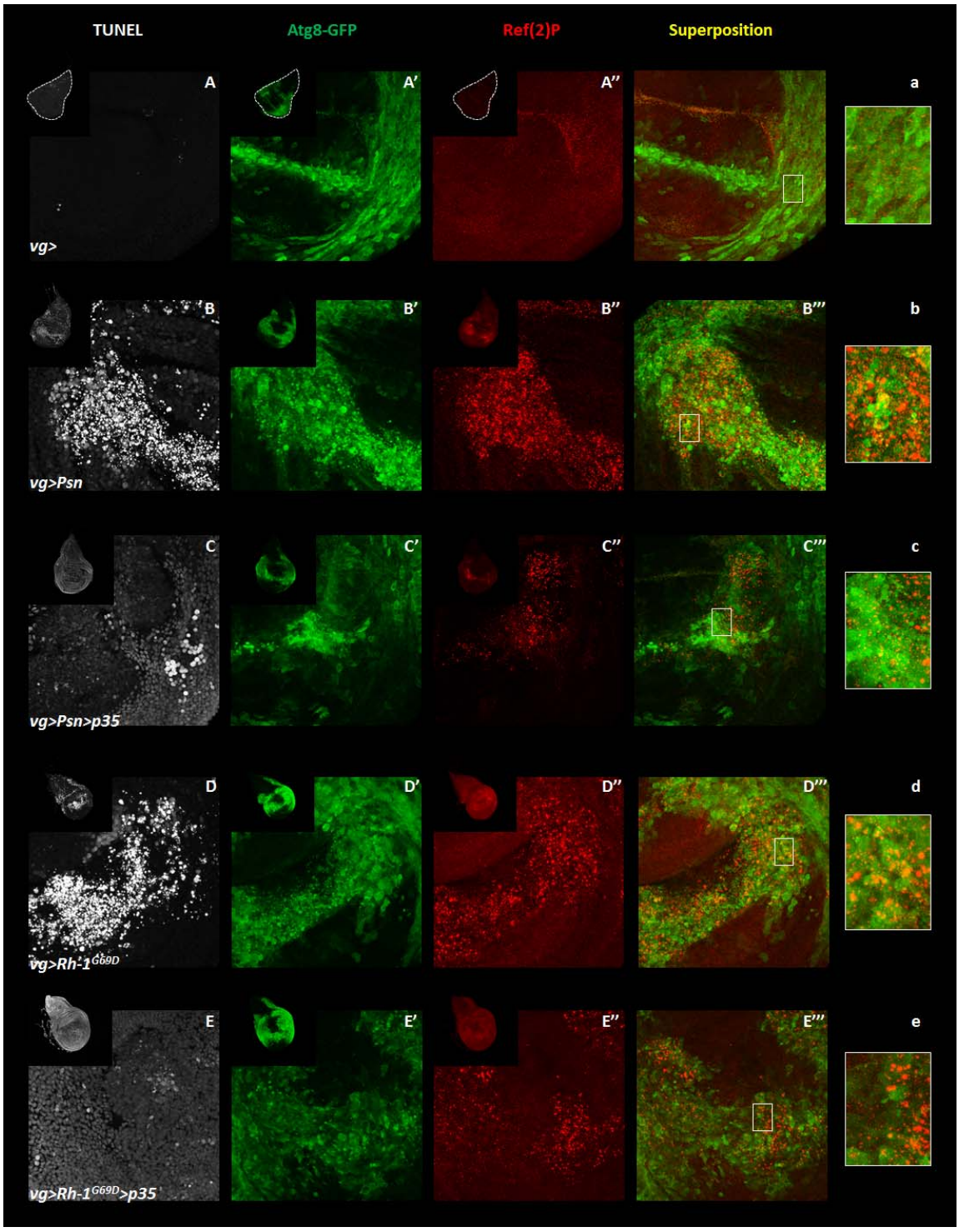


Figure 42 : La formation des autophagosomes en contexte de surexpression de *Psn* et d'expression de *Rh-1^{G69D}* est en partie dépendante des caspases

(A-E) Détection de la mort cellulaire avec un marquage TUNEL (en gris). (A'-E') Détection par immunomarquage de la GFP de la protéine Atg8 étiquetée (Atg8-GFP) (en vert). (A''-E'') Identification des agrégats protéiques avec un immunomarquage anti-Ref(2)P (en rouge). (A'''-E''') Superposition des marquages rouge et vert, ce qui permet de détecter les autophagosomes, étapes précoces du processus d'autophagie. (a-e) Grossissement de la zone encadrée en blanc en A'''-E'''. Génotypes : (A-a) *vg-GAL4/+ ; UAS-Atg8-GFP/+* (B-b) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-Atg8-GFP/+* (C-c) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-p35 ; UAS-Atg8-GFP/+* (D-d) *vg-GAL4/+ ; UAS Rh-1^{G69D}/UAS-Atg8-GFP* (E-e) *vg-GAL4/UAS-p35 ; UAS Rh-1^{G69D}/UAS-Atg8-GFP*.

Après avoir écarté une éventuelle implication de la voie JNK dans la formation des agrégats dépendant d'ATF4, je me suis intéressée à l'importance potentielle de la voie de mort cellulaire dans l'initiation des étapes précoces du processus d'autophagie. Pour cela, j'ai testé si la formation des autophagosomes détectés en condition de stress est dépendante des caspases. L'expression de *p35* qui code un inhibiteur de caspases a permis d'observer une diminution des marquages ponctiformes d'Atg8-GFP et Ref(2)P (Figure 42 C'-C'', E'-E'') en contexte de blocage de la mort cellulaire (Figure 42C, E) dans nos deux modèles de stress. Ces résultats indiquent que la formation des agrégats et des autophagosomes est au moins en partie dépendante des caspases, dans ces deux systèmes. Ce résultat préliminaire suggère une régulation positive de l'autophagie par les caspases et souligne l'existence d'une communication entre ces deux processus cellulaires.

C. Le modèle de croissance néoplasique : Vps23/TSG101

Toujours dans l'optique de généraliser l'implication des voies de signalisation que nous avons mises en évidence dans nos différents modèles de stress chronique du RE, je me suis intéressée aux conséquences d'une déplétion d'un acteur de la voie d'endocytose : Vps23 aussi appelée TSG101. En effet, chez la drosophile, Colombani et ses collaborateurs ont montré une induction dépendante de la voie JNK de l'expression de *dilp8* dans un modèle de perturbation de croissance néoplasique du disque imaginal d'aile médiée par la déplétion d'un acteur situé en amont de Vps23 dans la cascade d'endocytose : la Syntaxine 7 aussi appelée Avalanche (Avl) (Colombani et al., 2012). En faisant le parallèle entre mes données et celles de cette étude, je me suis demandée, d'une part, s'il était possible d'envisager qu'une même voie d'activation de la JNK puisse être responsable de l'expression de *dilp8*, et d'autre part, si cette expression était associée à une activation de l'UPR.

Les conditions expérimentales utilisées par Colombani et ses collaborateurs sont une surexpression d'un ARNi spécifique d'*avl* dirigée par le pilote *rotund* (*rn)-GAL4,* ce qui conduit à une déplétion d'Avl dans la poche du disque imaginal d'aile. L'insertion *rn-GAL4* est localisée sur le même chromosome que *dilp8* et l'insertion du rapporteur de l'activité d'IRE1 (*Xbp1 ::GFP*), ce qui ne me permettait pas de construire aisément les outils transgéniques nécessaires à la réalisation de ces expériences. Cette difficulté a été contournée en utilisant le pilote *nubbin* (*nub*)-*GAL4*, dont le profil d'expression dans le disque imaginal d'aile est proche de celui de *rn-GAL4* (Figure 43-A). L'expression dirigée par *nub-GAL4* d'un ARNi spécifique d'*avl* mais provenant d'une collection différente de celle utilisée par Colombani *et al*. ne m'a pas permis de détecter une induction de l'expression de *dilp8* (non montré). C'est pourquoi, nous avons testé l'effet de la déplétion de deux autres membres situés plus en aval de cette cascade endocytique dont la perturbation conduit à une croissance néoplasique : Vps23, un constituant de l'ESCRT-I, et Vps25, un constituant de l'ESCRT-II (Hariharan and Bilder, 2006).

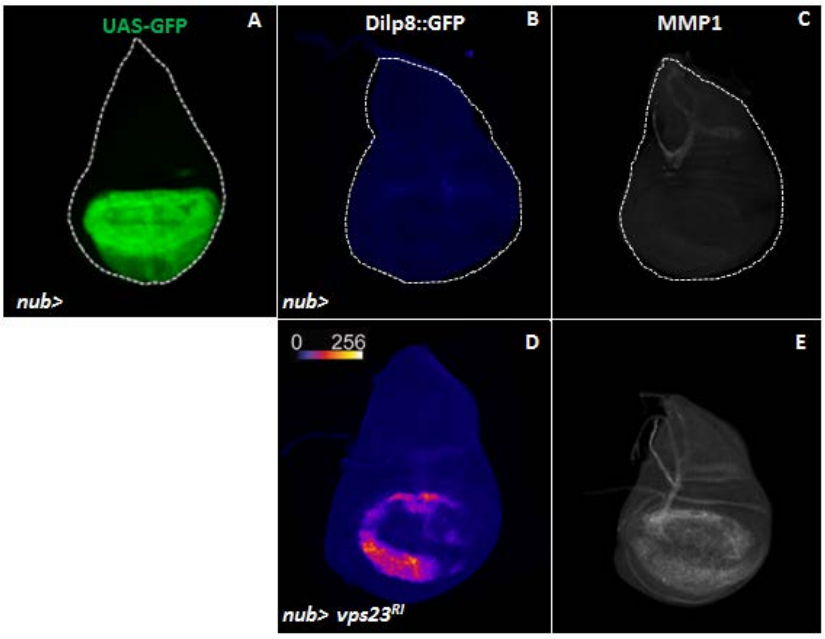


Figure 43 : Vérification de la validité du modèle Vps23

(A) Détection de la GFP qui permet de visualiser le domaine d'expression de *nubbin* (*nub*) dans les disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. (B, D) Détection de la GFP qui permet de rapporter l'expression de *dilp8*. (C, E) Détection de l'activation de la voie JNK par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la métalloprotéase matricielle 1 (MMP1), qui est codée par un des gènes cibles de cette voie de signalisation. Génotypes (A) *nub-GAL4/+ ; UAS-GFP/+*, (B) *nub-GAL4/+; dilp8::EGFP/+*, (D) *nub-GAL4/+ ; dilp8 ::EGFP/UAS-vps23*^{RI}, (C) *nub-GAL4/+; +/+*,(E) *nub-GAL4/+; UAS-vps23*^{RI}*/+*.

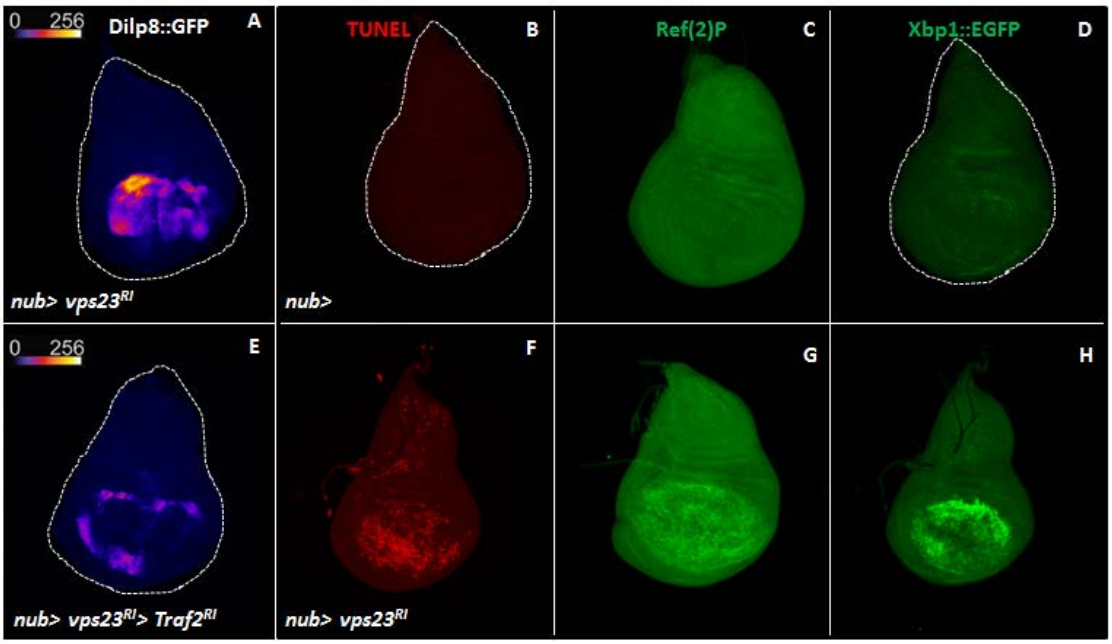


Figure 44 : Caractérisation des effets d'une déplétion de Vps23 dans le disque imaginal d'aile

(A, E) Niveaux d'intensité de fluorescence de la GFP qui permet de rapporter l'expression de *dilp8* dans les disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. (B, F) Détection de la mort cellulaire par un marquage TUNEL. (C, G) Détection de l'agrégation protéique par immunomarquage avec un anticorps ciblant la protéine Ref(2)P. (D, H) La détection de la fluorescence associée au rapporteur UAS-*Xbp1 ::EGFP* permet de visualiser l'activation de la branche IRE1 de l'UPR. Génotypes (A) *nub-GAL4/UAS-Témoin*^{RI} *; dilp8 ::EGFP/+,* (E) *nub-GAL4/UAS-Traf2*^{RI} *; dilp8 ::EGFP/UAS-vps23*^{RI}*, (B, C) nub-GAL4/+; +/+, (F, G) nub-GAL4/+; UAS-vps23*^{RI}*/+*, (D) *nub-GAL4/+; Xbp1::EGFP/+*, (H) *nub-GAL4/+; Xbp1::EGFP/UAS-vps23*^{RI}.

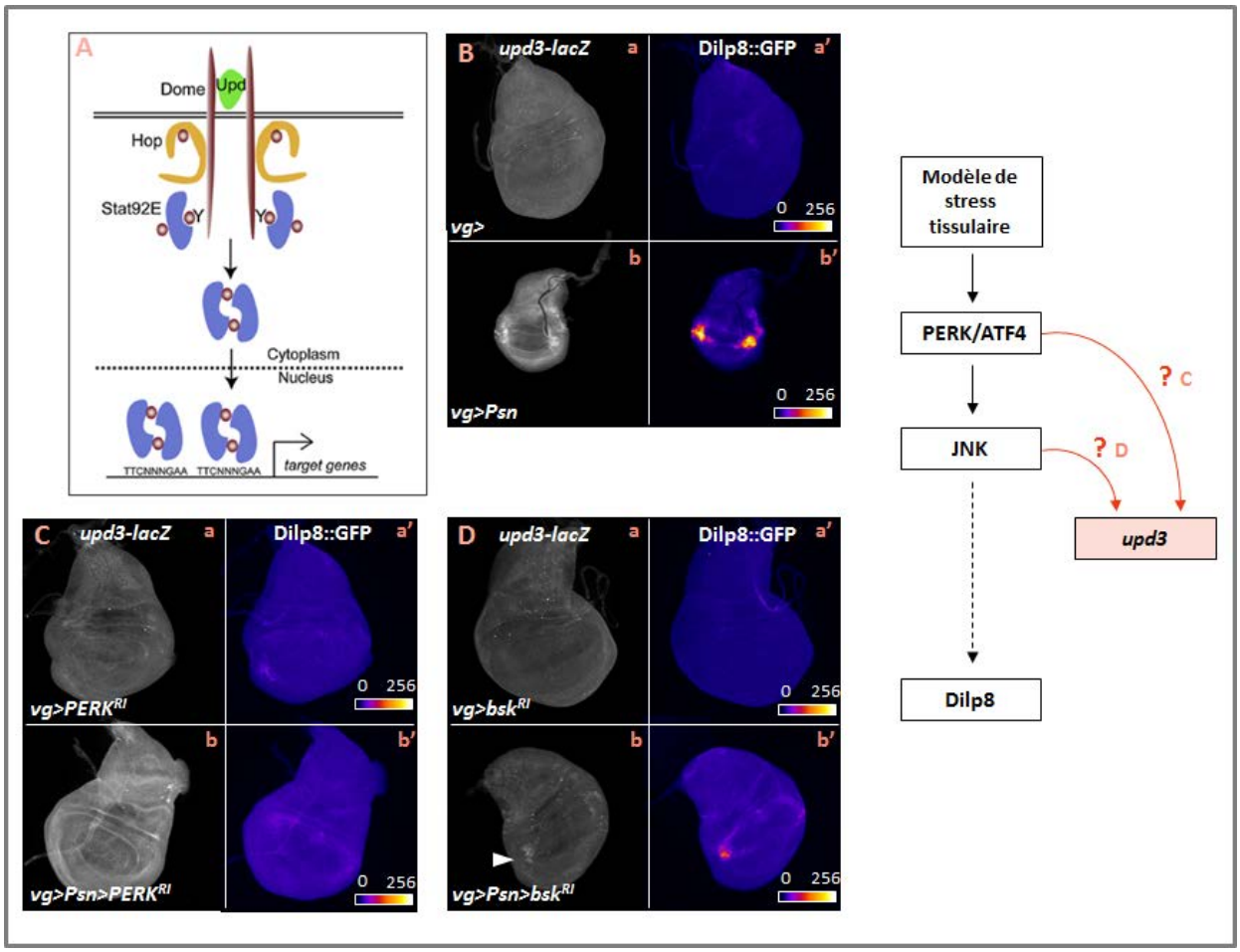


Figure 45 : La signalisation JAK/STAT est activée en contexte de stress du RE induit par la surexpression de *Psn*

(A) Représentation schématique de la signalisation JAK/STAT chez la drosophile, avec le ligand Upd qui active le récepteur de la voie Domeless (Dome), la kinase JAK Hopscotch (Hop) et le facteur de transcription STAT92E adapté de Amoyel et al., 2014. (B, C, D) (a-b) Immunodétection de la β-galactosidase pour détecter l'expression du ligand *upd3* dans les disques imaginaux d'ailes de troisième stade larvaire, (a'-b') Détection de la GFP qui permet de rapporter l'expression de *dilp8*. Génotypes : (B-a-a') *vg-GAL4/+ ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP* (B-b-b') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP. (*C-a-a') *vg-GAL4/UAS-PERK ^{RI} ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP* (C-b-b') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-PERK ^{RI} ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP.* (D-a-a') *vg-GAL4/UAS-Bsk ^{RI} ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP* (D-b-b') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-Bsk ^{RI} ; upd3-lacZ/ dilp8 ::EGFP*.

J'ai observé une modulation de l'expression de *dilp8* uniquement pour la déplétion de Vps23 (Figure 43D et non montré). Comme décrit par Colombani *et al.*, elle est associée à une activation de la voie JNK (Figure 43E). Une fois la validité de ce système vérifiée, j'ai entrepris de poursuivre la caractérisation de ce modèle en tentant d'apporter des éléments de réponse aux problématiques évoquées précédemment. Ainsi, en déterminant les composants de la voie de membres de la signalisation JNK qui régule l'expression de *dilp8*, j'ai pu constater qu'une déplétion de la protéine adaptatrice Traf2 provoque une forte diminution du signal Dilp8 (Figure 44E). Ce résultat indique que dans ce modèle de perturbation de la croissance, l'expression de *dilp8* est contrôlée par une voie JNK dont la composition est au moins dépendante de Traf2. Cette protéine adaptatrice n'étant pas impliquée dans la régulation de l'expression de *dilp8* dans nos différents modèles de stress chronique du RE, cette expérience indique que l'expression de *dilp8* peut être contrôlée par des voies JNK dont les membres varient d'un modèle d'étude à l'autre. Par ailleurs, j'ai observé de l'agrégation (Figure 44F), en plus de la mort cellulaire (Figure 44G) déjà décrite dans la littérature, ainsi qu'une activation de l'UPR *via* la branche IRE1/Xbp1 (Figure 44H) dans la poche du disque.

D. Implication de la voie JAK/STAT dans le modèle Psn

L'étude de Colombani sur le modèle de croissance néoplasique du disque imaginal d'aile induite par la déplétion de la Syntaxine 7/Avl révèle également une augmentation de la quantité des transcrits codant les ligands de la voie de signalisation Janus Kinase (JAK)/ Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) : Unpaired (Upd) 1, 2, 3, qui est concomitante avec celle des transcrits de *dilp8* (Colombani et al., 2012). Je me suis demandée si dans le modèle de surexpression de *Psn,* l'induction de l'expression de *dilp8* était également associée à celle des *upd.* Grâce à un transgène *upd3-lacZ*, (Bunker et al., 2015), j'ai observé une induction de l'expression d'*upd3* (Figure 45Bb') associée à l'expression de *dilp8* (Figure 45Bb) dans les disques surexprimant *Psn*, en comparaison avec les conditions témoins pour ces deux marquages (Figures 45Baa').

En raison du rôle prédominant de la voie PERK/ATF4 dans nos modèles de stress du RE, j'ai voulu tester si l'induction de l'expression d'*upd3* était dépendante de cette branche de l'UPR. Mes résultats préliminaires semblent en accord avec cette hypothèse. En effet, une absence de marquage β-galactosidase est observée en contexte de déplétion de PERK (Figure 45Cb). Cette dernière est validée par l'absence d'expression de *dilp8* (Figure 45Cb').

Dans le modèle Psn, la signalisation JNK induit l'expression de *dilp8*, je me suis demandée si cette voie induit également celle d'*upd3*. Mes résultats préliminaires semblent réfuter cette hypothèse. En

effet, un marquage de la β-galactosidase est toujours observé suite à l'expression d'un ARNi ciblant la JNK Bsk (Figure 45Db).

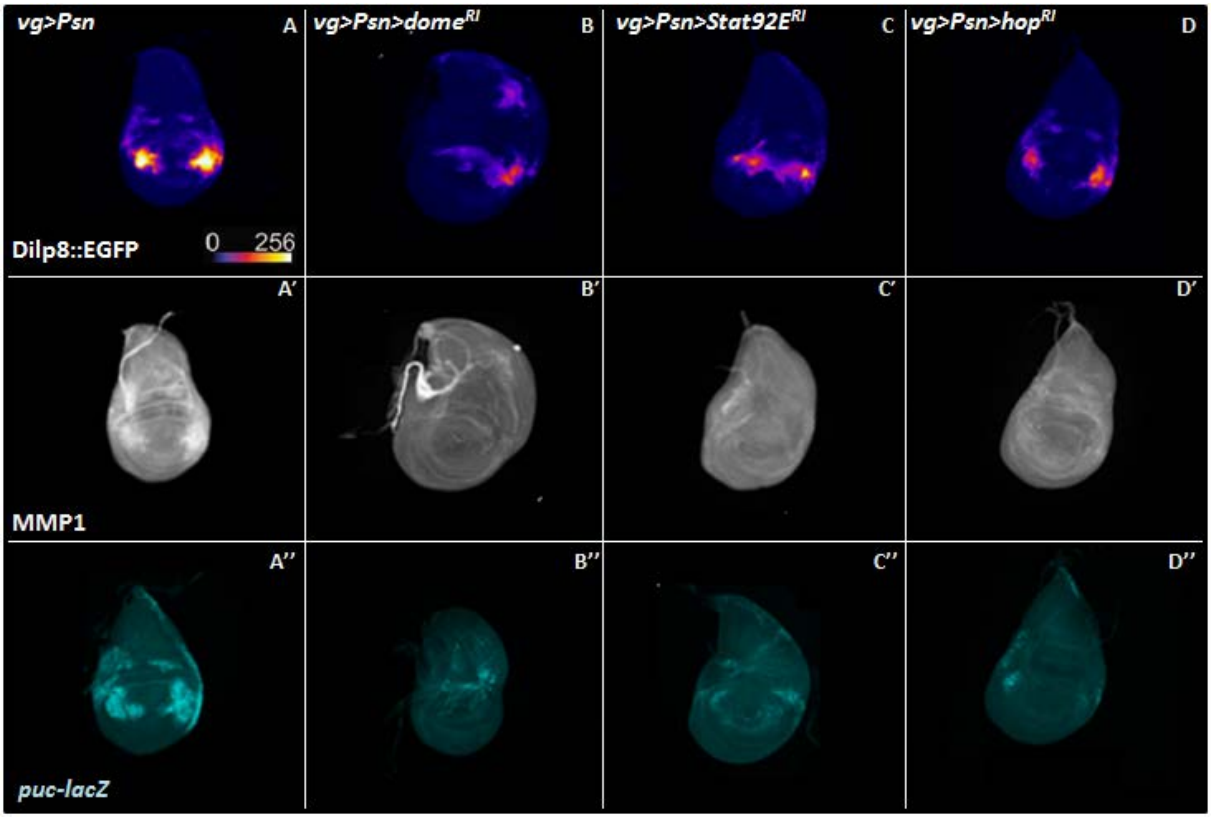


Figure 46 : La signalisation JAK/STAT semble moduler l'expression de *dilp8* et l'activation de la voie JNK dans le modèle de surexpression de *Psn*

(A-D) Détection de la GFP qui permet de rapporter l'expression de *dilp8* dans les disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. (A'-D') Détection de l'activation de la voie JNK par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la métalloprotéase matricielle 1 (MMP1). (A''-D'') Immunodétection de la β-galactosidase pour détecter l'expression de la cible transcriptionnelle de JNK, *puc*. Génotypes : (A-A') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Témoin ^{RI}/ dilp8 ::EGFP* (B-B') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-dome ^{RI}/ dilp8 ::EGFP* (C-C') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Stat92E ^{RI}/ dilp8 ::EGFP* (D-D') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hop ^{RI}/ dilp8 ::EGFP* (A'') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; puc-lacZ/ UAS-Témoin ^{RI}* (B'') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; puc-lacZ/ UAS-dome ^{RI}* (C'') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; puc-lacZ/ UAS-Stat92E ^{RI}* (D'') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; puc-lacZ/ UAS-hop ^{RI}.*

Dans ces conditions, l'expression de *dilp8* diminue très fortement (Figure 45Db') par rapport à la condition contrôle (Figure 45B''), ce qui confirme une inhibition de la voie JNK. Si ces résultats sont confirmés, l'induction de l'expression d'*upd3* serait indépendante de la voie JNK mais dépendante de la branche PERK/ATF4.

L'expression d'un ligand de la voie JAK/STAT étant induit dans le modèle Psn, je me suis demandée si cette voie de signalisation pouvait réguler l'un des processus activés par le stress du RE. J'ai d'abord testé l'effet de la déplétion de chacun des acteurs de cette voie (Dome, Hop et Stat92E) sur l'induction de l'expression de *dilp8*. Une déplétion de n'importe lequel des membres de la voie JAK/STAT conduit à une diminution du signal Dilp8::EGFP en contexte de surexpression de *Psn*, par comparaison avec la condition témoin (données non montrées). A l'issue de ces expériences, j'ai retenu pour la suite de mes travaux les ARNi spécifiques de chacun des membres de la voie JAK/STAT ayant eu l'effet le plus fort (Figure 46B-D). L'expression de ces ARNi entraînent également une perte d'activation de la voie JNK détectée avec deux marqueurs : MMP1 (Figure 46B'-D') et *puc-lacZ* (Figure 46B''-D''). L'ensemble de ces données semble indiquer que la voie JAK/STAT régule l'expression de *dilp8 via* la voie JNK. J'ai également testé si cette signalisation régule la mort cellulaire dans ce modèle. J'ai pu constater que la réduction de la quantité des transcrits codant les différents membres de la voie JAK/STAT, réduit nettement la mort cellulaire détectée avec un marquage TUNEL (Figure 47B-D) ou de l'activation de la Caspase-3 (Figure 47B'-D'). Ces résultats indiquent que la voie JAK/STAT module la voie de compensation mais également l'apoptose en contexte de surexpression de *Psn*. Ces données suggèrent que cette voie de signalisation pourrait contrôler la branche PERK/ATF4 ou un processus en amont de cette dernière. C'est pourquoi, j'ai étudié l'effet de la déplétion des membres de la voie JAK/STAT sur la quantité d'une Psn étiquetée et l'expression d'un transgène *UAS-EGFP*. J'ai pu constater une réduction de la quantité de la Psn étiquetée (Figure 48B-C) et de la GFP dans le domaine d'expression du pilote *vestigial-GAL4* (Figure 48B'-C'). Cette diminution de la quantité de Psn en contexte de déplétion de la voie JAK-STAT explique probablement les phénotypes observés dans ce même contexte concernant l'apoptose et la voie de mort cellulaire. Une forte réduction de la source de stress amoindrirait l'activation des voies de réponses au stress (Figures 46 et 47). Ces données suggèrent que la voie JAK/STAT pourrait inhiber l'expression de *vg* ou affecter la stabilité du facteur de transcription GAL4.

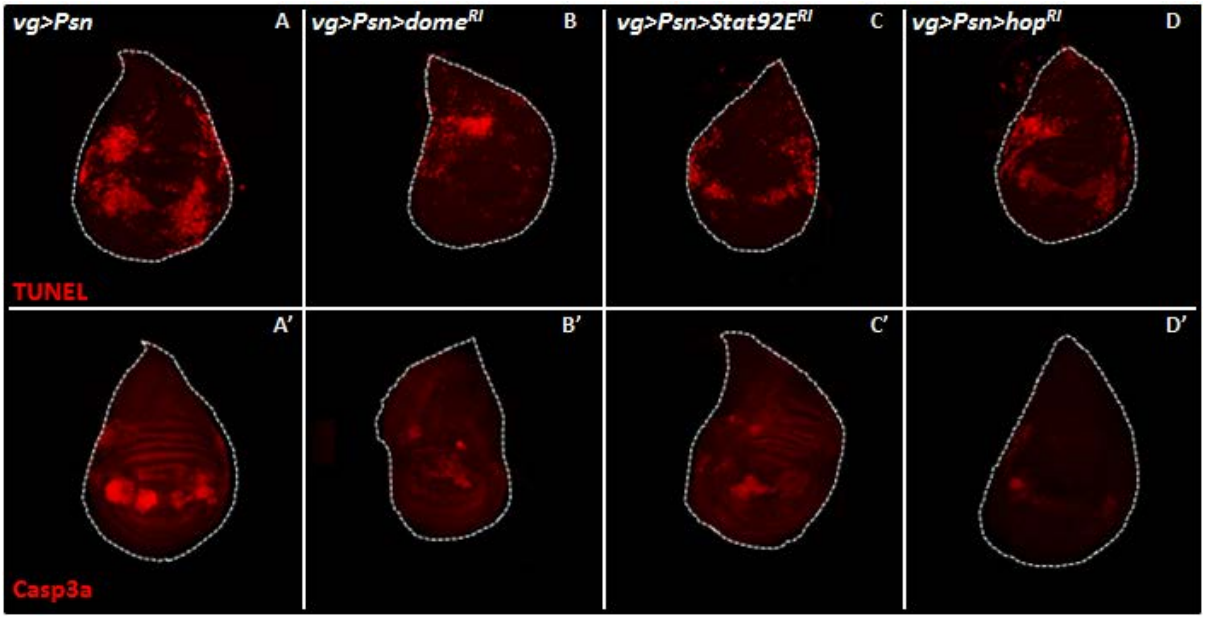


Figure 47 : La signalisation JAK/STAT semble moduler la mort cellulaire et le niveau protéique de DIAP1 dans le modèle de surexpression de *Psn*

(A-B-C-D) Détection de la mort cellulaire par un marquage TUNEL. (A'-B'-C'-D') Détection de l'apoptose avec un immunomarquage ciblant la Caspase-3 activée. Génotypes : (A-A'-) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Témoin ^{RI}/ +* (B-B') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS- dome ^{RI} / +* (C-C') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS- Stat92E ^{RI} / +* (D-D') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hop ^{RI}/ +.*

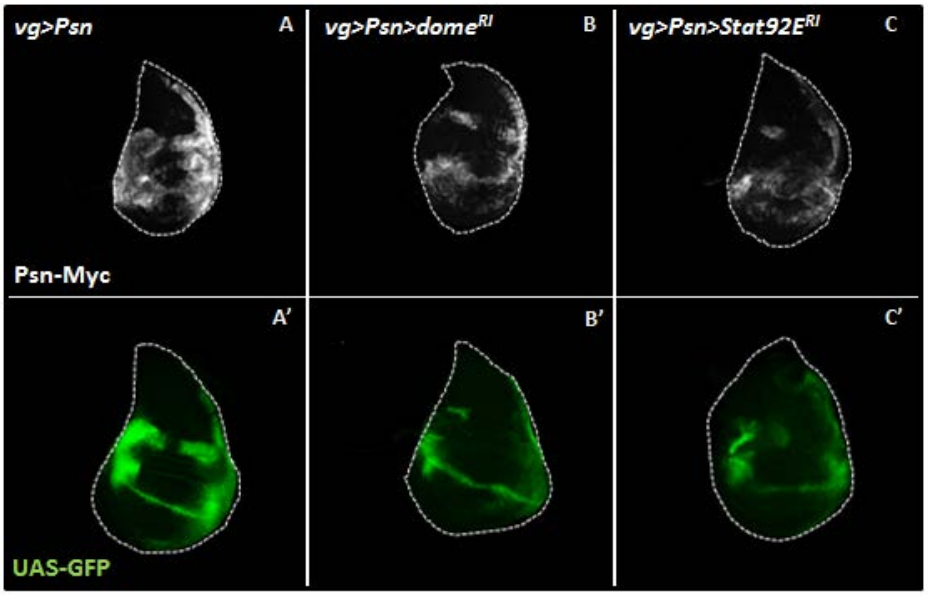


Figure 48 : Le sauvetage des phénotypes induits par la surexpression de *Psn* en contexte d'inhibition de la voie JAK/STAT est dû à une réduction partielle de la quantité de protéine Psn

(A-B-C-D) Détection de la protéine tagguée Psn-Myc grâce à un immunomarquage anti-Myc. (A'-B'-C'-D') Détection de la GFP qui permet de visualiser le domaine d'expression de *vestigial* (*vg*) dans les disques imaginaux d'ailes de troisième stade larvaire. Génotypes : (A) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Témoin ^{RI}/ UAS-Psn-myc* (B) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-dome ^{RI}/ UAS-Psn-myc* (C) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Stat92E ^{RI}/ UAS-Psn-myc* (A') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Témoin ^{RI}/ UAS-GFP* (B') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-dome ^{RI}/ UAS-GFP*) (C') *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Stat92E ^{RI}/ UAS-GFP*.

INTRODUCTION

« L'esprit scientifique nous interdit d'avoir une opinion sur des questions que nous ne comprenons pas, sur des questions que nous ne savons pas formuler clairement. Avant tout, il faut savoir poser des problèmes »

Gaston Bachelard

RÉSULTATS

DISCUSSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le stress du RE provoqué par la surexpression de *Psn* est en partie dû à une dérégulation de l'homéostasie calcique

Notre premier modèle d'étude du stress chronique du RE dans le disque imaginal d'aile reposait sur la surexpression de *Psn.* La préséniline est particulièrement décrite dans la littérature, pour son activité enzymatique au sein du complexe γ-sécrétase, qui lui permet de cliver une pléthore de substrats dont la protéine Notch. Le stress du RE induit par la surexpression de *Psn* conduit à l'élimination par apoptose des cellules qui expriment le transgène. Cette mort cellulaire entraîne une perte tissulaire qui se traduit chez l'adulte par un phénotype d'échancrure d'aile. Ce phénotype est similaire à celui causé par une inhibition de la signalisation Notch, ce qui pourrait suggérer que l'induction du stress du RE serait dépendante de l'activité enzymatique de Psn. Nous avons précédemment exclu une implication de Notch en montrant que la déplétion de Notch présentait des phénotypes différents de ceux de la surexpression de *Psn* (Demay et al, 2014). Par ailleurs, aucune modification du phénotype d'encoches induit par la surexpression de *Psn* n'a été observée en contexte mutant codant une forme tronquée de Psn dépourvue de ses sites catalytiques, contrairement au contexte mutant codant une forme tronquée de Psn dépourvue de ses domaines transmembranaires (thèse de Yohan Demay, 2014). En effet, dans cette dernière condition, un sauvetage phénotypique a été observé. Ces résultats semblent donc suggérer que les phénotypes induits par la surexpression de *Psn* ne dépendent pas de l'activité catalytique mais plutôt des domaines transmembranaires de Psn. Une preuve définitive de la non-implication de l'activité γ-sécrétase de Psn dans l'induction du stress du RE, serait l'absence d'observation d'induction de ce dernier à la suite de la surexpression d'un transgène codant une forme de *Psn* spécifiquement mutée au niveau de ses sites catalytiques responsables de son activité γ-sécrétase.

Comme je l'ai évoqué en introduction, de nombreuses études récentes décrivent un rôle de Psn dans la modulation des voies calciques intracellulaires et ceci indépendamment de son activité γ-sécrétase (Green et al., 2008) (Cheung et al., 2008) (Hayrapetyan et al., 2008) (Zhang et al., 2010). Plus récemment, il a été rapporté qu'une surexpression de *PS2* en cellules de mammifères, module positivement la navette calcique entre le RE et la mitochondrie, indépendamment de son activité enzymatique (Zampese et al., 2011). Cet effet serait médié par une augmentation des interactions physiques entre le RE et la mitochondrie et favoriserait ainsi la fréquence des points chauds calciques à la surface de la membrane externe mitochondriale. Cette surcharge calcique chronique au niveau de cet organite pourrait induire un dysfonctionnement mitochondrial et provoquer un stimulus apoptotique. Cette étude constitue un argument supplémentaire concernant le rôle multifactoriel de

Psn dans différentes fonctions cellulaires qui ne sont pas toujours dépendantes de son activité γ-sécrétase.

Mes travaux suggèrent que le stress du RE induit par la surexpression de *Psn* est au moins en partie dû à un déséquilibre de l'homéostasie calcique. En effet, la déplétion du récepteur à la ryanodine (RyR) inhibe le stress induit par la surexpression de *Psn*. De plus, ce sauvetage est également retrouvé en contexte de déplétion de la pompe SERCA qui présente exclusivement un défaut d'activité calcique. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que Psn module l'homéostasie calcique du RE en régulant l'activité de RyR. En effet, il est rapporté que Psn interagit physiquement avec ce canal calcique pour favoriser son activité de relargage du calcium du RE vers le cytosol. La surexpression de *Psn* favoriserait ainsi une libération excessive de calcium dans le cytosol, se traduisant par un stress du RE. Par ailleurs, dans la littérature, le rôle de Psn vis-à-vis de la régulation de l'activité de SERCA est controversé. Cette pompe assure un sens de transport calcique inverse de celui de Psn et RyR, c'est-à-dire qu'elle permet l'entrée du calcium cytosolique dans la lumière du RE. En dépit de ces rôles opposés, mes résultats indiquent que la déplétion de RyR conduit aux mêmes phénotypes cellulaires que ce soit en contexte de déplétion de SERCA ou de surexpression de *Psn*. Ces données sont en faveur d'une régulation négative par Psn de l'activité de SERCA, si s elle est toutefois dépendante de Psn.

L'interaction génétique entre *Psn* et *RyR* avait été initialement décrite dans une publication rapportant les résultats d'un crible génétique de modificateurs (aggravateur ou suppresseur) du phénotype d'échancrures induit par la surexpression de *Psn* (van de Hoef et al., 2009). En effet, l'hétérozygotie pour un allèle mutant de *RyR* conduit à un sauvetage phénotypique. Il est à noter que le but de ces travaux était d'isoler des gènes dont les produits sont impliqués dans la voie de signalisation Notch. Mes résultats indiquent que le phénotype d'échancrure induit par la surexpression de *Psn*, n'est pas dû à une inhibition de cette voie de signalisation Notch mais à l'induction d'un stress du RE. Il serait intéressant de revisiter ce crible pour identifier parmi les modificateurs isolés, de nouveaux intervenants dans les processus associés à l'activation de l'UPR. Par exemple, un candidat intéressant est *rdgB* dont le produit joue un rôle essentiel dans la cascade de phototransduction activée par le senseur lumineux rhodopsine, chez la drosophile (Yadav et al., 2015). Cette protéine RdgB est impliquée dans le transport calcique et le transfert des inositols entre la membrane du RE et la membrane plasmique de la cellule.

Le crible de modificateurs du phénotype d'aile de la surexpression de *Psn* pourrait également être étendu puisque seulement 1600 insertions d'élément *P* ont été criblées par les auteurs de ce travail. J'ai donc testé l'effet de petites délétions choisies aléatoirement et appartenant à la collection de

déficiences couvrant le génome de la drosophile. De ce crible préliminaire, j'ai conclu qu'il serait préférable d'utiliser le phénotype induit par l'expression de *Rh-1*^{G69D}dans le tissu d'aile. En effet, le crible du phénotype de la surexpression de *Psn* est laborieux car ayant il présente une expressivité variable contrairement à celui de Rh-1^{G69D} (Figure 49). Toutefois, cette expérience m'a permis d'observer un sauvetage complet du phénotype d'échancrure dû à la surexpression de *Psn* en contexte hétérozygote pour la déficience *Df(3L) Exel 9057*. Cette délétion couvre les gènes *four wheel drive* (*fwd*) et *CG34264,* qui est localisé dans le premier intron de *fwd.* Cette délétion n'a aucun effet sur l'expression dirigée par le pilote *vg-GAL4*. L'hétérozygotie pour cette déficience ne semble moduler ni la mort, ni la prolifération, ni le stress du RE. De plus, elle ne semble pas non plus modifier l'activation de la signalisation JNK, l'expression de *dilp8* et le temps de développement (résultats non montrés). Cependant, Amandine Clavier (thésarde de l'équipe du LGBC) a également observé un sauvetage des phénotypes d'échancrure et de surprolifération produits par la surexpression dirigée par *vg* d'un transgène codant une forme mutante de Rbf1 (homologue drosophile de la protéine Rb) : Rbf1^{D253A}. Ce résultat suggère que le processus inconnu qui est affecté par l'hétérozygotie pour *Df(3L) Exel 9057* est commun à la surexpression de *Psn* et de *Rbf1*^{D253}. Il pourrait s'agir du contrôle de la taille des cellules que je n'ai pas testé. En effet, une augmentation de la taille des cellules pourrait permettre une compensation de la perte cellulaire induite par le stress du RE. Il serait intéressant de tester cette hypothèse, tout comme de déterminer si ce sauvetage est dû à une réduction du dosage de *fwd*. En effet, ce gène code la Phosphoinositide-4-Kinase (PI4K) qui est requise dans la production des phosphoinositides, les substrats de RdgB.

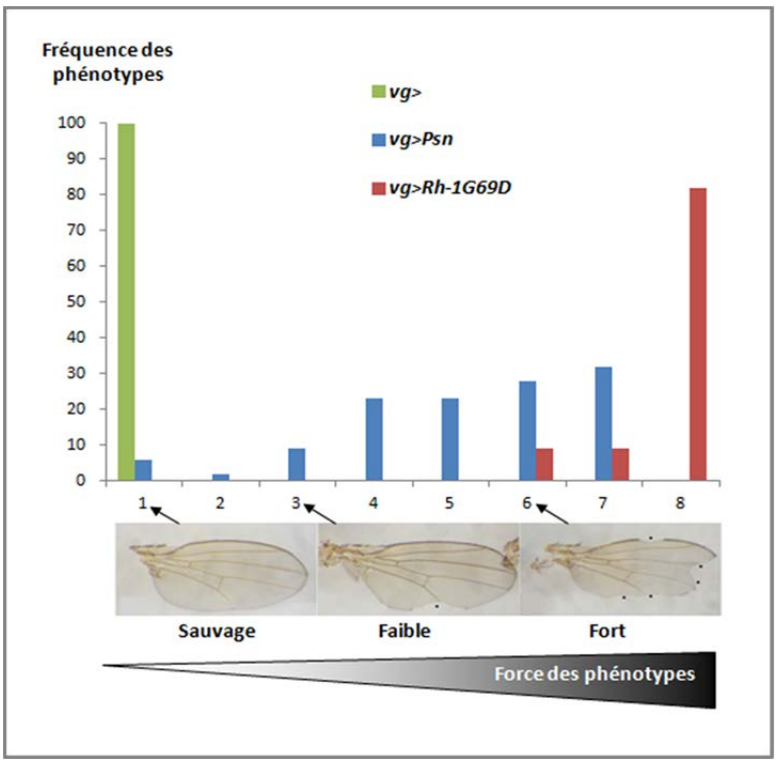


Figure 49 : Distribution des phénotypes d'échancrures d'ailes en contexte de surexpression de *Psn* et d'expression de *Rh-1*^{G69D}.

Différents degrés de sévérité des phénotypes d'ailes adultes sont observés et peuvent être ordonnés en terme de forces (du phénotype sauvage (1) au phénotype le plus fort (8)). En vert, la distribution des phénotypes en contexte sauvage, en bleue celle en contexte de surexpression de *Psn* et en rouge, distribution des phénotypes en condition d'expression de *Rh-1*^{G69D}.

II. La voie de mort cellulaire induite dans nos modèles de stress du RE est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR.

Mes travaux montrent qu'une même source de stress, provoquée par l'expression de *Rh-1*^{G69D}, n'induit pas les mêmes voies d'apoptose suivant le tissu considéré. En effet, dans le tissu d'aile, cette mort est dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR et indépendante de la voie JNK. En revanche, dans le tissu d'œil, elle est indépendante de PERK/ATF4 mais dépendante d'une voie Cdk5-Mekk1-JNK dans l'œil (Kang et al., 2012).

Dans nos modèles de surexpression dans le disque imaginal d'aile de *Psn* et d'expression du transgène *Rh-1*^{G69D}, la branche PERK/ATF4 active l'apoptose au moins en partie en diminuant la quantité de l'inhibiteur des caspases, Diap1. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui montrent que l'activation des effecteurs de l'apoptose chez la drosophile semble principalement dépendre de la régulation de la quantité ou de l'activité de Diap1. Cette apoptose peut également être induite par l'expression des gènes codant les protéines de la famille RHG (Rpr, Hid, Grim) qui sont des antagonistes de Diap1 (Muro et al., 2002) (Holley et al., 2002) (Olson et al., 2003). Au laboratoire, Yohan Demay a observé une expression de *rpr* et *hid* qui est dépendante de Bsk dans les cellules surexprimant *Psn*. Toutefois, nous avons montré que l'activation de JNK ne régule pas l'apoptose dans ce système. Cette expression de *rpr* et *hid* pourrait être associée à une boucle d'amplification de l'activation des caspases décrite par (Shlevkov and Morata, 2012). En effet, les auteurs de cette étude décrivent un mécanisme d'amplification de l'expression de *rpr* et *hid* qui dépendrait de l'activation de la voie JNK médiée par Dronc, en contexte de stress génotoxique et dépendant de p53. L'hypothèse d'un rôle de cette boucle d'amplification dans nos modèles de stress du RE reste à tester.

De même, il serait intéressant de déterminer l'implication de la famille TMBIM (*Transmembrane BAX inhibitor motif-containing*) dans nos modèles. En effet, les protéines conservées et transmembranaires du RE, TMBIM6 et TMBIM3, régulent la mort cellulaire et l'autophagie en condition de stress du RE. Dans ce contexte cellulaire, leur action conjointe et dépendante de la branche PERK de l'UPR, chez la drosophile et les mammifères, leur permettrait d'interagir physiquement avec l'IP3R afin de limiter la libération du Ca^{2+} dans le cytosol, qui participe à la cascade d'évènements pro-apoptotiques (Rojas-Rivera et al., 2012).Cette étude semble mettre en avant le rôle anti-apoptotique de ces membres de la famille TMBIM. De plus, TMBIM6 semble également moduler négativement l'autophagie dépendante de la voie JNK et de la branche IRE1 de l'UPR, chez la drosophile et les mammifères (Castillo et al., 2011). Dans ces deux études, ces observations ont été faites dans des tissus autres que les disques imaginaux d'ailes.

III. L'expression de *dilp8* induit un retard de développement en réponse à l'activation de la voie Slpr-JNK par la branche PERK/ATF4 de l'UPR

Nous avons pu mettre en évidence dans nos différents modèles d'études que le stress du RE active la voie JNK en parallèle de l'induction d'apoptose. Cette activation entraîne un phénomène de compensation qui résulte d'un retard de développement et non d'une augmentation de la prolifération cellulaire. En effet, nos données ne mettent en évidence aucune augmentation de la prolifération en réponse à l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* et l'expression de *Rh-1*^{G69D}. De même, aucune activation de la voie JNK n'a été détectée en dehors du domaine d'expression des transgènes. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec une apoptose dépendante des membres de la famille RHG, où dans ces conditions, l'augmentation de la prolifération des cellules voisines de la zone lésée est dépendante de l'activation de la signalisation JNK dans ces cellules (Bergantiños et al., 2010) (Herrera et al., 2013).

La spécificité de ces réponses pourrait reposer sur des combinaisons différentes des composants de la voie JNK (Stronach, 2005b). En effet, la signalisation JNK dite pro-apoptotique dépend des protéines adaptatrices Traf1-2 ou Tab2 et des JNKKK dASK1 et Tak1 (Geuking et al., 2005) (Kuranaga and Miura, 2005) (Xue et al., 2007). Avec le modèle Psn, nous avons mis en évidence que la combinaison Rac1-Slpr-JNK active l'expression de *dilp8* et par conséquent régule le temps de développement de la larve. J'ai généralisé la fonction de cette voie Slpr-JNK dans les modèles Rh-1^{G69D} et Serca^{RI}. L'implication dans ces deux systèmes, de la petite Rho-GTPase, Rac1, reste à valider. La question concernant le mécanisme d'activation de cette GTPase et par voie de conséquence celle de la cascade JNK, reste également posée. Une hypothèse à tester serait que la transcription d'au moins un gène codant une Rho-GEF serait activée par ATF4. Alternativement, ce facteur de transcription pourrait réprimer l'expression d'un gène codant une Rho-GAP.

Si nous venons d'illustrer que la différence de fonction de la voie JNK pouvait être expliquée par une différence de combinaisons de ses composants, nous allons voir dans le paragraphe suivant qu'une même fonction biologique peut être assurée par des voies JNK de composition différente.

IV. La déplétion de TSG101 est un modèle de stress du RE dans lequel le retard de développement est médiée par la voie Traf2-JNK-Dilp8

Dans le but de généraliser nos observations sur la voie JNK/Dilp8, je me suis intéressée aux défauts d'endocytose. En effet, Colombani et ses collaborateurs ont montré que la déplétion dans le

disque imaginal d'aile de la Syntaxine 7/Avl, un composant de la cascade endocytique, active une voie JNK qui induit l'expression de *dilp8* et par conséquent un retard d'entrée en pupaison (Colombani et al., 2012). Après avoir établi un système équivalent basé sur la déplétion d'un autre composant de la voie d'endocytose, Vps23, j'ai mis en évidence que l'expression de *dilp8* était dépendante de Traf2 et non de Slpr, suggérant ainsi l'existence d'une autre voie JNK régulant l'expression de *dilp8*. Ces résultats ont été confirmés par les derniers travaux de cette équipe qui montrent que le retard du développement associé à la déplétion de la Syntaxine 7/Avl dépend d'une voie Traf2-Tak1-JNK (Andersen et al., 2015). Par conséquent, une même fonction biologique (ici, la régulation de l'expression de *dilp8*) peut être assurée par des voies JNK de composition différente (Rac1-Slpr-JNK dans nos modèles et Traf2-Tak1-JNK dans le cas des défauts d'endocytose).

Cette différence de combinaisons des composants de la voie JNK pourrait être expliquée par la différence de nature du stimulus dans ces modèles. J'ai bien mis en évidence une activation de la branche IRE1/Xbp1 de l'UPR, et donc potentiellement un stress du RE, en contexte de réduction du niveau protéique de Vps23 dans la poche du disque. Cette observation a d'ailleurs été confirmée dans un autre domaine (le compartiment postérieur du disque, en utilisant le pilote *engrailed-GAL4*) et avec un autre *ARNi* spécifique de *vps23* provenant d'une autre collection (VDRC). Cependant, la voie Traf2-Tak1-JNK serait activée par le récepteur au TNF, Grindelwald, en réponse à une perte de la polarité cellulaire, suite à la déplétion de Syntaxine 7/Avl (Andersen et al., 2015). Cette perte de polarité n'est a priori pas retrouvée dans nos systèmes modèles.

Ce qui est intrigant, c'est que l'observation de l'activation de la branche IRE1/Xbp1 de l'UPR suggère l'existence d'un stress du RE associé à la déplétion de Vps23. Il serait donc intéressant de tester d'une part, si la branche PERK/ATF4 est également activée et d'étudier d'autre part, la contribution de l'UPR dans ce modèle de tumeur néoplasique

V. L'activation de la signalisation JAK/STAT, en amont de la voie JNK, semble intervenir dans la modulation de l'expression de *dilp8* dans le modèle *Psn*

Je me suis intéressé à la voie de signalisation JAK/STAT, en raison de l'observation d'une augmentation de la quantité de transcrits des gènes codant les ligands de cette voie (Upd, Upd2 et Upd3), concomitante à celle des transcrits de *dilp8* dans les disques imaginaux d'aile déplétés de la Syntaxine 7/Avl (Colombani et al., 2012). Dans le modèle Psn, j'ai observé une induction de l'expression d'*upd-3* qui serait dépendante de PERK mais indépendante de la voie JNK. Ces résultats

sont préliminaires et doivent donc être confirmés. Mais cette étude pourrait être étendue aux autres ligands de la voie ainsi qu'aux autres modèles de stress du RE.

Concernant le rôle de l'induction de l'expression d'*upd3*, celui-ci reste à définir puisque qu'une déplétion des membres de la voie JAK-STAT réduit la quantité de Psn et joue donc sur le niveau de stress induit. En effet, mes travaux semblent d'une part indiquer que la voie JAK/STAT est activée et que d'autre part elle affecterait la stabilité du facteur de transcription GAL4 ou inhiberait l'expression de *vg*. Cette dernière hypothèse pourrait être en accord avec le rôle de cette voie de signalisation dans la mise en place du patron du disque d'aile et en particulier du territoire correspondant à la future charnière de l'aile (Ayala-Camargo et al., 2013 Dev Biol) (Hatini et al., 2013 Dev Biol) (Johnstone et al., 2013 PLOS one). Par conséquent, pour étudier le rôle de la voie JAK/STAT en réponse au stress du RE induit dans le disque imaginal d'aile, le pilote utilisé devra impérativement être changé. De façon intéressante, une récente publication portant sur un modèle de régénération chez la drosophile implique la voie JAK/STAT dans la régulation du retard de développement médié par Dilp8 et la place en aval de la voie JNK (Katsuyama et al., 2015). Cette étude repose sur l'ablation d'une partie du disque imaginal de patte qui induit une prolifération compensatoire. Cette position de la voie JAK/STAT par rapport à la voie JNK, pourrait donc différer de celle suggérée par mes données préliminaires dans le modèle Psn, si ces dernières s'avèrent exactes. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de prolifération compensatoire ou bien être dépendante du tissu. Ces hypothèses sont renforcées par une récente étude menée dans l'intestin de drosophile en condition de stress du RE, qui rapporte que la voie JAK/STAT active la branche PERK de l'UPR de façon non-autonome cellulaire, dans les cellules souches intestinales voisines (Wang et al., 2015a).

VI. La formation des autophagosomes est au moins en partie dépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR et des caspases

Dans les pathologies neurodégénératives, telles les maladies de Huntington, d'Alzheimer, ou de Parkinson, un stress du RE est associé à l'agrégation de protéines (Lee et al., 2012) (Popugaeva and Bezprozvanny, 2013) (Omura et al., 2013). Cependant, les liens de cause à effet entre ces deux processus restent controversés. En effet, selon certains auteurs, l'accumulation d'agrégats cytosoliques entraînerait une inhibition du protéasome, provoquant ainsi un stress du RE (Kouroku et al., 2002) (Velentzas et al., 2013). A l'inverse, il a été rapporté que l'accumulation d'agrégats protéiques serait une conséquence d'un stress du RE (Hoozemans et al., 2012). Mes résultats préliminaires, qui restent à confirmer, suggèrent que pour la perturbation de l'homéostasie calcique

par la surexpression de *Psn* et l'accumulation de Rh-1 mal-repliée dans le disque imaginal d'aile, la formation d'agrégats protéiques, rapportée par l'accumulation de Ref(2)P, serait associée à une augmentation de l'autophagie. Ces deux processus semblent dépendre du stress du RE et plus particulièrement de la branche PERK/ATF4. En revanche, nous n'avons pas déterminé la dépendance de l'agrégation vis-à-vis de l'autophagie. Il serait intéressant de tester l'effet d'une inhibition de la machinerie d'autophagie sur la quantité d'agrégats. En effet, nos résultats semblent en contradiction avec la littérature interprétant l'accumulation de Ref(2)P comme une indication d'un défaut d'autophagie (Nezis et al., 2008) (Pircs et al., 2012) (Klionsky et al., 2012).

Il est à noter que Ref(2)P et son orthologue p62 ne sont pas uniquement impliquées dans l'autophagie. Chez les mammifères, p62 entre en compétition avec la protéine Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) pour interagir physiquement avec Nrf2. L'accumulation de p62 permet de réduire l'ubiquitinylation du Nuclear Factor E2-related factor 2 (Nrf2), qui est facilitée par Keap1, et la dégradation de Nrf2 par le protéasome. Cette stabilisation du facteur de transcription Nrf2 permet un changement de régulation de cibles transcriptionnelles qui sont requises pour la réponse au stress oxydant (Komatsu et al., 2010). Cette fonction semble conservée chez la drosophile. En effet, une signalisation Ref(2)P/Nrf2 a été mise en évidence dans un contexte de surcroissance cellulaire dépendante de Myc chez la drosophile (Nagy et al., 2013). Cependant, l'accumulation de Ref(2)P dans ce système est indépendante de la branche PERK/ATF4 de l'UPR, contrairement à l'autophagie. Il serait intéressant de tester une éventuelle activité de Nrf2 dans nos systèmes modèles et si c'est le cas, d'étudier le rôle de Ref(2)P dans cette réponse.

L'activation de l'autophagie est généralement considérée comme un mécanisme adaptatif vis-à-vis d'un environnement stressant (Kroemer et al., 2010). Elle assure la survie cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire en favorisant notamment la dégradation lysosomiale des agrégats protéiques, de protéines mal-conformées et l'élimination des portions de RE endommagées ou stressées. Nos données suggèrent que l'agrégation et l'autophagie seraient dépendantes de la branche PERK/ATF4 de l'UPR, ce qui est en accord avec une activation attendue de l'autophagie par l'UPR. La branche IRE1/ XBP1 étant également activée dans nos modèles d'études, il serait intéressant de tester son éventuellement implication dans l'induction et/ou la régulation de l'autophagie puisque les données de la littérature sont controversées sur le sujet. D'une part, l'inhibition de la voie IRE1/XBP1 aurait pour effet d'augmenter l'autophagie dans un modèle neuronal murin (Hetz et al., 2009), mettant ainsi en avant un rôle inhibiteur du senseur IRE1 vis-à-vis de ce processus. D'autre part, IRE1 est également décrite pour avoir un effet protecteur vis-à-vis d'un stress modéré (hypoxie, ischémie) en induisant l'autophagie (Fouillet et al., 2012). Par ailleurs, chez les mammifères, une publication révèle que l'activation d'IRE1 contrôle l'autophagie *via* la

signalisation JNK (Ogata et al., 2006). Dans nos modèles, l'autophagie ne semble pas modulée par JNK. Donc si la branche IRE1 intervient dans la régulation de l'autophagie dans nos systèmes, alors cette étude permettra potentiellement de mettre en avant une autre voie responsable de la régulation de ce processus cellulaire.

Outre son implication dans la réponse au stress du RE, l'autophagie est également associée à la régulation de différentes voies de mort cellulaire dont l'apoptose. Une augmentation de l'induction de la formation des autophagosomes est souvent retrouvée dans les cellules qui meurent, ce qui est le cas dans nos deux modèles de stress du RE. J'ai également pu constater que la quantité d'agrégats induits dans nos systèmes de stress est corrélée à celle des cellules en apoptose. Mes données indiquent que l'agrégation et la formation des autophagosomes sont au moins en partie dépendants des caspases, ce qui semble être en faveur d'une activation de l'autophagie dépendante de la mort cellulaire.

Quelle est la signification biologique de cette induction de l'autophagie en contexte de mort cellulaire ? S'agit-il de la mise en place d'une boucle d'amplification du processus de mort cellulaire activée en condition de fort stress ? Est-ce le témoignage de l'activation d'un mécanisme adaptatif visant à réduire la mort cellulaire ? Ces questions restent ouvertes.

VII. CONCLUSION

Au vu de l'ensemble des résultats présentés, nous pouvons établir un modèle récapitulant l'ensemble des voies qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez la drosophile en contexte de stress chronique du RE. Dans la lumière de cet organite, nous provoquons ce stress de différentes manières, soit en perturbant les flux calciques *via* une déplétion de la pompe SERCA ou la surexpression de *Psn*, soit en modulant l'homéostasie protéique *via* l'expression de $Rh\text{-}1^{G69D}$ qui code une forme mal-repliée de la Rh-1. Dans ces différents modèles d'études, la branche IRE1 de l'UPR est activée mais son rôle n'a pas encore été identifié. En revanche, la voie PERK/ATF4 est un élément central puisqu'elle module aussi bien la voie de mort cellulaire, dépendante des caspases et d'une diminution de DIAP1; que celle impliquée dans la régulation de l'homéostasie tissulaire. Cette dernière repose sur une réponse systémique induisant un retard de développement de la larve qui est médié par l'expression de *dilp8*, elle-même dépendante de l'activation de la voie Slpr-JNK. Ce mécanisme de compensation permet de prolonger la phase de prolifération du tissu endommagé sans augmenter la vitesse du cycle cellulaire.

Cette étude montre une généralisation de la réponse vis-à-vis d'un stress du RE au niveau d'un même tissu. Cette dernière emprunte des voies de signalisation différentes suivant le tissu considéré démontrant ainsi une spécificité tissulaire dans la réponse au stress du RE. De plus, en poursuivant l'identification de ces mécanismes induits en contexte de stress chronique du RE, mes données préliminaires semblent d'une part indiquer une activation de l'autophagie dépendante des caspases et suggèrent d'autre part que la voie de signalisation JAK/STAT est activée d'une manière dépendante de PERK et indépendante de la voie JNK. Les rôles de l'autophagie et de la voie JAK/STAT dans ce contexte cellulaire restent à définir.

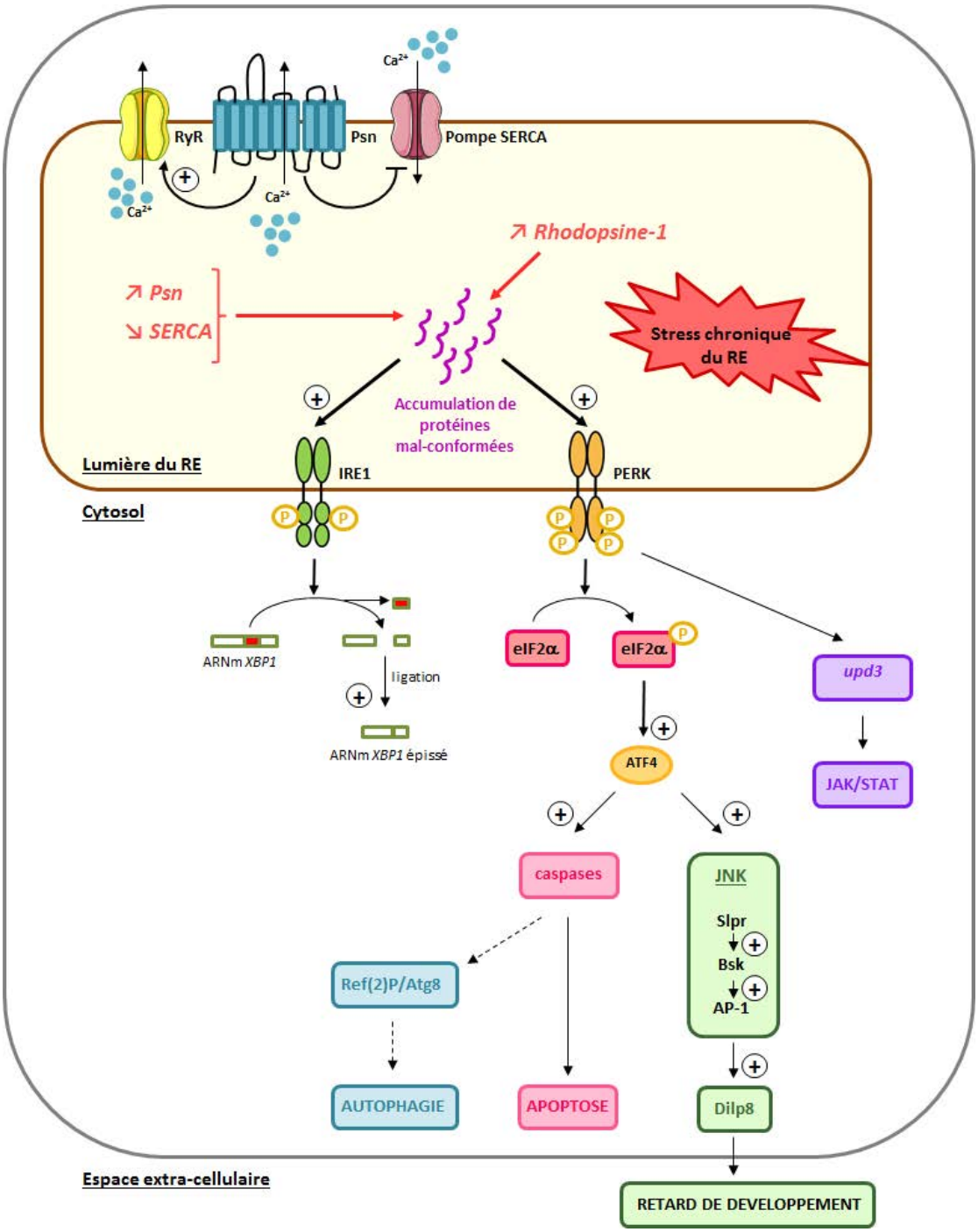


Figure 50 : Modèle des réponses des cellules du disque imaginal d'aile à l'induction de différents stress du RE

Une perturbation de l'homéostasie calcique (déplétion de la pompe SERCA ou surexpression de *Psn*) ou de l'homéostasie protéique (accumulation de Rh-1 mal-conformée) déclenche un stress du RE activant le senseur PERK de l'UPR qui induit l'expression *d'upd3* et d'*atf4*. Le gène *upd3* code un ligand de la signalisation JAK/STAT dont le rôle reste à déterminer. Le facteur de transcription ATF4 présente deux fonctions antagonistes. D'une part, elle induit une voie de mort dépendante des caspases et potentiellement une autophagie qui semble également dépendante des caspases. D'autre part, ATF4 favorise l'homéostasie tissulaire en déclenchant un retard de développement médié par l'expression de *dilp8* qui est dépendante de la voie JNK. Les signes « plus » entourés signalent une régulation positive et les flèches en pointillées indiquent des données à confirmer.

INTRODUCTION

RÉSULTATS

DISCUSSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Stocks

Les mouches sont élevées sur un milieu standard composé d'agar et de maïs. Tous les croisements sont réalisés à 25°C. Les lignées utilisées sont les suivantes : les pilotes *GMR-Gal4* (BL#9146), *vg-GAL4* (Simmonds et al., 1995) proviennent du Bloomington *Drosophila* Stock Center et *nub-GAL4* (don de Anne-Marie Martinez).

Les lignées *UAS-Psn* (Psn+14) (Martín et al., 2009b), *UAS-Psn-myc* (Hu and Fortini, 2003b), *UAS-p35* (Bl#6298), *UAS-VPS23-RNAi* (Bl#35710), *UAS-Stat92E-RNAi* (Bl#33637), *UAS-Dome-RNAi* (Bl#32860), *UAS-Hop-RNAi* (Bl#35386), *UAS-atg8-GFP* (Bl#52005) proviennent également du Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDRC). Les souches *UAS-Mekk1-RNAi* (ID 110339), *UAS-hep-RNAi* (ID 109277), *UAS-bsk-RNAi* (ID 104569), *UAS-Traf2-RNAi* (ID 110266), *UAS-perk-ARNi* (ID110278) sont obtenues auprès de Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria).

Les rapporteurs puc^{E69} (Ring and Martinez Arias, 1993), UAS-*xbp1::EGFP* (Souid et al., 2007), $dilp8^{MI00727}$ (Bl#33079), *diap1::lacZ* (Grusche et al., 2011), *upd3-LacZ* (don de David Bilder) et la lignée *Df(3L)Exel9057* (Bl#7920) provient de BDRC .

Les contrôles du fond génétique sont adaptés aux différentes lignées transgéniques que nous avons utilisées. La lignée *y,w[1118];P{attP,y[+],w[3]}* (ID 60100) comme contrôle génétique des ARNi de la collection KK de VDRC, la lignée w^{1118} est utilisée comme contrôle du fond génétique de la collection GD de VDRC. La lignée y^1,v^1*;P{UAS-GFP.VALIUM10}attP2* (Bl#35786) a été utilisée comme contrôle de la collection d'ARNi TRIPV10 et la lignée y^1,sc^1,v^1*,P{nos-phiC31\int.NLS}X; P{CaryP}attP2* (Bl#25710) pour la collection d'ARNi TRIP V20. Les mouches Canton S ont servi de référence pour toutes les autres lignées.

II. Immunohistochimie et microscopie.

Les larves sont retournées et disséquées en PBS1X (pH=7,8) pour extraire un maximum de tube digestif et de corps gras. Les carcasses sont ensuite fixées en PBS1X/Formaldéhyde 3,7% pendant 20 minutes à température ambiante. Le formaldéhyde est ensuite éliminé par trois lavages successifs d'au moins 5 minutes en PBS1X/Tween 0,3% (PBT) permettant de perméabiliser les différents tissus. Les carcasses sont ensuite incubées dans une solution de saturation de PBT/BSA 2% pendant une heure, puis avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation. L'incubation est réalisée sur la nuit à 4°C ou pendant deux heures à température ambiante. Les carcasses sont ensuite rincées par trois lavages successifs de 5 minutes minimum en PBT de façon à éliminer l'anticorps primaire en suspension, puis incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation pendant

deux heures à température ambiante. Pour finir, elles sont rincées par trois lavages successifs en PBT. Les disques sont isolés des carcasses en PBS1X puis montées entre lame et lamelle dans du cytifluor (BioScience).

Les anticorps primaires utilisés sont : l'anti-caspase-3 de lapin (Asp175, Cell Signaling, 1:20), l'anti anti-β-Galactosidase de souris (40-1a, DSHB, Université d'Iowa, 1:50), l'anti-MMP1 de souris (1:1:1: mix de 5H7B11, 3A6B4 et 3B8D12 clones, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1:25), l'anti-DIAP1 de souris (don de B. Hay, 1:50), l'anti-Phospho-Histone 3 de lapin (PH3) (H3 Ser10, Millipore, 1:1000), l'anti-myc de souris (9E10, Université d'Iowa, 1:200), l'anti-Ref(2)P de rat (D. Contamine, 1:200), l'anti-GFP de lapin (A11122, Invitrogen, 1 :200), l'anti-Dcp-1 de lapin (Asp216, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:50).

Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor 488, 568 ou 647 proviennent de Molecular Probes (Eugen, OR, 1:400). Les images sont prises en utilisant un microscope confocal Leica SPE. Les images sont retravaillées et traitées en utilisant ImageJ.

Le marquage TUNEL est réalisé à l'aide du Kit ApopTag Red in situ apoptosis detection (Chemicon, Millipore) selon les recommandations du fournisseur.

Le marquage Lysotracker (DND-99, red, Ivitrogen) est à réaliser avant la fixation des carcasses, utiliser à 50µM dans du PBS1X (100µl/génotype). Incuber les carcasses dans la solution de Lysotracker pendant 5min à TA et à l'abri de la lumière, puis rincer 3 fois au PBS1X puis procéder à la fixation dans le formaldéhyde.

III. Quantification de l'expression de *dilp8* et de la prolifération.

L'intensité moyenne de fluorescence de la GFP codée par le rapporteur *Dilp8*^{MI00727} est évaluée en utilisant le logiciel image J. Pour cela, le contour du disque est déterminé en utilisant l'outil « Freehand selection ». La fonction mesure permet de déterminer l'intensité moyenne dans la zone sélectionnée. Une zone du notum ne présentant pas d'expression de la GFP est sélectionnée en utilisant la même fonction. La valeur résultant de la fonction « mesure » permet de déterminer le bruit de fond qui sera retranché à la valeur initiale. Afin de pouvoir comparer deux conditions, il est nécessaire d'avoir des disques de taille similaire. Après normalisation, les différentes intensités entre les différentes conditions sont comparées par ANOVA.

INTRODUCTION

RÉSULTATS

DISCUSSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R.J., Balasundaram, S., Fowle, W.H., and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis. Dev. Cell *12*, 793–806.

Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Cell Struct. Funct. *33*, 75–89.

Adham, I.M., Eck, T.J., Mierau, K., Müller, N., Sallam, M.A., Paprotta, I., Schubert, S., Hoyer-Fender, S., and Engel, W. (2005). Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. Mol. Cell. Biol. *25*, 7657–7664.

Amoyel, M., Anderson, A.M., and Bach, E.A. (2014). JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a Drosophila perspective. Semin. Cell Dev. Biol. *28*, 96–103.

Andersen, D.S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., Toggweiler, J., Basler, K., Mapelli, M., Hueber, A.-O., et al. (2015). The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. Nature *522*, 482–486.

Area-Gomez, E. (2014). Assessing the function of mitochondria-associated ER membranes. Methods Enzymol. *547*, 181–197.

Arnold, P.A., Johnson, K.N., and White, C.R. (2013). Physiological and metabolic consequences of viral infection in Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. *216*, 3350–3357.

Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., and Imaizumi, K. (2011). The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. J. Biochem. (Tokyo) *149*, 507–518.

Baehrecke, E.H. (2000). Steroid regulation of programmed cell death during Drosophila development. Cell Death Differ. *7*, 1057–1062.

Baehrecke, E.H. (2002). How death shapes life during development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *3*, 779–787.

Ballinger, A.B., Savage, M.O., and Sanderson, I.R. (2003). Delayed puberty associated with inflammatory bowel disease. Pediatr. Res. *53*, 205–210.

Bartlett, B.J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R.W., Cumming, R.C., Harris, G.L., Nezis, I.P., Schubert, D.R., Simonsen, A., et al. (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. Autophagy *7*, 572–583.

Basseri, S., and Austin, R.C. (2012). Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. Biochem. Res. Int. *2012*, 841362.

Bastianutto, C., Clementi, E., Codazzi, F., Podini, P., De Giorgi, F., Rizzuto, R., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1995). Overexpression of calreticulin increases the Ca2+ capacity of rapidly exchanging Ca2+ stores and reveals aspects of their lumenal microenvironment and function. J. Cell Biol. *130*, 847–855.

Bateman, J.M., and McNeill, H. (2004). Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in Drosophila. Cell *119*, 87–96.

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. Nucleic Acids Res. *41*, 7683–7699.

Benosman, S., Ravanan, P., Correa, R.G., Hou, Y.-C., Yu, M., Gulen, M.F., Li, X., Thomas, J., Cuddy, M., Matsuzawa, Y., et al. (2013). Interleukin-1 receptor-associated kinase-2 (IRAK2) is a critical mediator of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. PloS One *8*, e64256.

Bergantiños, C., Corominas, M., and Serras, F. (2010). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. Dev. Camb. Engl. *137*, 1169–1179.

Bergmann, A., Agapite, J., and Steller, H. (1998). Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. Oncogene *17*, 3215–3223.

Bergmans, B.A., and De Strooper, B. (2010). gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies. Lancet Neurol. *9*, 215–226.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biol. *4*, e423.

Bernard, C. (1865). Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (Paris).

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *1*, 11–21.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 517–529.

Berthelet, J., and Dubrez, L. (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). Cells *2*, 163–187.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat. Cell Biol. *2*, 326–332.

Bommiasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., et al. (2009). ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. J. Cell Sci. *122*, 1626–1636.

Bonini, N.M., and Fortini, M.E. (1999). Surviving Drosophila eye development: integrating cell death with differentiation during formation of a neural structure. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *21*, 991–1003.

Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E., and Baguñà, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating Drosophila wing imaginal discs. Dev. Biol. *280*, 73–86.

Boulianne, G.L., Livne-Bar, I., Humphreys, J.M., Liang, Y., Lin, C., Rogaev, E., and St George-Hyslop, P. (1997). Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue. Neuroreport *8*, 1025–1029.

Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *301*, 215–290.

Brini, M., and Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. Physiol. Rev. *89*, 1341–1378.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. Curr. Biol. CB *11*, 213–221.

Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 3155–3162.

Brunello, L., Zampese, E., Florean, C., Pozzan, T., Pizzo, P., and Fasolato, C. (2009). Presenilin-2 dampens intracellular Ca2+ stores by increasing Ca2+ leakage and reducing Ca2+ uptake. J. Cell. Mol. Med. *13*, 3358–3369.

Brunkan, A.L., and Goate, A.M. (2005). Presenilin function and gamma-secretase activity. J. Neurochem. *93*, 769–792.

Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. Mol. Cell. Biol. *23*, 1292–1303.

Bryant, P.J., and Levinson, P. (1985). Intrinsic growth control in the imaginal primordia of Drosophila, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. Dev. Biol. *107*, 355–363.

Bunker, B.D., Nellimoottil, T.T., Boileau, R.M., Classen, A.K., and Bilder, D. (2015). The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in Drosophila. eLife *4*.

Burnham, J.M., Shults, J., Semeao, E., Foster, B., Zemel, B.S., Stallings, V.A., and Leonard, M.B. (2004). Whole body BMC in pediatric Crohn disease: independent effects of altered growth, maturation, and body composition. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *19*, 1961–1968.

Cáceres, L., Necakov, A.S., Schwartz, C., Kimber, S., Roberts, I.J.H., and Krause, H.M. (2011). Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. Genes Dev. *25*, 1476–1485.

Caldwell, P.E., Walkiewicz, M., and Stern, M. (2005). Ras activity in the Drosophila prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. Curr. Biol. CB *15*, 1785–1795.

Callier, V., Shingleton, A.W., Brent, C.S., Ghosh, S.M., Kim, J., and Harrison, J.F. (2013). The role of reduced oxygen in the developmental physiology of growth and metamorphosis initiation in Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. *216*, 4334–4340.

Cannon, W.B. (1932). Wisdom of the Body.

Capes, E.M., Loaiza, R., and Valdivia, H.H. (2011). Ryanodine receptors. Skelet. Muscle *1*, 18.

Casali, A., and Batlle, E. (2009). Intestinal stem cells in mammals and Drosophila. Cell Stem Cell *4*, 124–127.

Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Sanchez-Garcia, J., Gomez-Velazquez, M., Rincon-Limas, D.E., and Fernandez-Funez, P. (2011). The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity. Hum. Mol. Genet. *20*, 2144–2160.

Cassidy, J.T., and Hillman, L.S. (1997). Abnormalities in skeletal growth in children with juvenile rheumatoid arthritis. Rheum. Dis. Clin. North Am. *23*, 499–522.

Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B., Nassif, M., Court, F.A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., et al. (2011). BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1α branch of the unfolded protein response. EMBO J. *30*, 4465–4478.

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature *406*, 855–862.

Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.-W., Li, W., Hay, B.A., and Shi, Y. (2003). Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. Nat. Struct. Biol. *10*, 892–898.

Challa, M., Malladi, S., Pellock, B.J., Dresnek, D., Varadarajan, S., Yin, Y.W., White, K., and Bratton, S.B. (2007). Drosophila Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. EMBO J. *26*, 3144–3156.

Chan, S.L., Mayne, M., Holden, C.P., Geiger, J.D., and Mattson, M.P. (2000). Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. J. Biol. Chem. *275*, 18195–18200.

Cheung, K.-H., Shineman, D., Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Yang, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Lee, V.M.-Y., and Foskett, J.K. (2008). Mechanism of Ca2+ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. Neuron *58*, 871–883.

Cheung, K.-H., Mei, L., Mak, D.-O.D., Hayashi, I., Iwatsubo, T., Kang, D.E., and Foskett, J.K. (2010). Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. Sci. Signal. *3*, ra22.

Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. Curr. Opin. Struct. Biol. *11*, 120–124.

Chevet, E., Hetz, C., and Samali, A. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. Cancer Discov. *5*, 586–597.

Choe, C.-U., and Ehrlich, B.E. (2006). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2006*, re15.

Christich, A., Kauppila, S., Chen, P., Sogame, N., Ho, S.I., and Abrams, J.M. (2002). The damage-responsive Drosophila gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from reaper, grim, and hid. Curr. Biol. CB *12*, 137–140.

Clarke, H.J., Chambers, J.E., Liniker, E., and Marciniak, S.J. (2014). Endoplasmic reticulum stress in malignancy. Cancer Cell *25*, 563–573.

Coe, H., and Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. Gen. Physiol. Biophys. *28 Spec No Focus*, F96–F103.

Coelho, D.S., Gaspar, C.J., and Domingos, P.M. (2014). Ire1 mediated mRNA splicing in a C-terminus deletion mutant of Drosophila Xbp1. PloS One *9*, e105588.

Colley, N.J., Cassill, J.A., Baker, E.K., and Zuker, C.S. (1995). Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 3070–3074.

Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., and Léopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in Drosophila. Science *310*, 667–670.

Colombani, J., Andersen, D.S., and Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. Science *336*, 582–585.

Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H., and Kumar, S. (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the Drosophila melanogaster cell death machinery. J. Cell Biol. *148*, 703–714.

Corsi, A.K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *271*, 30299–30302.

Cruts, M., Theuns, J., and Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. Hum. Mutat. *33*, 1340–1344.

Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. Mol. Cell. Biol. *23*, 7198–7209.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell *103*, 239–252.

Deegan, S., Koryga, I., Glynn, S.A., Gupta, S., Gorman, A.M., and Samali, A. (2015). A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy. Biochem. Biophys. Res. Commun. *456*, 305–311.

Demay, Y., Perochon, J., Szuplewski, S., Mignotte, B., and Gaumer, S. (2014). The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress Drosophila model. Cell Death Dis. *5*, e1452.

Denton, D., Aung-Htut, M.T., and Kumar, S. (2013). Developmentally programmed cell death in Drosophila. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 3499–3506.

Ditzel, M., Broemer, M., Tenev, T., Bolduc, C., Lee, T.V., Rigbolt, K.T.G., Elliott, R., Zvelebil, M., Blagoev, B., Bergmann, A., et al. (2008). Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation. Mol. Cell *32*, 540–553.

Dorner, A.J., Wasley, L.C., and Kaufman, R.J. (1992). Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. EMBO J. *11*, 1563–1571.

Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y., and Kumar, S. (2004). The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in Drosophila cells. J. Cell Biol. *167*, 405–410.

Doumanis, J., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2007). Molecular determinants of the subcellular localization of the Drosophila Bcl-2 homologues DEBCL and BUFFY. Cell Death Differ. *14*, 907–915.

Drake, T.M., Ritchie, J.E., Kanthou, C., Staves, J.J., Narramore, R., and Wyld, L. (2015). Targeting the endoplasmic reticulum mediates radiation sensitivity in colorectal cancer. Exp. Mol. Pathol. *98*, 532–539.

Dries, D.R., and Yu, G. (2008). Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *5*, 132–146.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. Nat. Cell Biol. *5*, 486–488.

Ezri, J., Marques-Vidal, P., and Nydegger, A. (2012). Impact of disease and treatments on growth and puberty of pediatric patients with inflammatory bowel disease. Digestion *85*, 308–319.

Fagone, P., and Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S311–S316.

Fan, Y., and Bergmann, A. (2008). Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! Trends Cell Biol. *18*, 467–473.

Fan, Y., Wang, S., Hernandez, J., Yenigun, V.B., Hertlein, G., Fogarty, C.E., Lindblad, J.L., and Bergmann, A. (2014). Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in Drosophila. PLoS Genet. *10*, e1004131.

Fischer, U., Jänicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ. *10*, 76–100.

Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., et al. (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. Autophagy *8*, 915–926.

Fox, R.M., and Andrew, D.J. (2015). Transcriptional regulation of secretory capacity by bZip transcription factors. Front. Biol. *10*, 28–51.

Fox, R.M., Hanlon, C.D., and Andrew, D.J. (2010). The CrebA/Creb3-like transcription factors are major and direct regulators of secretory capacity. J. Cell Biol. *191*, 479–492.

Frisch, R.E., and Revelle, R. (1970). Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. Science *169*, 397–399.

Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., et al. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. Circulation *122*, 361–369.

Fujimoto, T., Yoshimatsu, K., Watanabe, K., Yokomizo, H., Otani, T., Matsumoto, A., Osawa, G., Onda, M., and Ogawa, K. (2007). Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas. Anticancer Res. *27*, 127–131.

Gaddam, D., Stevens, N., and Hollien, J. (2013). Comparison of mRNA localization and regulation during endoplasmic reticulum stress in Drosophila cells. Mol. Biol. Cell *24*, 14–20.

Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. Science *333*, 1891–1894.

Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguela, V., Caparros, E., and Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. Science *336*, 579–582.

Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., and Agostinis, P. (2012). ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? Trends Mol. Med. *18*, 589–598.

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

Gauthier, S.A., VanHaaften, E., Cherbas, L., Cherbas, P., and Hewes, R.S. (2012). Cryptocephal, the Drosophila melanogaster ATF4, is a specific coactivator for ecdysone receptor isoform B2. PLoS Genet. *8*, e1002883.

Géminard, C., Rulifson, E.J., and Léopold, P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in Drosophila. Cell Metab. *10*, 199–207.

Geuking, P., Narasimamurthy, R., and Basler, K. (2005). A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of Drosophila TAB2 as a functionally conserved component. Genetics *171*, 1683–1694.

Ghosh, S.M., Testa, N.D., and Shingleton, A.W. (2013). Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in Drosophila melanogaster. Proc. Biol. Sci. *280*, 20130174.

Gibbens, Y.Y., Warren, J.T., Gilbert, L.I., and O'Connor, M.B. (2011). Neuroendocrine regulation of Drosophila metamorphosis requires TGFbeta/Activin signaling. Dev. Camb. Engl. *138*, 2693–2703.

Gilbert, L.I., and Warren, J.T. (2005). A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. Vitam. Horm. *73*, 31–57.

Gilbert, L.I., Rybczynski, R., and Warren, J.T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. Annu. Rev. Entomol. *47*, 883–916.

Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. *26*, 59–86.

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwieg, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. EMBO J. *19*, 589–597.

Green, K.N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B.D., Smith, I.F., Parker, I., and LaFerla, F.M. (2008). SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. J. Cell Biol. *181*, 1107–1116.

Grek, C., and Townsend, D.M. (2014). Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. Endoplasmic Reticulum Stress Dis. *1*, 4–17.

Grewal, S.S. (2009). Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 1006–1010.

Griciuc, A., Aron, L., Roux, M.J., Klein, R., Giangrande, A., and Ueffing, M. (2010). Inactivation of VCP/ter94 suppresses retinal pathology caused by misfolded rhodopsin in Drosophila. PLoS Genet. *6*.

Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in Drosophila melanogaster. Dev. Biol. *350*, 255–266.

Guan, D., Wang, H., Li, V.E., Xu, Y., Yang, M., and Shen, Z. (2009). N-glycosylation of ATF6beta is essential for its proteolytic cleavage and transcriptional repressor function to ATF6alpha. J. Cell. Biochem. *108*, 825–831.

Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A., and Verkhratsky, A. (2010). An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca2+ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca2+ pool. Cell Calcium *48*, 143–149.

Guerriero, C.J., and Brodsky, J.L. (2012). The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. Physiol. Rev. *92*, 537–576.

Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/γ-secretase. J. Alzheimers Dis. JAD *25*, 3–28.

Hackney, J.F., Zolali-Meybodi, O., and Cherbas, P. (2012). Tissue damage disrupts developmental progression and ecdysteroid biosynthesis in Drosophila. PloS One *7*, e49105.

Hadorn, E. (1968). Transdetermination in cells. Sci. Am. *219*, 110–114 passim.

Hadorn, E., and Buck, D. (1962). On the differentiation of transplanted wing imaginal disc fragments of Drosophila melanogaster. Rev. Suisse Zool.

Halme, A., Cheng, M., and Hariharan, I.K. (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in Drosophila. Curr. Biol. CB *20*, 458–463.

Halperin, L., Jung, J., and Michalak, M. (2014). The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. IUBMB Life *66*, 318–326.

Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. Cell *138*, 562–575.

Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., et al. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. Nat. Cell Biol. *15*, 481–490.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature *397*, 271–274.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol. Cell *6*, 1099–1108.

Harding, H.P., Calfon, M., Urano, F., Novoa, I., and Ron, D. (2002). Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *18*, 575–599.

Hariharan, I.K., and Bilder, D. (2006). Regulation of Imaginal Disc Growth by Tumor-Suppressor Genes in *Drosophila*. Annu. Rev. Genet. *40*, 335–361.

Hattori, M., Suzuki, A.Z., Higo, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca2+ signaling. J. Biol. Chem. *279*, 11967–11975.

Haynie, J., and Briant, P.J. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster. Roux's Arch Dev Biol.

Hayrapetyan, V., Rybalchenko, V., Rybalchenko, N., and Koulen, P. (2008). The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction. Cell Calcium *44*, 507–518.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem. *73*, 1019–1049.

Herrera, S.C., Martín, R., and Morata, G. (2013). Tissue Homeostasis in the Wing Disc of Drosophila melanogaster: Immediate Response to Massive Damage during Development. PLoS Genet. *9*, e1003446.

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 89–102.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., et al. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. Science *312*, 572–576.

Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. Genes Dev. *23*, 2294–2306.

Hewes, R.S., Schaefer, A.M., and Taghert, P.H. (2000). The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in Drosophila. Genetics *155*, 1711–1723.

Hind, M., and Maden, M. (2004). Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. Eur. Respir. J. *23*, 20–27.

Hiramatsu, N., Messah, C., Han, J., LaVail, M.M., Kaufman, R.J., and Lin, J.H. (2014). Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2α and ATF4 promotes ER stress-induced cell death during the unfolded protein response. Mol. Biol. Cell *25*, 1411–1420.

Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2013). Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. Curr. Top. Dev. Biol. *103*, 73–100.

Hochmuth, C.E., Biteau, B., Bohmann, D., and Jasper, H. (2011). Redox regulation by Keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in Drosophila. Cell Stem Cell *8*, 188–199.

van de Hoef, D.L., Hughes, J., Livne-Bar, I., Garza, D., Konsolaki, M., and Boulianne, G.L. (2009). Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein. Genes. N. Y. N 2000 *47*, 246–260.

Holley, C.L., Olson, M.R., Colón-Ramos, D.A., and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. Nat. Cell Biol. *4*, 439–444.

Hollien, J. (2013). Evolution of the unfolded protein response. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 2458–2463.

Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. Science *313*, 104–107.

Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. J. Cell Biol. *186*, 323–331.

Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.-M., Gogia, R.K., Li, M., and Lee, A.S. (2004). Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. J. Biol. Chem. *279*, 11354–11363.

Hoozemans, J.J.M., van Haastert, E.S., Nijholt, D.A.T., Rozemuller, A.J.M., and Scheper, W. (2012). Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. Neurodegener. Dis. *10*, 212–215.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. Cell Death Differ. *14*, 1576–1582.

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol. Cell *25*, 193–205.

Hu, Y., and Fortini, M.E. (2003a). Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. J. Cell Biol. *161*, 685–690.

Hu, Y., and Fortini, M.E. (2003b). Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. J. Cell Biol. *161*, 685–690.

Hu, Y.L., Li, S., Shyy, J.Y., and Chien, S. (1999). Sustained JNK activation induces endothelial apoptosis: studies with colchicine and shear stress. Am. J. Physiol. *277*, H1593–H1599.

Huels, D.J., and Sansom, O.J. (2015). Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. Br. J. Cancer *113*, 1–5.

Huh, J.R., Guo, M., and Hay, B.A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the Drosophila wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. Curr. Biol. CB *14*, 1262–1266.

Hussey, R.G., Thompson, W.R., and Calhoun, E.T. (1927). THE INFLUENCE OF X-RAYS ON THE DEVELOPMENT OF DROSOPHILA LARVAE. Science *66*, 65–66.

Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *14*, 1021–1028.

Igaki, T., Yamamoto-Goto, Y., Tokushige, N., Kanda, H., and Miura, M. (2002a). Down-regulation of DIAP1 triggers a novel Drosophila cell death pathway mediated by Dark and DRONC. J. Biol. Chem. *277*, 23103–23106.

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002b). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. EMBO J. *21*, 3009–3018.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. Curr. Biol. CB *12*, 1293–1300.

Irvine, K.D., and Harvey, K.F. (2015). Control of organ growth by patterning and hippo signaling in Drosophila. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*.

Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T.J., McPhie, D.L., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., and Alkon, D.L. (1994). Internal Ca2+ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 534–538.

Iwai, M., Tateishi, Y., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005). Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. J. Biol. Chem. *280*, 10305–10317.

Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M., and Mikoshiba, K. (2007). Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. J. Biol. Chem. *282*, 12755–12764.

Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. Nat. Cell Biol. *3*, 158–164.

Jahani-Asl, A., Huang, E., Irrcher, I., Rashidian, J., Ishihara, N., Lagace, D.C., Slack, R.S., and Park, D.S. (2015). CDK5 phosphorylates DRP1 and drives mitochondrial defects in NMDA-induced neuronal death. Hum. Mol. Genet. *24*, 4573–4583.

Jasper, H., Benes, V., Schwager, C., Sauer, S., Clauder-Münster, S., Ansorge, W., and Bohmann, D. (2001). The genomic response of the Drosophila embryo to JNK signaling. Dev. Cell *1*, 579–586.

Jaszczak, J.S., Wolpe, J.B., Dao, A.Q., and Halme, A. (2015). Nitric Oxide Synthase Regulates Growth Coordination During Drosophila melanogaster Imaginal Disc Regeneration. Genetics.

John, L.M., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. (1998). Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. J. Cell Biol. *142*, 963–973.

Johnson, G.L., and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. Biochim. Biophys. Acta *1773*, 1341–1348.

Jwa, M., and Chang, P. (2012). PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1α-mediated unfolded protein response. Nat. Cell Biol. *14*, 1223–1230.

Kang, M.-J., and Ryoo, H.D. (2009). Suppression of retinal degeneration in Drosophila by stimulation of ER-associated degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17043–17048.

Kang, M.-J., Chung, J., and Ryoo, H.D. (2012). CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. Nat. Cell Biol. *14*, 409–415.

Kaser, A., Flak, M.B., Tomczak, M.F., and Blumberg, R.S. (2011). The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. Exp. Cell Res. *317*, 2772–2779.

Katsuyama, T., Comoglio, F., Seimiya, M., Cabuy, E., and Paro, R. (2015). During Drosophila disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E2327–E2336.

Kauppila, S., Maaty, W.S.A., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, M.T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K., et al. (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila. Oncogene *22*, 4860–4867.

Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology *16*, 47R – 62R.

Kennedy, G.C., and Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. J. Physiol. *166*, 408–418.

Kerr, J., Wyllie, A., and Curries, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer.

Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell *110*, 163–175.

Kim, S.H., Lah, J.J., Thinakaran, G., Levey, A., and Sisodia, S.S. (2000). Subcellular localization of presenilins: association with a unique membrane pool in cultured cells. Neurobiol. Dis. *7*, 99–117.

Kim, T.W., Pettingell, W.H., Hallmark, O.G., Moir, R.D., Wasco, W., and Tanzi, R.E. (1997). Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. J. Biol. Chem. *272*, 11006–11010.

Kim, Y.-I., Ryu, T., Lee, J., Heo, Y.-S., Ahnn, J., Lee, S.-J., and Yoo, O. (2010). A genetic screen for modifiers of Drosophila caspase Dcp-1 reveals caspase involvement in autophagy and novel caspase-related genes. BMC Cell Biol. *11*, 9.

Kimata, Y., and Kohno, K. (2011). Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. Curr. Opin. Cell Biol. *23*, 135–142.

Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., and Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. Mol. Biol. Cell *14*, 2559–2569.

Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. J. Cell Biol. *167*, 445–456.

Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. J. Cell Biol. *179*, 75–86.

Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 6382–6387.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy *8*, 445–544.

Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., and Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Mol. Cell. Biol. *13*, 877–890.

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., et al. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. Nat. Cell Biol. *12*, 213–223.

Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. Nat. Cell Biol. *7*, 186–194.

Kondo, S., Saito, A., Hino, S.-I., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., et al. (2007). BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. Mol. Cell. Biol. *27*, 1716–1729.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science *275*, 1784–1787.

Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M.Y., Kominami, E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., et al. (2002). Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. Hum. Mol. Genet. *11*, 1505–1515.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ. *14*, 230–239.

Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature *332*, 462–464.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell *40*, 280–293.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ. *14*, 32–43.

Kumar, J.P., and Ready, D.F. (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in Drosophila photoreceptor development. Dev. Camb. Engl. *121*, 4359–4370.

Kurada, P., and O'Tousa, J.E. (1995). Retinal degeneration caused by dominant rhodopsin mutations in Drosophila. Neuron *14*, 571–579.

Kuranaga, E., and Miura, M. (2005). Genetic approaches for the identification of apoptotic components. Med. Mol. Morphol. *38*, 18–22.

Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H., and Miura, M. (2002). Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. Nat. Cell Biol. *4*, 705–710.

Kuzin, B., Roberts, I., Peunova, N., and Enikolopov, G. (1996). Nitric oxide regulates cell proliferation during Drosophila development. Cell *87*, 639–649.

Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. Physiol. Bethesda Md *22*, 193–201.

Lamark, T., and Johansen, T. (2012). Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. Int. J. Cell Biol. *2012*, 736905.

Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.-K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. J. Biol. Chem. *277*, 44754–44759.

Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a003996.

Layalle, S., Arquier, N., and Léopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in Drosophila. Dev. Cell *15*, 568–577.

Lecuit, T., and Le Goff, L. (2007). Orchestrating size and shape during morphogenesis. Nature *450*, 189–192.

Lee, H., Noh, J.-Y., Oh, Y., Kim, Y., Chang, J.-W., Chung, C.-W., Lee, S.-T., Kim, M., Ryu, H., and Jung, Y.-K. (2012). IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. Hum. Mol. Genet. *21*, 101–114.

Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 7513–7525.

Lee, T.V., Fan, Y., Wang, S., Srivastava, M., Broemer, M., Meier, P., and Bergmann, A. (2011). Drosophila IAP1-mediated ubiquitylation controls activation of the initiator caspase DRONC independent of protein degradation. PLoS Genet. *7*, e1002261.

Leissring, M.A., Paul, B.A., Parker, I., Cotman, C.W., and LaFerla, F.M. (1999). Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in Xenopus oocytes. J. Neurochem. *72*, 1061–1068.

Leppä, S., and Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. Oncogene *18*, 6158–6162.

Li, J., and Holbrook, N.J. (2004). Elevated gadd153/chop expression and enhanced c-Jun N-terminal protein kinase activation sensitizes aged cells to ER stress. Exp. Gerontol. *39*, 735–744.

Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., and Tabas, I. (2009). Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J. Cell Biol. *186*, 783–792.

Li, T., Li, Y.-M., Ahn, K., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Wong, P.C. (2011). Increased expression of PS1 is sufficient to elevate the level and activity of γ-secretase in vivo. PloS One *6*, e28179.

Liang, G., Audas, T.E., Li, Y., Cockram, G.P., Dean, J.D., Martyn, A.C., Kokame, K., and Lu, R. (2006). Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. Mol. Cell. Biol. *26*, 7999–8010.

Liang, J., Kulasiri, D., and Samarasinghe, S. (2015). Ca(2+) dysregulation in the endoplasmic reticulum related to Alzheimer's disease: A review on experimental progress and computational modeling. Biosystems.

Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. Science *318*, 944–949.

Lin, J.H., Walter, P., and Yen, T.S.B. (2008). Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. Annu. Rev. Pathol. *3*, 399–425.

Lippai, M., and Lőw, P. (2014). The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. BioMed Res. Int. *2014*, 832704.

Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J.H., Walter, P., et al. (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. Mol. Cell *33*, 679–691.

Lundgren, J., Masson, P., Mirzaei, Z., and Young, P. (2005). Identification and characterization of a Drosophila proteasome regulatory network. Mol. Cell. Biol. *25*, 4662–4675.

Luo, K., and Cao, S.S. (2015). Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease. Gastroenterol. Res. Pract. *2015*, 328791.

Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. J. Chem. Neuroanat. *28*, 51–65.

Ma, K., Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2002a). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. J. Biol. Chem. *277*, 18728–18735.

Ma, X., Yang, L., Yang, Y., Li, M., Li, W., and Xue, L. (2013). dUev1a modulates TNF-JNK mediated tumor progression and cell death in Drosophila. Dev. Biol. *380*, 211–221.

Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002b). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. J. Mol. Biol. *318*, 1351–1365.

Maden, M., and Hind, M. (2004). Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *359*, 799–808.

Madeo, F., and Kroemer, G. (2009). Intricate links between ER stress and apoptosis. Mol. Cell *33*, 669–670.

Malzer, E., Szajewska-Skuta, M., Dalton, L.E., Thomas, S.E., Hu, N., Skaer, H., Lomas, D.A., Crowther, D.C., and Marciniak, S.J. (2013). Coordinate regulation of eIF2α phosphorylation by PPP1R15 and GCN2 is required during Drosophila development. J. Cell Sci. *126*, 1406–1415.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. EMBO J. *21*, 1948–1956.

Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., and Robakis, N.K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. Cell *114*, 635–645.

Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. Biochim. Biophys. Acta *1837*, 461–469.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. Genes Dev. *18*, 3066–3077.

Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., et al. (2013). XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. J. Biol. Chem. *288*, 859–872.

Martín, F.A., Peréz-Garijo, A., and Morata, G. (2009a). Apoptosis in Drosophila: compensatory proliferation and undead cells. Int. J. Dev. Biol. *53*, 1341–1347.

Martín, F.A., Peréz-Garijo, A., and Morata, G. (2009b). Apoptosis in Drosophila: compensatory proliferation and undead cells. Int. J. Dev. Biol. *53*, 1341–1347.

Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martinez-Arias, A. (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. Genes Dev. *12*, 557–570.

Mattson, M.P. (2008). Hormesis defined. Ageing Res. Rev. *7*, 1–7.

Matus, S., Castillo, K., and Hetz, C. (2012). Hormesis: protecting neurons against cellular stress in Parkinson disease. Autophagy *8*, 997–1001.

McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.-P., Beckstead, R.B., Warren, J.T., Thummel, C.S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., and O'Connor, M.B. (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in Drosophila. Dev. Cell *13*, 857–871.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol. Cell. Biol. *21*, 1249–1259.

McEwen, D.G., and Peifer, M. (2005). Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. Dev. Camb. Engl. *132*, 3935–3946.

Meissner, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca2+ release channel of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *261*, 6300–6306.

Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Mendes, C.S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H., and Mollereau, B. (2006). Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the Drosophila retina. EMBO Rep. *7*, 933–939.

Mendes, C.S., Levet, C., Chatelain, G., Dourlen, P., Fouillet, A., Dichtel-Danjoy, M.-L., Gambis, A., Ryoo, H.D., Steller, H., and Mollereau, B. (2009). ER stress protects from retinal degeneration. EMBO J. *28*, 1296–1307.

Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. Nat. Cell Biol. *7*, 766–772.

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

Mirth, C.K., and Riddiford, L.M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *29*, 344–355.

Mirth, C.K., and Shingleton, A.W. (2012a). Integrating body and organ size in Drosophila: recent advances and outstanding problems. Front. Endocrinol. *3*, 49.

Mirth, C.K., and Shingleton, A.W. (2012b). Integrating body and organ size in Drosophila: recent advances and outstanding problems. Front. Endocrinol. *3*, 49.

Mirth, C., Truman, J.W., and Riddiford, L.M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in Drosophila melanogaster. Curr. Biol. CB *15*, 1796–1807.

Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell *147*, 728–741.

Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., and Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. Cancer Res. *67*, 10631–10634.

Mollereau, B., Perez-Garijo, A., Bergmann, A., Miura, M., Gerlitz, O., Ryoo, H.D., Steller, H., and Morata, G. (2013). Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. Cell Death Differ. *20*, 181.

Morata, G., Shlevkov, E., and Pérez-Garijo, A. (2011). Mitogenic signaling from apoptotic cells in Drosophila. Dev. Growth Differ. *53*, 168–176.

Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily. Curr. Biol. CB *12*, 1263–1268.

Murakami, T., Kondo, S., Ogata, M., Kanemoto, S., Saito, A., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2006). Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. J. Neurochem. *96*, 1090–1100.

Muro, I., Hay, B.A., and Clem, R.J. (2002). The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC. J. Biol. Chem. *277*, 49644–49650.

Nagy, P., Varga, A., Pircs, K., Hegedűs, K., and Juhász, G. (2013). Myc-driven overgrowth requires unfolded protein response-mediated induction of autophagy and antioxidant responses in Drosophila melanogaster. PLoS Genet. *9*, e1003664.

Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J.B., Muller-Esterl, W., et al. (2001). Functional specialization of calreticulin domains. J. Cell Biol. *154*, 961–972.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 458–467.

Nelson, O., Tu, H., Lei, T., Bentahir, M., de Strooper, B., and Bezprozvanny, I. (2007). Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca2+ leak function of presenilin 1. J. Clin. Invest. *117*, 1230–1239.

Nelson, O., Supnet, C., Tolia, A., Horré, K., De Strooper, B., and Bezprozvanny, I. (2011). Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore. J. Biol. Chem. *286*, 22339–22347.

Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. Cell *93*, 1183–1193.

Nezis, I.P. (2012). The selectivity and specificity of autophagy in Drosophila. Cells *1*, 248–262.

Nezis, I.P., Simonsen, A., Sagona, A.P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T.E., Stenmark, H., and Brech, A. (2008). Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. J. Cell Biol. *180*, 1065–1071.

Niederreiter, L., Fritz, T.M.J., Adolph, T.E., Krismer, A.-M., Offner, F.A., Tschurtschenthaler, M., Flak, M.B., Hosomi, S., Tomczak, M.F., Kaneider, N.C., et al. (2013). ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. J. Exp. Med. *210*, 2041–2056.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. Genes Dev. *16*, 1345–1355.

Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. Annu. Rev. Pathol. *10*, 173–194.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. Mol. Cell. Biol. *26*, 9220–9231.

Oikawa, D., Kimata, Y., and Kohno, K. (2007). Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. J. Cell Sci. *120*, 1681–1688.

Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. Exp. Cell Res. *315*, 2496–2504.

Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., and Iwawaki, T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. Nucleic Acids Res. *38*, 6265–6273.

Oikawa, D., Kitamura, A., Kinjo, M., and Iwawaki, T. (2012). Direct association of unfolded proteins with mammalian ER stress sensor, IRE1β. PloS One *7*, e51290.

Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic

reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem. J. *366*, 585–594.

Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. *279*, 445–450.

Oldham, S., and Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. Trends Cell Biol. *13*, 79–85.

Olson, M.R., Holley, C.L., Yoo, S.J., Huh, J.R., Hay, B.A., and Kornbluth, S. (2003). Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. J. Biol. Chem. *278*, 4028–4034.

Olzmann, J.A., Kopito, R.R., and Christianson, J.C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Matsubara, K., and Nomura, Y. (2013). Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. Oxid. Med. Cell. Longev. *2013*, 239854.

Oommen, D., and Prise, K.M. (2013). Down-regulation of PERK enhances resistance to ionizing radiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *441*, 31–35.

Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *21*, 529–550.

Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. *11*, 381–389.

Palam, L.R., Baird, T.D., and Wek, R.C. (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. J. Biol. Chem. *286*, 10939–10949.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem. *282*, 24131–24145.

Park, S.-Y., Ludwig, M.Z., Tamarina, N.A., He, B.Z., Carl, S.H., Dickerson, D.A., Barse, L., Arun, B., Williams, C.L., Miles, C.M., et al. (2014). Genetic complexity in a Drosophila model of diabetes-associated misfolded human proinsulin. Genetics *196*, 539–555.

Parker, N.F., and Shingleton, A.W. (2011). The coordination of growth among Drosophila organs in response to localized growth-perturbation. Dev. Biol. *357*, 318–325.

Pennuto, M., Tinelli, E., Malaguti, M., Del Carro, U., D'Antonio, M., Ron, D., Quattrini, A., Feltri, M.L., and Wrabetz, L. (2008). Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. Neuron *57*, 393–405.

Pérez-Garijo, A., Martín, F.A., and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in Drosophila. Dev. Camb. Engl. *131*, 5591–5598.

Pérez-Garijo, A., Martín, F.A., Struhl, G., and Morata, G. (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 17664–17669.

Pérez-Garijo, A., Shlevkov, E., and Morata, G. (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc. Dev. Camb. Engl. *136*, 1169–1177.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve *35*, 430–442.

Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., and Juhasz, G. (2012). Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in Drosophila. PloS One *7*, e44214.

Plongthongkum, N., Kullawong, N., Panyim, S., and Tirasophon, W. (2007). Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in Drosophila melanogaster. Biochem. Biophys. Res. Commun. *354*, 789–794.

Poodry, C., and Woods, D. (1990). Control of the developmental timer for Drosophila pupariation. Roux's Arch. Dev. Biol.

Popugaeva, E., and Bezprozvanny, I. (2013). Role of endoplasmic reticulum Ca2+ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. Front. Mol. Neurosci. *6*, 29.

Promlek, T., Ishiwata-Kimata, Y., Shido, M., Sakuramoto, M., Kohno, K., and Kimata, Y. (2011). Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. Mol. Biol. Cell *22*, 3520–3532.

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. Cell *129*, 1337–1349.

Qu, D., Rashidian, J., Mount, M.P., Aleyasin, H., Parsanejad, M., Lira, A., Haque, E., Zhang, Y., Callaghan, S., Daigle, M., et al. (2007). Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease. Neuron *55*, 37–52.

Quinn, L., Coombe, M., Mills, K., Daish, T., Colussi, P., Kumar, S., and Richardson, H. (2003). Buffy, a Drosophila Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. EMBO J. *22*, 3568–3579.

Rajan, A., and Perrimon, N. (2012). Drosophila cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. Cell *151*, 123–137.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene *26*, 3100–3112.

Refolo, L.M., Eckman, C., Prada, C.M., Yager, D., Sambamurti, K., Mehta, N., Hardy, J., and Younkin, S.G. (1999). Antisense-induced reduction of presenilin 1 expression selectively increases the production of amyloid beta42 in transfected cells. J. Neurochem. *73*, 2383–2388.

Rewitz, K.F., Yamanaka, N., Gilbert, L.I., and O'Connor, M.B. (2009). The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. Science *326*, 1403–1405.

Rewitz, K.F., Yamanaka, N., and O'Connor, M.B. (2013). Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation. Curr. Top. Dev. Biol. *103*, 1–33.

Riddiford, L.M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. Receptor *3*, 203–209.

Ring, J.M., and Martinez Arias, A. (1993). puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the Drosophila larva. Dev. Camb. Engl. Suppl. 251–259.

Ringer, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. J. Physiol. *4*, 29–42.3.

Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. (2000). Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. J. Cell Biol. *149*, 1235–1248.

Rojas-Rivera, D., Armisén, R., Colombo, A., Martínez, G., Eguiguren, A.L., Díaz, A., Kiviluoto, S., Rodríguez, D., Patron, M., Rizzuto, R., et al. (2012). TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. Cell Death Differ. *19*, 1013–1026.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 519–529.

Rosenbaum, E.E., Hardie, R.C., and Colley, N.J. (2006). Calnexin is essential for rhodopsin maturation, Ca2+ regulation, and photoreceptor cell survival. Neuron *49*, 229–241.

Roy, B., and Lee, A.S. (1999). The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. Nucleic Acids Res. *27*, 1437–1443.

Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. J. Cell Biol. *204*, 869–879.

Rulifson, E.J., Kim, S.K., and Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. Science *296*, 1118–1120.

Rutkevich, L.A., and Williams, D.B. (2011). Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Cell Biol. *23*, 157–166.

Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., and Kaufman, R.J. (2006). Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. PLoS Biol. *4*, e374.

Rybalchenko, V., Hwang, S.-Y., Rybalchenko, N., and Koulen, P. (2008). The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*, 84–97.

Ryoo, H.D. (2015). Drosophila as a model for unfolded protein response research. BMB Rep.

Ryoo, H.D., and Baehrecke, E.H. (2010). Distinct death mechanisms in Drosophila development. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 889–895.

Ryoo, H.D., and Steller, H. (2007). Unfolded protein response in Drosophila: why another model can make it fly. Cell Cycle Georget. Tex *6*, 830–835.

Ryoo, H.D., Gorenc, T., and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. Dev. Cell *7*, 491–501.

Ryoo, H.D., Domingos, P.M., Kang, M.-J., and Steller, H. (2007). Unfolded protein response in a Drosophila model for retinal degeneration. EMBO J. *26*, 242–252.

Ryoo, H.D., Li, J., and Kang, M.-J. (2013). Drosophila XBP1 expression reporter marks cells under endoplasmic reticulum stress and with high protein secretory load. PloS One *8*, e75774.

Sabapathy, K. (2012). Role of the JNK pathway in human diseases. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *106*, 145–169.

Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. Mol. Cell *15*, 713–725.

Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., et al. (2009). Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. Nat. Cell Biol. *11*, 1197–1204.

Sakaki, K., and Kaufman, R.J. (2008). Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C. Autophagy *4*, 841–843.

Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 3460–3470.

Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. Genes Dev. *18*, 1385–1390.

Satoh, T., Ohba, A., Liu, Z., Inagaki, T., and Satoh, A.K. (2015). dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multi-pass membrane proteins in Drosophila photoreceptors. eLife *4*.

Schindler, A.J., and Schekman, R. (2009). In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17775–17780.

Scriven, P., Coulson, S., Haines, R., Balasubramanian, S., Cross, S., and Wyld, L. (2009). Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. Br. J. Cancer *101*, 1692–1698.

Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D.M., Gouras, G.K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A.J., George-Hyslop, P.S., et al. (1997). Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 5090–5094.

Senoo-Matsuda, N., Igaki, T., and Miura, M. (2005). Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in Drosophila. EMBO J. *24*, 2700–2713.

Sevrioukov, E.A., Burr, J., Huang, E.W., Assi, H.H., Monserrate, J.P., Purves, D.C., Wu, J.N., Song, E.J., and Brachmann, C.B. (2007). Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. Genes. N. Y. N 2000 *45*, 184–193.

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus

and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. Immunity *21*, 81–93.

Shah, S.Z.A., Zhao, D., Khan, S.H., and Yang, L. (2015). Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Resident IP3 Receptors. J. Mol. Neurosci. MN.

Shapiro, P.J., Hsu, H.H., Jung, H., Robbins, E.S., and Ryoo, H.D. (2008). Regulation of the Drosophila apoptosome through feedback inhibition. Nat. Cell Biol. *10*, 1440–1446.

Shen, J., and Prywes, R. (2004). Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. J. Biol. Chem. *279*, 43046–43051.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev. Cell *3*, 99–111.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature *375*, 754–760.

Shilling, D., Mak, D.-O.D., Kang, D.E., and Foskett, J.K. (2012). Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca2+ leak channels. J. Biol. Chem. *287*, 10933–10944.

Shlevkov, E., and Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila. Cell Death Differ. *19*, 451–460.

Siaussat, D., Bozzolan, F., Porcheron, P., and Debernard, S. (2007). Identification of steroid hormone signaling pathway in insect cell differentiation. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *64*, 365–376.

Simmonds, A.J., Brook, W.J., Cohen, S.M., and Bell, J.B. (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the Drosophila wing. Nature *376*, 424–427.

Simpson, P., Berreur, P., and Berreur-Bonnenfant, J. (1980). The initiation of pupariation in Drosophila: dependence on growth of the imaginal discs. J. Embryol. Exp. Morphol. *57*, 155–165.

Smith-Bolton, R.K., Worley, M.I., Kanda, H., and Hariharan, I.K. (2009). Regenerative growth in Drosophila imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. Dev. Cell *16*, 797–809.

Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M., and Gill, D.L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 549–565.

Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S., and Kaufman, R.J. (2008). Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. J. Clin. Invest. *118*, 3378–3389.

Souid, S., Lepesant, J.-A., and Yanicostas, C. (2007). The xbp-1 gene is essential for development in Drosophila. Dev. Genes Evol. *217*, 159–167.

Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. *167*, 35–41.

Sriburi, R., Bommiasamy, H., Buldak, G.L., Robbins, G.R., Frank, M., Jackowski, S., and Brewer, J.W. (2007). Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. J. Biol. Chem. *282*, 7024–7034.

Stathopulos, P.B., and Ikura, M. (2013). Structural aspects of calcium-release activated calcium channel function. Channels Austin Tex *7*, 344–353.

Stempfle, D., Kanwar, R., Loewer, A., Fortini, M.E., and Merdes, G. (2010). In vivo reconstitution of gamma-secretase in Drosophila results in substrate specificity. Mol. Cell. Biol. *30*, 3165–3175.

Stieper, B.C., Kupershtok, M., Driscoll, M.V., and Shingleton, A.W. (2008). Imaginal discs regulate developmental timing in Drosophila melanogaster. Dev. Biol. *321*, 18–26.

Stronach, B. (2005a). Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *232*, 575–584.

Stronach, B. (2005b). Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *232*, 575–584.

De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and γ-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *2*, a006304.

Stutzmann, G.E., Caccamo, A., LaFerla, F.M., and Parker, I. (2004). Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca2+ signals and altered membrane excitability. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 508–513.

Stutzmann, G.E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Parker, I., and Laferla, F. (2007). Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1097*, 265–277.

Sun, G., and Irvine, K.D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. Dev. Biol. *350*, 139–151.

Sung, C.H., Davenport, C.M., Hennessey, J.C., Maumenee, I.H., Jacobson, S.G., Heckenlively, J.R., Nowakowski, R., Fishman, G., Gouras, P., and Nathans, J. (1991). Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 6481–6485.

Sykiotis, G.P., and Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. Sci. Signal. *3*, re3.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. Nature *422*, 438–441.

Talbot, W.S., Swyryd, E.A., and Hogness, D.S. (1993). Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. Cell *73*, 1323–1337.

Tamori, Y., and Deng, W.-M. (2014). Compensatory cellular hypertrophy: the other strategy for tissue homeostasis. Trends Cell Biol. *24*, 230–237.

Tavender, T.J., and Bulleid, N.J. (2010). Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. Antioxid. Redox Signal. *13*, 1177–1187.

Taylor, C.W., and Tovey, S.C. (2010). IP(3) receptors: toward understanding their activation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a004010.

Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Paul, A., and Meier, P. (2002). Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1. EMBO J. *21*, 5118–5129.

Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G., and Wek, R.C. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. Mol. Biol. Cell *22*, 4390–4405.

Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. Neuron *17*, 181–190.

Thomenius, M., Freel, C.D., Horn, S., Krieser, R., Abdelwahid, E., Cannon, R., Balasundaram, S., White, K., and Kornbluth, S. (2011). Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate Drosophila programmed cell death. Cell Death Differ. *18*, 1640–1650.

Thorp, E., Li, G., Seimon, T.A., Kuriakose, G., Ron, D., and Tabas, I. (2009). Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe-/- and Ldlr-/- mice lacking CHOP. Cell Metab. *9*, 474–481.

Thummel, C.S. (2002). Ecdysone-regulated puff genes 2000. Insect Biochem. Mol. Biol. *32*, 113–120.

Timmins, J.M., Ozcan, L., Seimon, T.A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., Backs, T., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Anderson, M.E., et al. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. J. Clin. Invest. *119*, 2925–2941.

Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. Genes Dev. *12*, 1812–1824.

Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R.J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. Genes Dev. *14*, 2725–2736.

Todd-Corlett, A., Jones, E., Seghers, C., and Gething, M.-J. (2007). Lobe IB of the ATPase domain of Kar2p/BiP interacts with Ire1p to negatively regulate the unfolded protein response in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. *367*, 770–787.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell *101*, 249–258.

Truettner, J.S., Hu, K., Liu, C.L., Dietrich, W.D., and Hu, B. (2009). Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. Brain Res. *1249*, 9–18.

Truman, J.W., and Riddiford, L.M. (2007). The morphostatic actions of juvenile hormone. Insect Biochem. Mol. Biol. *37*, 761–770.

Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., and Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. Biochim. Biophys. Acta *1757*, 1297–1300.

Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca2+ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. Cell *126*, 981–993.

Uhlirova, M., and Bohmann, D. (2006). JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in Drosophila. EMBO J. *25*, 5294–5304.

Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., et al. (2012). IRE1α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. Science *338*, 818–822.

Urano, F., Bertolotti, A., and Ron, D. (2000). IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. J. Cell Sci. *113 Pt 21*, 3697–3702.

Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., and Hetz, C. (2013). When ER stress reaches a dead end. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 3507–3517.

Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R., and Abrams, J.M. (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in Drosophila. J. Cell Biol. *144*, 701–710.

Velentzas, P.D., Velentzas, A.D., Mpakou, V.E., Antonelou, M.H., Margaritis, L.H., Papassideri, I.S., and Stravopodis, D.J. (2013). Detrimental effects of proteasome inhibition activity in Drosophila melanogaster: implication of ER stress, autophagy, and apoptosis. Cell Biol. Toxicol. *29*, 13–37.

Verma, G., and Datta, M. (2010). IL-1beta induces ER stress in a JNK dependent manner that determines cell death in human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *15*, 864–876.

Vijendravarma, R.K., Narasimha, S., and Kawecki, T.J. (2012). Chronic malnutrition favours smaller critical size for metamorphosis initiation in Drosophila melanogaster. J. Evol. Biol. *25*, 288–292.

Volmer, R., and Ron, D. (2015). Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. Curr. Opin. Cell Biol. *33*, 67–73.

Walkiewicz, M.A., and Stern, M. (2009). Increased insulin/insulin growth factor signaling advances the onset of metamorphosis in Drosophila. PloS One *4*, e5072.

Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science *334*, 1081–1086.

Walter, J., Capell, A., Grünberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlisny, M.B., Fraser, P., Hyslop, P.S., Selkoe, D.J., et al. (1996). The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. Mol. Med. Camb. Mass *2*, 673–691.

Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. Nat. Rev. Cancer *14*, 581–597.

Wang, L., Zeng, X., Ryoo, H.D., and Jasper, H. (2014). Integration of UPRER and oxidative stress signaling in the control of intestinal stem cell proliferation. PLoS Genet. *10*, e1004568.

Wang, L., Ryoo, H.D., Qi, Y., and Jasper, H. (2015a). PERK Limits Drosophila Lifespan by Promoting Intestinal Stem Cell Proliferation in Response to ER Stress. PLoS Genet. *11*, e1005220.

Wang, Q., Song, C., and Li, C.-C.H. (2004). Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. J. Struct. Biol. *146*, 44–57.

Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Müller, H.A., and Hay, B.A. (1999). The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. Cell *98*, 453–463.

Wang, Y., Xing, P., Cui, W., Wang, W., Cui, Y., Ying, G., Wang, X., and Li, B. (2015b). Acute Endoplasmic Reticulum Stress-Independent Unconventional Splicing of XBP1 mRNA in the Nucleus of Mammalian Cells. Int. J. Mol. Sci. *16*, 13302–13321.

Warren, J.T., Yerushalmi, Y., Shimell, M.J., O'Connor, M.B., Restifo, L.L., and Gilbert, L.I. (2006). Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of Drosophila melanogaster: correlations with changes in gene activity. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *235*, 315–326.

Wells, B.S., Yoshida, E., and Johnston, L.A. (2006). Compensatory proliferation in Drosophila imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. Curr. Biol. CB *16*, 1606–1615.

Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 142–149.

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. Science *264*, 677–683.

White, K., Tahaoglu, E., and Steller, H. (1996). Cell killing by the Drosophila gene reaper. Science *271*, 805–807.

White-Gilbertson, S., Hua, Y., and Liu, B. (2013). The role of endoplasmic reticulum stress in maintaining and targeting multiple myeloma: a double-edged sword of adaptation and apoptosis. Front. Genet. *4*, 109.

Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature *398*, 513–517.

Wu, H., Ng, B.S.H., and Thibault, G. (2014). Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. Biosci. Rep. *34*.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. J. Clin. Invest. *115*, 2656–2664.

Xu, D., Woodfield, S.E., Lee, T.V., Fan, Y., Antonio, C., and Bergmann, A. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in Drosophila. Fly (Austin) *3*, 78–90.

Xue, L., Igaki, T., Kuranaga, E., Kanda, H., Miura, M., and Xu, T. (2007). Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila. Dev. Cell *13*, 446–454.

Yadav, S., Garner, K., Georgiev, P., Li, M., Gomez-Espinosa, E., Panda, A., Mathre, S., Okkenhaug, H., Cockcroft, S., and Raghu, P. (2015). RDGBα, a PI-PA transfer protein regulates G-protein coupled PtdIns(4,5)P2 signalling during Drosophila phototransduction. J. Cell Sci.

Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., and Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J. Biochem. (Tokyo) *136*, 343–350.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev. Cell *13*, 365–376.

Yamanaka, N., Rewitz, K.F., and O'Connor, M.B. (2013). Ecdysone control of developmental transitions: lessons from Drosophila research. Annu. Rev. Entomol. *58*, 497–516.

Yan, N., and Shi, Y. (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *21*, 35–56.

Yan, N., Wu, J.-W., Chai, J., Li, W., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. Nat. Struct. Mol. Biol. *11*, 420–428.

Yan, N., Huh, J.R., Schirf, V., Demeler, B., Hay, B.A., and Shi, Y. (2006). Structure and activation mechanism of the Drosophila initiator caspase Dronc. J. Biol. Chem. *281*, 8667–8674.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. Mol. Cell *34*, 191–200.

Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., and Evans, R.M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell *71*, 63–72.

Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., and Evans, R.M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature *366*, 476–479.

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol. Cell *6*, 1355–1364.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J. Biol. Chem. *276*, 13935–13940.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. J. Biol. Chem. *281*, 30299–30304.

Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. FEBS J. *274*, 630–658.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998a). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J. Biol. Chem. *273*, 33741–33749.

Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., and Mak, T.W. (1998b). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell *94*, 739–750.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell *107*, 881–891.

Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. J. Cell Biol. *172*, 565–575.

Yoshida, H., Uemura, A., and Mori, K. (2009). pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. Cell Struct. Funct. *34*, 1–10.

Yuan, S., and Akey, C.W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. Struct. Lond. Engl. 1993 *21*, 501–515.

Zampese, E., Fasolato, C., Kipanyula, M.J., Bortolozzi, M., Pozzan, T., and Pizzo, P. (2011). Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca2+ cross-talk. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 2777–2782.

Zhang, H., Huang, Q., Ke, N., Matsuyama, S., Hammock, B., Godzik, A., and Reed, J.C. (2000a). Drosophila pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. J. Biol. Chem. *275*, 27303–27306.

Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., De Strooper, B., and Bezprozvanny, I. (2010). Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 8566–8580.

Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., and Cavener, D.R. (2002). The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. Mol. Cell. Biol. *22*, 3864–3874.

Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., and Song, W. (2013). Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. Transl. Neurodegener. *2*, 15.

Zhang, S.X., Sanders, E., Fliesler, S.J., and Wang, J.J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. Exp. Eye Res. *125*, 30–40.

Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., and Yankner, B.A. (2000b). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. Nat. Cell Biol. *2*, 463–465.

Zhou, J., Liu, C.Y., Back, S.H., Clark, R.L., Peisach, D., Xu, Z., and Kaufman, R.J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14343–14348.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev. *12*, 982–995.

Zuzarte-Luís, V., and Hurlé, J.M. (2002). Programmed cell death in the developing limb. Int. J. Dev. Biol. *46*, 871–876.

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Titre: Étude des conséquences d'un stress chronique du RE chez *Drosophila melanogaster*

Mots clés: UPR, PERK, apoptose, homéostasie, Drosophila, disque imaginal d'aile

Résumé: Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite assurant de nombreuses fonctions cellulaires telles que la conformation et des modifications post-traductionnelles des protéines ou le maintien de l'homéostasie calcique. Cet organite est donc un site crucial pour réguler le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire des organismes multicellulaires. Des altérations de ses fonctions conduisent à l'accumulation de protéines mal-conformées qui sont observées dans de nombreuses pathologies humaines telles que des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques. Ce stress déclenche une réponse adaptative connue sous le nom de réponse aux protéines mal-conformées (UPR) qui permet à la cellule de supprimer ses sources et conséquences. Néanmoins, l'intensité et la chronicité du stress peuvent entrainer une modification de l'UPR qui conduit alors à l'élimination de la cellule par apoptose. A ce jour, les processus moléculaires qui permettent à l'UPR d'induire l'apoptose restent flous. De plus, l'implication de l'UPR dans la régulation de processus compensatoires n'a jamais été étudiée. Mes travaux de thèse apportent une meilleure compréhension de ces mécanismes à travers l'étude comparative de différents modèles de stress chronique du RE, qui dépendent d'une dérégulation de l'homéostasie protéique et/ou calcique. Ils soulignent également le rôle essentiel de la branche PERK/ATF4 de l'UPR dans l'induction de deux voies parallèles et indépendantes. D'une part, PERK promeut une apoptose dépendante des caspases *via* une répression de l'expression de *diap1*, et d'autre part, elle induit un retard de développement à travers une induction de l'expression de *dilp8* dépendante de la voie JNK. Mes données suggèrent également une spécificité tissulaire des signalisations déclenchées en réponse à un stress chronique du RE.

Title: Study of the consequences of a chronic ER stress in *Drosophila melanogaster*

Keywords: UPR, PERK, apoptosis, homeostasis, Drosophila, wing imaginal disc

Abstract: The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle which ensures various cellular functions such as protein maturation and folding or calcium homeostasis maintenance. That is why ER is a crucial site of cell and tissue homeostasis regulation in multicellular organisms. Disruption of ER functions leads to misfolded-protein accumulation and is observed in a great number of devastating human diseases. This ER stress triggers an adaptive response named Unfolded Protein Response (UPR) in order to attempt to resolve its sources and consequences. Nevertheless, the intensity and chronicity of ER stress can change this response and lead to the apoptosis of stressed cells. To this date, the molecular processes that regulate UPR-induced apoptosis remain unclear. Furthermore, the UPR contribution in the modulation of compensatory mechanisms in response to ER stress has never been studied. This work contributes to a better understanding of these processes through a comparative study of various chronic ER stresses, which depend on the disruption of proteostasis or calcium homeostasis. During my thesis, I have established the essential role of the PERK/ATF4 branch of the UPR in the induction of two parallel and independent pathways. One promotes apoptosis through the down-regulation of the *diap1* gene while the other interferes with the induction of a developmental delay though a JNK signaling-dependent *dilp8* expression. My results also suggest that chronic ER stress response is tissue specific.