

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Gènes, cellules et développement

---

**Présentée et soutenue par :**

Karène BOYER

**le :** mardi 18 décembre 2012

**Titre :**

Identification de nouveaux réseaux génétiques impliqués dans la régulation  
de l'homéostasie des cellules hématopoïétiques chez la Drosophile

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

UMR5574

**Directeur(s) de Thèse :**

Lucas WALTZER

Marc HAENLIN

**Rapporteurs :**

Marylène POIRIE

Bernard CHARROUX

**Membre(s) du jury :**

Marylène POIRIE

Bernard CHARROUX

Carine MEIGNIN

Christel LUTZ

Lucas WALTZER & Marc HAENLIN



2006-2012 : « Ti lamp, ti lamp » kom di bon *yab* !

Au pire, qu'est ce qu'on risque ?  
*Yogi Garu*



## REMERCIEMENTS

J'exprime ma plus vive reconnaissance à Marc Haenlin pour m'avoir accueillie au CBD, me donnant ainsi la chance de réaliser ce travail de thèse dans un environnement scientifique de grande qualité.

Je remercie aussi chaleureusement Marylène POIRIE, Bernard CHARROUX et Carine MEIGNIN qui ont accepté de lire et de juger ce travail. Un grand merci à Christel LUTZ, qui a accepté de présider ce jury, pour ses encouragements.

Je tiens également à remercier Philippe Valet, le directeur de l'école doctorale, ainsi que toute son équipe pédagogique.

### Un grand merci à mon équipe.

Tout d'abord, les « chefs » Marc & Lucas.

Vous m'avez accueillie dans votre équipe comme stagiaire de M1...et surtout vous m'avez permis de continuer jusqu'au doctorat (bon, avec quelques petits aller-retour !). Un grand merci et des Félicitations à vous car ce fut long ! C'était enthousiasmant et excitant de travailler sur ce sujet de thèse. Merci pour votre soutien. Vous m'avez permis de grandir scientifiquement et humainement... chacun à votre manière. Marc grâce à tes envolées philosophico-scientifique et Lucas grâce à ton pragmatisme. Je ne sais comment vous exprimer ma gratitude.

Les membres « anciens »...

Amélie, *my partner in crime*, avec qui nous avons observé plus de 145000 larves ! (et oui, bien des animaux ont été blessés pendant la réalisation de ces travaux... Une petite pensée pour ces petites bêtes fortes utiles !). Merci aussi à toi pour les échanges concernant la musique, le cinéma ou encore les lectures. Ce fut très enrichissant.

Laëtitia, qui a participé à mon « éducation scientifique » en répondant si gentiment à mes questions naïves... Un grand grand Merci pour les discussions passionnantes et les encouragements. Je suis heureuse de te connaître.

Les « (lymph-)glandouilleurs ».

Dani, tout d'abord un voisin de paillasse, vite devenu un assistant dont le champ de compétences s'étendait du technique au psychologique. Merci pour ton enthousiasme et tous les délires. Pour n'en citer qu'un, je chanterai : « Voyage, Voyage... » En écrivant ces mots, de bons souvenirs me reviennent ; je ne peux m'empêcher de rire devant mon ordinateur.

Assia, avec qui j'ai passé de très bons moments et beaucoup rigolé dans ce *petit pays*...

Stéphanie, la fan de rugby, pour sa gentillesse et ses encouragements qui furent précieux dans la dernière ligne droite.

Merci aussi à Benoît pour son soutien technique inestimable, Vanessa pour m'avoir appris à torturer les mouches, Fernando, le maître de la génétique, et Cédric pour les discussions scientifiques. Merci de m'avoir transmis votre savoir et d'avoir pris le temps de discuter avec moi.

Les membres « nouveaux » : Osman, Marion et Billel.  
Merci pour les discussions de « remise à niveau bibliographique » ou encore les pauses café, fortement appréciées durant ces longues journées de rédactions.

#### Merci aux CBDsites et aux membres des labos voisins

Merci à tous ceux qui oeuvrent à la bonne marche du CBD. Gwanaelle qui nous apporte bien plus qu'une aide administrative ; Aurélie et Brice rois de l'informatique et de la microscopie. Et encore Julien, Fred, et Daniel disponibles et efficaces, tout le service commun...

Je remercie David et Corinne, mes anciens professeurs de génétique de la Drosophile, qui m'ont ouvert à cette discipline passionnante et qui m'ont encouragé à venir travailler au CBD.

Merci à François PAYRE, au directeur de la filière de Master et au scientifique, pour ses encouragements et ses conseils.

Je remercie aussi les autres « thésards » et membres de l'association alpha-T avec qui j'ai passé du bon temps au, et hors, « labo ». Rami pour les discussions en tout genre et les rocks endiablés ; Aurélie, voisine de buro aka toutouyouteuse joyeuse ; Isa pour les moments shopping/rigolade. Il y a aussi Nico, Eléonore, Laetitia, Gaëlle, Emilie, Magalie, Mohamad, Matthieu .... Merci pour avoir partagé ces années avec moi et d'avoir rendu cet espace de travail convivial.

#### Un énorme Merci à mes amis.

Une pensée pour Laurence, Caro et Anne pour leur soutien. Merci d'avoir été présente pour moi. Ce sont des moments précieux. Vous n'avez pas hésité à faire partie de la « team inscription » également composée d'Etienne ! Merci à vous pour cette contribution essentielle à l'obtention de l'indispensable sésame : la carte étudiante.

#### Merci à ma famille.

Ma « belle » famille. Merci de m'avoir ouvert votre case et votre cœur. J'ai pu y trouver refuge dans les moments difficiles. Merci à Cathy, Jean, Marion, Pierre, Grand-Mi...

MERCI à mes parents qui m'ont soutenue, (sup)portée et encouragée durant mes études ; oh combien longues ! Merci d'être toujours là pour moi. Vous êtes une force dans laquelle je peux toujours venir puiser. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet. Il est pour vous.

Merci à Guillaume, l'homme qui partage ma vie. Merci pour tout ! Ton soutien, ton amour, tes conseils, tes « doigts carrés » absolument indispensables lors de l'assemblage de la thèse... La liste pourrait être encore longue. Tu as une patience d'ange qui fut rudement mise à l'épreuve !!! Grâce à ta confiance et ta joie, j'atteins des sommets ! Merci de m'avoir tout donné pour que « la vie devienne un rêve » !

Et juste pour le fun, merci à A Janelle Monae & co....

**Tightrope !!!!**

*Whether you're high or low  
Baby whether you're high or low  
You got to tip on the tightrope  
Now let me see you do the tightrope  
And I'm still tippin' on it*



## RESUME

L'hématopoïèse est le processus de formation des cellules sanguines. Une régulation fine de ce processus permet d'assurer le remplacement de ces cellules et d'adapter leur production aux conditions environnementales. Chez la Drosophile, comme chez les vertébrés, l'hématopoïèse s'effectue en deux vagues. La première, qui prend place pendant l'embryogenèse, permet la genèse de cellules qui vont persister dans la circulation pendant tout le développement de l'animal jusqu'au stade adulte. La deuxième vague a lieu durant les stades larvaires dans un organe spécialisé, la glande lymphatique. Les cellules hématopoïétiques, nommées hémocytes, assurent des fonctions développementales et défensives. Les hémocytes sont donc des acteurs de l'immunité qui est uniquement de type innée chez cet insecte. Les deux principaux types d'hémocytes sont les plasmacytes qui sont des macrophages et les cellules à cristaux qui participent à la mélanisation. Le troisième type cellulaire, les lamellocytes, sont uniquement générés durant la vie larvaire en réponse à certaines situations de stress telle que l'infection des larves par des œufs de guêpe parasitoïde. Cette infection va induire une réponse immunitaire coordonnée impliquant à la fois les cellules sanguines circulantes et celles de la glande lymphatique pour aboutir à l'encapsulation du parasite par les lamellocytes. D'autre part, des mutations génétiques sont connues pour induire la différenciation massive de ces cellules en absence d'infection. La production inappropriée de ces cellules s'accompagne alors fréquemment d'une réaction d'encapsulation détectable par la formation d'amas d'hémocytes mélanisés, historiquement appelés « tumeurs mélanotiques ». Le contrôle de l'homéostasie du système hématopoïétique larvaire est donc primordial pour éviter l'apparition de tels désordres et d'assurer un système de défense efficace.

L'objectif de mon travail de thèse était de découvrir de nouveaux gènes contrôlant l'homéostasie du système hématopoïétique et de mieux comprendre comment la différenciation des lamellocytes est régulée. Pour cela, Nous avons réalisé un crible génétique visant à découvrir de nouveaux gènes « suppresseurs de tumeurs mélanotiques » en exprimant spécifiquement dans les cellules sanguines des dsRNA permettant d'inhiber la fonction du gène ciblé par interférence à l'ARN. Nous avons criblé avec deux pilotes GAL4 spécifique des hémocytes plus de 1300 lignées UAS-dsRNA, ciblant ainsi environ 10% de l'ensemble gènes de la Drosophile codant pour des

protéines. Après une phase de validation, cinquante-neuf gènes dont la perte de fonction conduit à la formation de capsules mélanotiques ont été identifiés, dont 55 n'avaient pas été associés au développement des cellules sanguines auparavant. La majorité des candidats se répartissent en 7 groupes fonctionnels (protéines chaperonnes, protéasome, trafic vésiculaire, protéines ribosomales, métabolisme des mitochondries, réparation de l'ADN, transcription). Grâce à l'utilisation de pilotes GAL4 ciblant différents tissus et sous population d'hémocytes avons montré que la formation de tumeur mélanotiques peut être provoquée par un défaut soit des hémocytes circulant soit de la glande lymphatique mais aussi par un défaut du corps gras, un acteur majeur de réponse immunitaire humorale. Cette stratégie couplée à une analyse de lignage nous a aussi permis de mettre en évidence que des plasmacytes circulants d'origine embryonnaire peuvent se différencier en lamellocyte. Cette plasticité étonnante est notamment régulée par le cofacteur de transcription de la famille FOG U-shaped, qui est requis de manière cellulaire autonome pour empêcher la transformation des plasmacytes en lamellocytes.

## ABSTRACT

In metazoans, the hematopoietic system plays a key role both in normal development and in defense of the organism. In *Drosophila*, the cellular immune response involves three types of blood cells: plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes. This last cell type is barely present in healthy larvae, but its production is strongly induced upon wasp parasitization or in mutant contexts affecting larval blood cell homeostasis. Notably, several zygotic mutations leading to melanotic mass (or "tumor") formation in larvae have been associated to the deregulated differentiation of lamellocytes. To gain further insights into the gene regulatory network and the mechanisms controlling larval blood cell homeostasis, we conducted a tissue-specific loss of function screen using hemocyte-specific Gal4 drivers and *UASdsRNA* transgenic lines.

By targeting around 10% of the *Drosophila* genes, this *in vivo* RNA interference screen allowed us to recover 59 melanotic tumor suppressor genes. In line with previous studies, we show that melanotic tumor formation is associated with the precocious differentiation of stem-cell like blood progenitors in the larval hematopoietic organ (the lymph gland) and the spurious differentiation of lamellocytes. We also find that melanotic tumor formation can be elicited by defects either in the fat body, the embryo-derived hemocytes or the lymph gland. In addition, we provide a definitive confirmation that lymph gland is not the only source of lamellocytes as embryo-derived plasmatocytes can differentiate into lamellocytes either upon wasp infection or upon loss of function of the Friend of GATA cofactor Ushaped.

In this study, we identify 55 genes whose function had not been linked to blood cell development or function before in *Drosophila*. Moreover our analyses reveal an unanticipated plasticity of embryo-derived plasmatocytes, thereby shedding new light on blood cell lineage relationship, and pinpoint the Friend of GATA transcription cofactor Ushaped as a key regulator of the plasmatocyte to lamellocyte transformation.



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : MODELE DE L'HEMATOPOÏÈSE CHEZ LES VERTEBRES ET LA DROSOPHILE.....	8
FIGURE 2 LES HEMOCYTES .....	10
FIGURE 3 : HEMATOPOÏÈSE EMBRYONNAIRE.....	15
FIGURE 4 : ONTOGENESE DE LA GL (1) .....	18
FIGURE 5 : LA GL, ONTOGENESE (2) ET HEMATOPOÏÈSE .....	24
FIGURE 6 : GL AU STADE L3, HOMEOSTASIE ET REGIONALISATION .....	36
FIGURE 7 : LES HEMOCYTES D'ORIGINE EMBRYONNAIRE, CIRCULATION ET CYCLE .....	39
FIGURE 8 : LA VOIE TOLL .....	47
FIGURE 9 : LE PARASITISME CHEZ LA DROSOPHILE.....	51
FIGURE 10 : LA REPOSE AU PARASITISME.....	57
FIGURE 11 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ACTIVATION DES HEMOCYTES .....	63
FIGURE 12 : LE MODELE DE FORMATION DES CAPSULES MELANOTIQUES .....	66
FIGURE 13 : HEMATOPOÏÈSE ET COMMUNICATION LORS DE LA FORMATION DES CAPSULES MELANOTIQUES...	116
FIGURE 14 : ACTIVATION DE LA VOIE TOLL SELON LE CONTEXTE DE PERTE DE FONCTION CIBLEE.....	141
FIGURE 15 : ACTIVATION DE LA VOIE TOLL SELON LES PERTES DE FONCTION CIBLEES AU CORPS GRAS .....	142
TABLEAU 1 : PHENOTYPE HEMATOPOÏËTIQUE SELON LA PERTE DE FONCTION CIBLEE.....	139
TABLEAU 2 : L'ACTIVATION DU RAPPORTEUR DROSOMYCINE-GFP DANS LE CORPS GRAS EST ASSOCIEE A LA FORMATION DE TM .....	140

## LISTE DES ABBREVIATIONS

AMP : peptides antimicrobiens ou AntiMicrobial Peptides

Cg : collagène

Dome : domeless

FOG : Friend Of GATA

Gcm : glial cell missing

L : lamellocyte

L1, L2 ou L3(w) : phase de développement larvaire n°1, 2 ou 3( « wandering » ou errantes)

Lz : lozenge

P : plasmatocyte

Pro : progéniteur

ProH : prohémocyte

PSC : post signalling center ; centre signalisateur postérieur

Pxn : peroxydase

Srp : serpent

TM : tumeur mélanotique

Ush : u-shaped

ZC : zone corticale

ZM : zone médullaire

# TABLE DES MATIERES

-AVANT-PROPOS-.....	1
-INTRODUCTION-.....	5
<b>I. <u>HEMATOPOÏÈSE CHEZ LA DROSOPHILE</u>.....</b>	<b>7</b>
<b>A. Les Types cellulaires.....</b>	<b>9</b>
1. Les plasmacytes.....	9
2. Les Cellules à cristaux.....	11
3. Les Lamellocytes.....	12
4. Un ou d'autre(s) type(s) cellulaire(s) ?.....	12
<b>B. Les vagues d'hématopoïèse .....</b>	<b>13</b>
1. L'hématopoïèse embryonnaire .....	13
a) Ontogenèse .....	13
b) Régulation génique .....	14
2. Hématopoïèses chez la larve .....	16
a) La glande lymphatique .....	16
(1) <i>Ontogenèse</i> .....	16
(2) <i>Hématopoïèse dans la GL : de la cellule souche à l'hémocyte différencié</i>	19
(3) <i>L'homéostasie de la glande lymphatique</i> .....	26
b) Les cellules d'origine embryonnaire .....	37
(1) <i>Des cellules circulantes ou résidentes</i> .....	37
(2) <i>Une expansion de la diversité</i> .....	40
c) "L'hématopoïèse larvaire" .....	41
<b>II. <u>L'IMMUNITE</u> .....</b>	<b>42</b>
<b>A. La détection .....</b>	<b>43</b>
1. Les petits pathogènes, le non-soi et le danger .....	43
2. Le soi altéré.....	44
3. Les parasites.....	44

<b>B. Les “armes”</b> .....	<b>45</b>
1. La réponse humorale .....	45
a) La voie Toll.....	46
b) La voie IMD.....	48
2. La phagocytose .....	48
3. La mélanisation .....	49
4. L’encapsulation .....	49
a) La dynamique d'encapsulation .....	50
b) Encapsulation et évolution.....	52
(1) <i>Chez les insectes</i> .....	52
(2) <i>En comparaison des vertébrés</i> .....	52
<b>C. la coordination de la défense</b> .....	<b>53</b>
1. Immunocompétence .....	53
2. Réponse aux tissus endommagés.....	54
3. Réponse aux petits pathogènes.....	54
4. Réponse au parasitisme.....	55
<b>III. LES TUMEURS MELANOTIQUES</b> .....	<b>58</b>
<b>A. Historique : 100 ans d’observations !</b> .....	<b>58</b>
<b>B. Origine des “tumeurs melanotiques”</b> .....	<b>60</b>
1. Classification selon Watson .....	60
2. Un aspect développemental.....	62
<b>C. Le modèle de formation</b> .....	<b>64</b>
1. La « tumeur mélanotique » : constitution et constituants.....	65
2. Reconnaissance d’un tissu altéré.....	67
3. Réponse systémique et communication cellulaire .....	67
4. Activation des cellules hématopoïétiques .....	68
5. La prolifération.....	68
<b>IV. OBJECTIF ET STRATEGIE</b> .....	<b>70</b>
<b>-RESULTATS-</b> .....	<b>71</b>

I. <u>ARTICLE</u> .....	72
II. <u>RESULTATS</u> .....	87
<b>A. Le choix des capsules melanotiques</b> .....	87
<b>B. Identification de gènes supresseurs de capsules mélanotiques</b> 87	
<b>C. Validation des gènes candidats</b> .....	88
<b>D. Analyse fonctionnelle des candidats</b> .....	88
<b>-RESULTATS SUPPLEMENTAIRES et DISCUSSION-</b> .....	91
I. <u>LA FORMATION DES TUMEURS MELANOTIQUES : DES TISSUS IMMUNS ET</u> <u>IMMUNOGENIQUES</u> .....	94
<b>A. Le corps gras désintégré, un tissu altéré et/ou une altération</b> <b>d'un tissu ?</b> .....	95
1. L'apoptose .....	95
2. "La réponse aux tissus endommagés" .....	96
<b>B. Les lamellocytes : une production compartimentée</b> .....	97
1. La glande lymphatique.....	97
a) Dé-nicher les prohémyocytes de la glande lymphatique .....	97
b) Les lobes secondaires : Le cas de <i>ush</i> et du pilote PColGal4 .....	99
2. Mobiliser tous les fronts : du résidant au circulant.....	99
II. <u>LA PLASTICITE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES</u> .....	102
<b>A. Plasticité hématopoïétique et immunocompétence</b> .....	102
1. Les cellules indifférenciées : plasticité « développementale » .....	102
a) Les prohémyocytes de la glande lymphatique.....	102
b) Les progéniteurs d'origine embryonnaire.....	103
2. Les cellules différenciées : Plasticité « Fonctionnelle » .....	103
a) Les plasmocytes.....	103
b) Les cellules à cristaux .....	104
3. Une régulation développementale.....	105

<b>B. Plasticité et évolution</b> .....	<b>106</b>
1. Chez les drosophiles.....	106
2. Chez les vertébrés .....	107
<b>II. LA COMMUNICATION SYSTEMIQUE</b> .....	<b>109</b>
<b>A. Entre les tissus immuns</b> .....	<b>109</b>
1. La voie Toll .....	109
2. La voie JAK-STAT.....	112
<b>B. Les compartiments hématopoïétiques</b> .....	<b>113</b>
1. La communication du circulant vers le résident.....	113
2. Le PSC : centre coordinateur .....	113
<b>III. L'HISTORIQUE DES TUMEURS MELANOTIQUES</b> .....	<b>115</b>
<b>A. Chapitre « 2012 »</b> .....	<b>115</b>
<b>B. Perspectives</b> .....	<b>117</b>
<b>-CONCLUSION-</b> .....	<b>119</b>
<b>-BIBLIOGRAPHIE-</b> .....	<b>123</b>
<b>-ANNEXES-</b> .....	<b>137</b>
<b>I. FIGURES ANNEXE</b> .....	<b>138</b>
<b>II. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE AVET &amp; BOYER 2010</b> .....	<b>143</b>

*-AVANT-PROPOS-*

Le célèbre physiologiste Claude Bernard est à l'origine de la théorie de l'état d'équilibre. En 1859, dans son Introduction à l'Etude de la Médecine Expérimentale, il énonce que "Tous les mécanismes vitaux quelque variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un seul but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur". Ce principe de stabilité du milieu intérieur sera formulé par B.Cannon sous le nom d'homéostasie. L'homéostasie peut s'appliquer à différents niveaux : de l'organisme entier à l'unité cellulaire. Cette « sagesse du corps » est rendue possible par la mise en place d'équilibres dynamiques nécessitant stabilité et adaptabilité du système. Le « stress » qui menace cet équilibre peut venir de l'extérieur (conditions environnementales défavorables, infection) ou bien de l'intérieur (modification d'une constante physiologique). A l'état d'urgence, le maintien de l'homéostasie généralisée peut exiger la perte de l'homéostasie restreinte. En cas de perte de l'homéostasie, des désordres ou des maladies peuvent apparaître. La compréhension des mécanismes gouvernant le maintien de ces équilibres est donc une question fondamentale en biologie.

Chez les métazoaires, le système hématopoïétique occupe une place charnière dans l'organisme. En tant que sous-ensemble de cet organisme, il est soumis aux contraintes communes, et, de part sa fonction, il exerce un rôle important dans le maintien de l'homéostasie générale. La régulation de sa propre homéostasie est donc primordiale, voire vitale, pour l'organisme. En effet, les cellules hématopoïétiques sont des acteurs majeurs du système de défense, le système immunitaire. La genèse de ces cellules, ou hématopoïèse, est continuellement adaptée aux conditions environnementales. Un défaut dans ce système de production peut engendrer de nombreuses pathologies. Quels sont les mécanismes permettant à cet équilibre dynamique de se constituer ?

Le système hématopoïétique permet l'étude du renouvellement des cellules en contexte physiologique, et, en réponse à un stress. De manière intéressante, nous sommes aujourd'hui en mesure d'étudier les gènes contrôlant cette homéostasie. Nous avons choisi d'aborder cette problématique chez la Drosophile. Cet insecte est un modèle d'étude intéressant de par la conservation des voies de signalisations et des facteurs de transcription contrôlant l'hématopoïèse. Notre paradigme d'étude a porté sur la formation des "tumeurs mélanotiques" qui témoignent d'un déséquilibre dans la formation et/ou la fonction des cellules hématopoïétiques. L'utilisation du modèle drosophile présente, en outre, l'avantage de pouvoir adopter une stratégie intégrée pour

trouver des modulateurs de ce déséquilibre homéostatique. Nous avons donc entrepris la réalisation d'un crible génétique de perte de fonction, *in vivo*, afin de déceler de nouveaux gènes "suppresseurs de tumeurs" et, donc, potentiellement impliqués dans l'hématopoïèse et/ou la fonction des cellules hématopoïétiques.

Ce manuscrit présente les travaux réalisés durant ma thèse et qui s'inscrivent dans cette thématique. Dans un premier chapitre, je présenterai le modèle d'étude, la Drosophile, en décrivant l'hématopoïèse chez cet insecte. Nous aborderons ensuite brièvement la réaction immunitaire. Les "tumeurs mélanotiques" seront ensuite l'objet de toute notre attention. Dans un second chapitre, l'article scientifique associé à nos résultats sera présenté. Enfin, dans le troisième chapitre, j'exposerai les résultats supplémentaires obtenus au cours de ma thèse. L'ensemble des résultats obtenus sera aussi discuté dans cette dernière partie.



# ***-INTRODUCTION-***

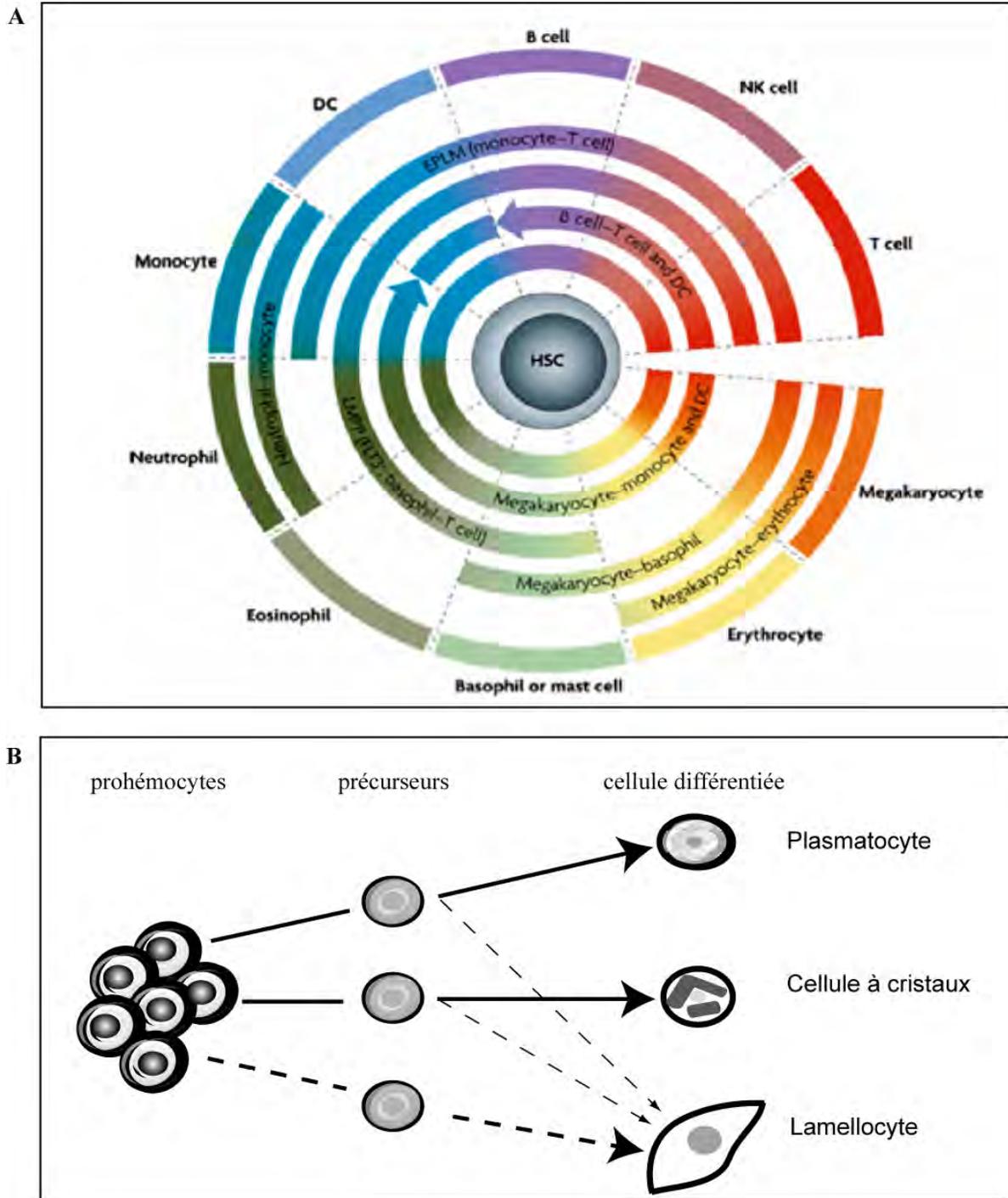


## I. HÉMATOPOÏÈSE CHEZ LA DROSOPHILE

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui assure le remplacement continu et régulé des différentes cellules hématopoïétiques. Chez la Drosophile, ces cellules sont regroupées sous le terme générique d'hémocytes. Les types cellulaires générés sont au nombre de trois : les plasmacytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes. Ils émergent à partir d'un groupe de prohémocytes ou progéniteurs qui subissent des phases de maturation. Une restriction de la compétence accompagne la restriction des capacités de division (*cf.* figure 1B). En comparaison, chez l'homme, les cellules du sang se regroupent en deux catégories, les globules blancs ou leucocytes et les globules rouges, qui se déclinent ensuite en une dizaine de types cellulaires comme illustré figure 1A. Les divers lignages sanguins sont générés à partir de cellules souches pluripotentes. Historiquement, ce processus était décrit comme linéaire et hiérarchisé entre des progéniteurs dont la compétence se restreignait tout d'abord à un lignage « rouge » ou « blanc » puis se réduisait encore au sein de chaque lignage. Néanmoins, aujourd'hui émerge un modèle plus complexe faisant appel à plus de plasticité cellulaire (*cf.* figure 1A.). La relative simplicité du modèle drosophilien est un de ces atouts pour la compréhension des mécanismes qui gouvernent sa mise en œuvre. Il apparaît aujourd'hui comme un modèle de choix pour l'étude de l'hématopoïèse en contexte normal (Evans et al., 2003; Krzemień et al., 2007) et même pathologique (Gobert et al., 2012).

Les hémocytes qui sont générés au cours de vagues successives, embryonnaire et larvaire, vont persister chez l'adulte (Holz et al., 2003). Lors de la première vague d'hématopoïèse, la régulation de ce processus relève surtout de la bonne exécution d'un programme génétique. Lors de la vie larvaire, en revanche, l'hématopoïèse est aussi bien dépendante de facteurs intrinsèques qu'exogènes. A ce stade, les lamellocytes peuvent être produits, en cas de challenge immun particulier. La formation de ce type cellulaire particulier illustre les différents niveaux de régulation possible de l'homéostasie des hémocytes.

FIGURE 1 : MODELE DE L'HEMATOPOÏSE CHEZ LES VERTEBRES ET LA DROSOPHILE



Modèles de l'hématopoïèse chez les vertébrés (A) et la Drosophile (B). A. Le modèle de l'hématopoïèse basé sur un continuum. Les relations de lignage entre les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les progéniteurs oligopotents sont représentés par des arcs. Ce modèle met en évidence les origines multiples des différents types cellulaires. Par exemple, les flèches pointent le fait que les cellules dendritiques (DC) peuvent dériver des progéniteurs mégacaryocytaire/monocytaire ou des progéniteurs des cellules B/T. EPLM, progéniteur précoce ayant un potentiel lymphoïde et myéloïde; FLT3, FMS related tyrosine kinase 3; PPSP, progéniteurs primaire lymphoïde multipotent. Cellules NK, cellules tueuses naturelle (adapté de Ceredig et al., 2009). B. Schéma de la hiérarchie hématopoïétique chez la Drosophile. Les cellules différenciées sont issues d'un pool de prohémocytes ou progéniteurs. Des précurseurs ont été identifiés pour les plasmatocytes et les cellules à cristaux. Le précurseur des lamellocytes n'étant pas connu, les flèches en pointillées illustrent les différents lignages possibles.

Dans ce chapitre, les différents types cellulaires seront présentés. Une description des mécanismes de régulation des vagues sera ensuite entreprise. L'accent sera mis sur l'hématopoïèse lors de la vie larvaire.

## A. LES TYPES CELLULAIRES

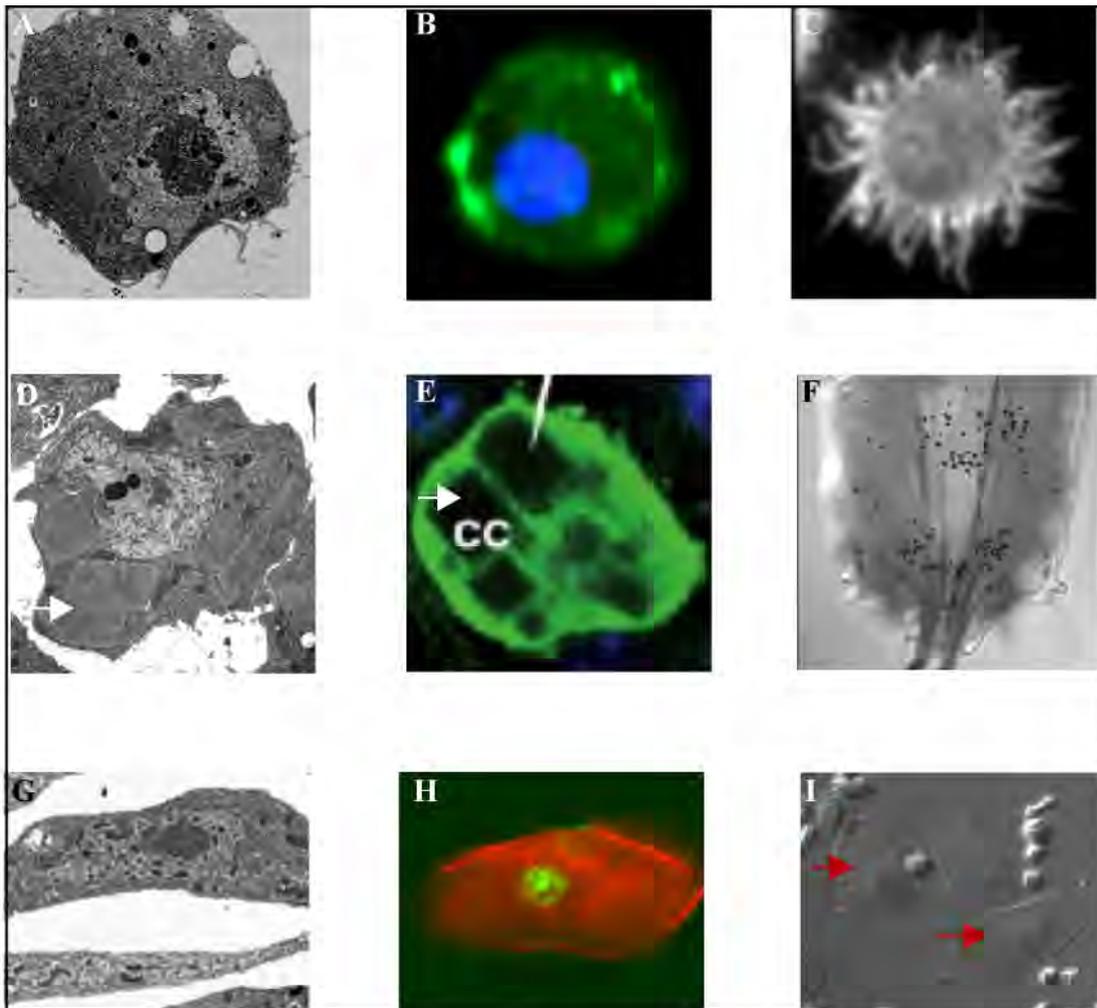
Chez *Drosophila melanogaster*, les trois principaux types de cellules sanguines qui ont été décrits assurent des fonctions immunitaires et non immunitaires. Les données bibliographiques suggérant une plus grande diversité seront présentées après une revue de leur fonctions et caractéristiques.

### 1. LES PLASMATOCYTES

Les plasmatoctes sont des cellules de 10 à 15  $\mu\text{m}$  caractérisés par la présence dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes et de phagosomes (*cf.* figure 2). Ils représentent environ 95% des hémocytes circulants aux stades embryonnaire et larvaire. Ils sont également détectés au stade adulte où ils représenteraient le seul type d'hémocyte persistant (Holz et al., 2003). Ces cellules sont des phagocytes apparentés aux macrophages (Meister and Lagueux, 2003; Lanot et al., 2001). Elles assurent des fonctions immunitaires et participent au développement.

Les plasmatoctes contribuent à la préservation de l'homéostasie tissulaire. Au cours du développement, ils phagocytent les corps apoptotiques (Franc et al., 1996; Kuraishi et al., 2009). Cette activité contribue à la morphogénèse du système nerveux central pendant l'embryogenèse (Franc et al., 1999; Sears et al., 2003). Lors de la métamorphose, ils participent aussi à l'élimination des tissus larvaires histolysés (Lanot et al., 2001). Néanmoins, l'importance de ce processus a longtemps été surestimée. En effet, il a été récemment démontré que des larves dépourvues d'hémocytes avaient la capacité de se développer jusqu'au stade adulte dans des conditions de laboratoire (Charroux and Royet, 2009; Defaye et al., 2009). Les plasmatoctes ont aussi la capacité de protéger l'organisme de l'invasion de cellules "cancéreuses". Ainsi il a été montré que les plasmatoctes sont recrutés au niveau de cellules tumorales et peuvent participer à l'élimination de ces cellules

FIGURE 2 LES HEMOCYTES



**A-C. Les plasmatocytes.** **A.** Des phagosomes sont présents dans leur cytoplasme. **B.** Plasmatocyte caractérisé par l'expression du marqueur P1 (vert). Le noyau est marqué par le DAPI (bleu). **C.** Plasmatocyte circulant obtenu par saignée d'une larve 24 heures après parasitisme. L'actine est visualisée en gris. (Williams 2007) **D-F Les cellules à cristaux.** Leur cytoplasme contient de larges inclusions para-cristallines (cc ; flèches blanches) renfermant les pro-enzymes et les substrats de la mélanisation. **D.** Ccx localisée dans la glande lymphatique. **E.** Ccx caractérisée par l'expression de la GFP sous le contrôle du pilote lozangeGal4 (vert). **F.** Visualisation in vivo des Ccx mélanisées à travers la cuticule de la région postérieure d'une larve de troisième stade larvaire. La mélanisation des cellules est obtenue après avoir exposé les larves 10 minutes à 60°C. **G-I Les lamellocytes.** **H,** Lamellocyte caractérisé par le marqueur  $\alpha$ PS4 (rouge). Le noyau est marqué par le DAPI (vert). **I.** Hémocytes circulants obtenu par saignée d'une larve 24 heures après parasitisme. Les flèches rouges pointent sur les lamellocytes. **A,D,G.** Hémocytes (localisés dans l'organe hématopoïétique) visualisés par microscopie électronique à transmission (Meister et Lagueux, et al; 2003). **B,E,H.** Immunodétection sur des hémocytes circulants. **G,H,I.** Hémocytes « activés ». **G** et **I,** Après un challenge immun. **H,** induction artificielle de la mélanisation.

(Pastor-Pareja et al., 2008). La capacité des plasmatoctes à produire et déposer des constituants de la matrice extracellulaire comme la Tigrine (Fogerty et al., 1994), la Peroxydase (Pxn) (Nelson et al., 1994), ou encore le collagène Cg25C (Paladi and Tepass, 2004), serait également importante pour le remodelage tissulaire du système nerveux central (Olofsson and Page, 2005) et/ou la morphogenèse des tubules de Malpighi (Bunt et al., 2010).

Les plasmatoctes jouent également un rôle primordial dans la défense de l'organisme. Ce sont des phagocytes professionnels. Les adultes succombent plus facilement à des infections par des petits pathogènes comme les bactéries ou les champignons qui persistent dans l'organisme, en absence de phagocytose (Charroux and Royet, 2009; Defaye et al., 2009). Les plasmatoctes ont la capacité de protéger l'organisme non seulement de l'intrusion de corps étrangers mais aussi de l'invasion de cellules "cancéreuses". Ainsi il a été montré que les plasmatoctes sont recrutés au niveau de cellules tumorales et peuvent soit participer à l'élimination de ces cellules soit promouvoir leur croissance et le développement de métastase (Pastor-Pareja et al., 2008) (Cordero et al., 2010).

## 2. LES CELLULES À CRISTAUX

Les cellules à cristaux (*cf.* figure 2) sont des cellules présentant dans leur cytoplasme des inclusions cristallines à l'origine de leur nom (Lanot et al., 2001). Cette population minoritaire ( $\pm 5\%$  des hémocytes) est présente aux stades embryonnaire et larvaire mais ne serait pas maintenue au stade adulte. Il est important de noter que bien que ces cellules soient générées dès l'embryogenèse aucun rôle n'a pu leur être attribué à ce stade. Durant la vie larvaire les cellules à cristaux participent aux réactions de défenses immunitaires et au maintien de l'intégrité de l'organisme.

Les cellules à cristaux produisent des prophénoloxydases, les enzymes nécessaires à la réaction de mélanisation, une réaction de défense spécifique aux insectes (pour revue: (Cerenius et al., 2010)). L'activation des phénoloxydases au sein même des cellules à cristaux peut être artificiellement déclenché par simple chauffage de la larve comme illustré figure 2 (RIZKI and RIZKI, 1959). Les cellules à cristaux sont également requises au site de cicatrisation afin d'assurer la mélanisation du caillot sanguin. La consistance de ce dernier est primordiale car elle est garante de l'étanchéité de cette barrière

physique (Bidla et al., 2007).

### 3. LES LAMELLOCYTES

Les lamellocytes (*cf.* figure 2) sont des cellules de grande taille (40 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre). Ce type cellulaire présente la particularité d'être induit uniquement au stade larvaire où il va assurer une fonction strictement immunitaire.

Les lamellocytes qui sont rares en condition « normale » sont massivement générés en réponse à un parasitisme par la guêpe *Leptopilina boulardi*, un hyménoptère endoparasitoïde avirulent qui pond ses œufs à l'intérieur de l'hémocoèle des larves de *Drosophile* (Lanot et al., 2001). Les lamellocytes ont la capacité d'encapsuler les objets trop gros pour être phagocytés par les plasmatoctes comme les œufs de guêpe. Ils s'agrègent autour du parasite en formant des couches successives de cellules afin de l'isoler et de le neutraliser. Cette réaction sera décrite plus en détail dans le chapitre II.

### 4. UN OU D'AUTRE(S) TYPE(S) CELLULAIRE(S) ?

Les 3 types cellulaires décrits ci-dessus sont classés sur la base de critères morphologiques, fonctionnels et moléculaires. Néanmoins, la situation pourrait être plus complexe. Dans les années 80, Rizki et Rizki ont largement documenté les différentes morphologies des cellules circulantes par des études de microscopie électronique. L'état de maturation des hémocytes est reflété par la taille croissante du cytoplasme (les progéniteurs ayant un ratio nucléo/cytoplasmique élevé). Leurs études les ont conduits à proposer que les lamellocytes seraient issus des plasmatoctes dans la mesure où il est possible d'observer des cellules avec des caractéristiques morphologiques intermédiaires entre ces deux populations. Les auteurs ont par ailleurs documenté que les capacités d'adhésion des plasmatoctes augmentent à la pupaison ce qui pourrait accroître leur compétence à phagocyter les nombreux tissus histolysés à ce stade.

Plus récemment, Vilmos et al. ont généré des anticorps monoclonaux qui permettent non seulement d'identifier les trois populations classiquement décrites mais également des sous populations au sein de chaque groupe (Vilmos et al., 2004). Ils ont également mis en évidence que la protéine de surface hémolectine (HML) est commune aux lignages des plasmatoctes et des cellules à cristaux mais ne permet pas de recouvrir totalement ces deux populations.

L'exemple le plus intrigant est la capacité des plasmacytes à exprimer potentiellement 18.000 variants de la protéine Dscam impliquée dans la phagocytose des bactéries *ex vivo* (Watson et al., 2005). L'expression de ces variants d'épissage par des sous populations spécifiques de plasmacytes permettrait de générer une diversité bien plus importante que celle imaginée jusqu'à présent. L'implication de cette hétérogénéité sur la réponse immunitaire sera discutée dans le chapitre II.

Des études plus approfondies sont nécessaires afin d'identifier davantage de marqueurs et de les lier soit à une fonction précise soit à un état de maturation/différenciation à l'instar de ce qui a été réalisé chez les vertébrés.

## B. LES VAGUES D'HÉMATOPOÏÈSE

### 1. L'HÉMATOPOÏÈSE EMBRYONNAIRE

#### a) ONTOGENESE

Pendant l'embryogenèse, les progéniteurs hématopoïétiques sont spécifiés au stade blastoderme à partir d'un territoire du mésoderme pro-céphalique (Rehorn et al., 1996; Holz et al., 2003). Lors de la gastrulation, la différenciation des progéniteurs est couplée à leur migration au niveau de la tête de l'embryon (*cf.* figure 3). Les  $\pm 80$  précurseurs spécifiés au stade 5 prolifèrent durant les stades 8-11 pour aboutir à la formation de 700 plasmacytes et de 30 cellules à cristaux. La ségrégation de ces deux lignages s'opère au stade 10 (Bataillé et al., 2005). Les cellules à cristaux persistent au niveau du proventricule, réparties en deux groupes bilatéraux, alors que les plasmacytes colonisent tout l'embryon (Lebestky et al., 2000). Ces cellules migrent dans l'embryon suivant des voies stéréotypées dépendantes du système de guidance PVR/PVF qui participe aussi à la survie des plasmacytes (Cho et al., 2002; Brückner et al., 2004).

L'hématopoïèse embryonnaire apparaît comme un processus stéréotypé aboutissant à la production d'un nombre assez constant d'hémocytes répartis en deux populations selon un ratio prédéfini. La stabilité de ce ratio nécessite une régulation génique très fine qui met en balance des facteurs de transcription (Waltzer et al., 2010). De façon intéressante, des travaux ont mis en évidence que les progéniteurs hématopoïétiques sont bipotents (*i.e.* capables de se différencier aussi bien en plasmacytes qu'en cellules

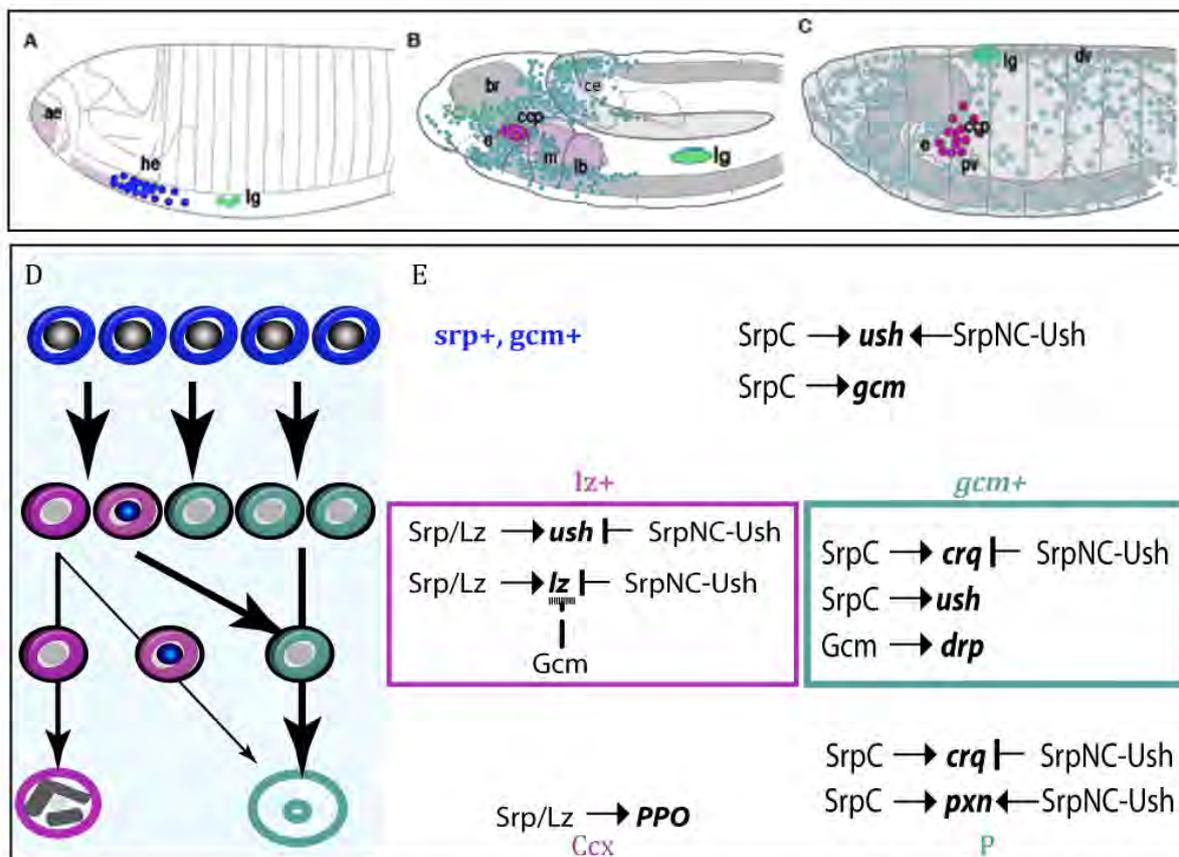
à cristaux) et qu'il est possible de moduler leur engagement vers destin plasmacyte ou cellule à cristaux (Bataillé et al., 2005). Néanmoins, cette plasticité/bipotentialité n'a pu être révélée que dans des contextes génétiques particuliers, et il reste à démontrer qu'elle est à l'œuvre dans des conditions physiologiques particulières, le niveau de différenciation terminal des plasmacytes peut être modulé dans des contextes génétiques où le nombre de corps apoptotiques est augmenté (Paladi and Tepass, 2004). Il est alors possible d'observer 100 % de plasmacytes présentant une activité phagocytaire contre 80% dans un contexte normal. Cependant, jusqu'à présent, il n'a pu être mis en évidence une influence de facteurs environnementaux sur le nombre total de cellules produites ou leur proportion.

#### a) REGULATION GENIQUE

*serpent* (*srp*), qui code pour un facteur de transcription la famille GATA, est un acteur clé de l'hématopoïèse embryonnaire. Au stade 5, il spécifie la région d'émergence des précurseurs hématopoïétiques (Rehorn et al., 1996). Son expression est ensuite maintenue dans tous les hémocytes à toutes les phases de leur développement. Ce facteur joue également un rôle dans la maintenance des pro-hémocytes, leur spécification et leur différenciation terminale (Lebestky et al., 2000; Lebestky et al., 2003). Les facteurs de transcription *glial cell missing* et *glial cell missing2* (*gcm*) sont requis de manière redondante pour la différenciation des plasmacytes (Kammerer and Giangrande, 2001; Alfonso and Jones, 2002). Le facteur *lozenge* (*lz*), de la famille des RUNX, est nécessaire pour la spécification des précurseurs des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000; Waltzer et al., 2003; Bataillé et al., 2005).

Un jeu de régulations croisées s'instaure entre ces différents facteurs pour la régulation de l'hématopoïèse (*cf.* figure 3). *Serpent* contrôle l'expression de *gcm/gcm2* et de son cofacteur *ush* appartenant à la famille des FOG (Friend Of GATA). Son interaction avec *Ush* est conditionnée par la présence d'un doigt de zinc N terminal, généré lors d'un épissage alternatif (Waltzer et al., 2002). L'équilibre entre les deux isoformes de *Srp* (*SrpNC* et *SrpC*) contribue à la régulation de l'hématopoïèse. Ainsi, lors de la différenciation des plasmacytes, *Srp* active l'expression du marqueur de différenciation *croquemort* alors que le couple *Srp/Ush* la réprime (Fossett et al., 2003; Fossett and Schulz, 2001).

FIGURE 3 : HEMATOPOÏÈSE EMBRYONNAIRE



**A-C.** Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire et ontogenèse de la glande lymphatique (lg). he, pro-hémocytes ; ce, cerveau ; e, esophage ; ae, endoderm antérieur ; lb, segment labial; m, segment maxillaire; pv, proventricule ; dv, vaisseau dorsal ; ccp, précurseurs des cellules à cristaux. A. Embryon de stade 5 dans lequel le groupe pro-hémocytes (he, bleu) est visible au niveau du mésoderme antérieur. Les précurseurs de la glande lymphatique (lg, vert) sont localisés ventralement. B. Embryon de stade 11. Les précurseurs des cellules à cristaux (mauve) restent localisés au niveau de la tête de l'embryon alors que les plasmatocytes (bleu-vert) commencent leur dispersion. Les précurseurs de la glande lymphatiques (vert) entament leur migration du mésoderme du tronc latéral-ventral. C. Embryon de stade 17. Les plasmatocytes sont totalement dispersés. La glande lymphatique primitive est maintenant localisée le long du vaisseau dorsal (dv). (D'après Lebestky *et al* ; 2000) **D-E.** Contrôle moléculaire de l'hématopoïèse embryonnaire. Au Stade 5, dans tous les pro-hémocytes (*srp+*, *gcm+* ; en bleu) Srp contrôle l'expression de *gcm* et de *ush*. Au Stade 7, dans les premiers rang d'hémocytes (*lz+*) en mauve, la transcription de *gcm* est inhibée et celle de *lz* activée. L'initiation du programme plasmatocyte a lieu dans les progéniteurs *gcm+* (en bleu vert). Au stade 10, la ségrégation des lignages s'opère. Les progéniteurs qui maintiennent l'expression de *lz* (mauve) deviennent des Ccx. Les régulations géniques sont précisées dans le cadre mauve (*lz+*). Les progéniteurs dans lesquels l'expression de *lz* n'est pas maintenue adoptent le destin P. Les progéniteurs *gcm+* continuent leur différenciation en P. Les régulations géniques sont précisées dans le cadre bleu-vert (*gcm+*). Aux stades suivants, le programme de différenciation est exécuté dans les P et les Ccx. Pour plus de détails, cf. texte. (D'après Bataille *et al* ; 2005)

Parallèlement, ce couple réprime le destin cellules à cristaux. De plus, les deux isoformes de Srp agissent en synergie avec Lz pour induire le programme de différenciation des cellules à cristaux. Enfin, le couple Srp/Lz permet de réprimer l'expression de *ush* (Waltzer et al., 2003; Ferjoux et al., 2007; Muratoglu et al., 2007).

Le processus de ségrégation entre les deux lignages hématopoïétiques fait appel à une régulation croisée des facteurs lignages spécifiques Gcm et Lz (cf. figure 3). *Gcm* est initialement exprimé dans tous les prohématocytes puis seulement maintenu dans les précurseurs des plasmacytes. La répression de *gcm* dans les précurseurs des cellules à cristaux, situés au niveau de la première rangée antérieure de cellules, est nécessaire afin que celle de *lozenge* puisse être initiée. 60 % de cette population va maintenir l'expression de *lozenge* et se différencier en cellules à cristaux. Pour les 40 % restant, l'équilibre n'est pas renversé et, l'expression de *lozenge* n'étant pas maintenue, les cellules deviennent des plasmacytes (Bataillé et al., 2005).

## 2. HÉMATOPOÏÈSES CHEZ LA LARVE

Pendant la vie larvaire, les cellules hématopoïétiques sont réparties dans des « compartiments ». Cette localisation est le reflet de leur origine développementale. Les cellules d'origine larvaire sont produites au sein d'un organe hématopoïétique, la glande lymphatique. Nous allons en détailler le développement avant de nous intéresser aux cellules d'origines embryonnaires qui se répartissent entre la circulation et des sites d'ancrage nommés sessiles.

### a) LA GLANDE LYMPHATIQUE

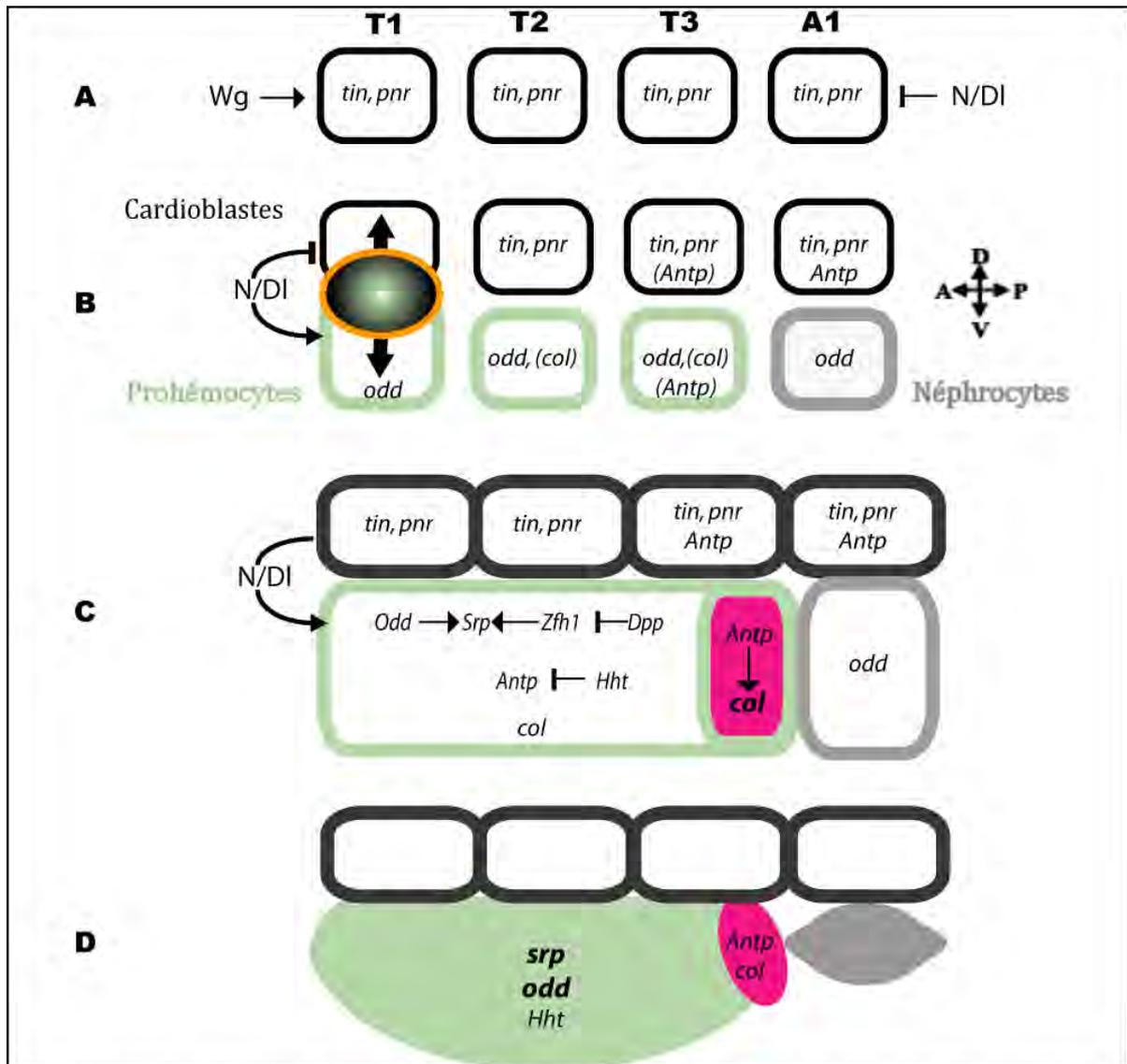
#### (1) Ontogenèse

La glande lymphatique est en relation étroite avec le vaisseau dorsal. Les hémocytes de la glande lymphatique dérivent d'une sous-région du mésoderme latéral thoracique identifiée par des expériences de transplantations homo et hétérotypiques réalisées par Holz au stade blastoderme (Holz et al., 2003). De cette région est issu le mésoderme cardiogénique à l'origine de la glande lymphatique et du tube cardiaque constitué de cardiomyocytes (à activité contractile) et de cellules péricardiaques (ou néphrocytes) (Rugendorff et al., 1994). Le lien physique qui unit ces tissus est doublé d'une origine

développementale commune illustrée par la démonstration de l'existence d'un progéniteur commun aux systèmes vasculaire et sanguin : l'hémangioblaste (Mandal et al., 2004). Contrairement au hémocytes embryonnaires, les précurseurs de la glande lymphatique ne sont pas spécifiés avant la deuxième mitose post blastoderme (Holz et al., 2003). Au stade 11, les précurseurs de la glande lymphatique qui peuvent être visualisés par l'expression du facteur de transcription Collier/Knot sont répartis en trois groupes de cellules qui vont migrer dorsalement à partir des segments thoraciques T1, T2 et T3 (Mandal et al., 2007). Leur coalescence permet la constitution du primordium de la glande lymphatique composée de deux groupes bilatéraux localisés le long du vaisseau dorsal ou tube cardiaque (*cf.* figure 3, cellules vertes) (Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007). Les régulations géniques relatives à ces événements sont précisées dans la figure 4.

La vingtaine de prohémocytes qui constituent ce primordium en fin d'embryogenèse vont continuer de proliférer durant les stades larvaires L1, et L2 (Jung et al., 2005). Durant cette phase de croissance, un changement morphologique s'opère dans les lobes antérieurs constituant alors la glande lymphatique : les hémocytes jusqu'alors compactées en forme de « balle » vont d'étirer davantage. En début de L2, les lobes postérieurs vont se constituer (Sellin et al., 2006; Kalamarz et al., 2012). Au stade L3, les lobes antérieurs sont régionalisés en trois zones : la zone médullaire constituée de prohémocytes considérés comme quiescents, la zone corticale où les progéniteurs se différencient en hémocytes et prolifèrent et le PSC (Posterior Signaling Center) qui est un centre « signalisateur » jouant un rôle dans l'homéostasie des zones précitées (Jung et al., 2005; Mandal et al., 2007; Krzemień et al., 2007). Les zones corticale et médullaire se distinguent morphologiquement, la première étant compactée et la seconde ayant un aspect granuleux. Les lobes secondaires sont principalement constitués de prohémocytes. Une minorité d'hémocytes de ces lobes secondaires présentent des marqueurs de maturation avancés mais leur répartition globale ne semble pas soumise à une organisation topologique (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010). A la métamorphose, les hémocytes de la zone corticale quittent en premier l'organe hématopoïétique après avoir parachever leur maturation en plasmacytes et cellules à cristaux, principalement. Les prohémocytes de la zone médullaire quittent l'organe après une étape de différenciation en tant que précurseurs de plasmacytes. Les cellules du PSC se dispersent parmi les hémocytes des lobes primaires avant qu'ils

FIGURE 4 : ONTOGENESE DE LA GL (1)



A. Le mésoderme cardiogénique émerge à partir de groupes de précurseurs (rectangles noirs) qui migrent dorsalement et sont localisés dans les segments thoraciques et abdominaux. Entre les stades 8 et 10, ces précurseurs expriment les facteurs de transcription tinman (Tin) et pannier (Pnr). La spécification du mésoderme cardiogénique requiert l'activité concertée des voies Notch-Delta (N-DI) et Wingless (Wg). B. Les progéniteurs du mésoderme cardiogénique sont à l'origine de la glande lymphatique, du tube cardiaque et des néphrocytes. Entre les stades 11 et 13, les progéniteurs qui maintiennent l'expression de tin et pnr deviennent des cardiomyocytes (rectangles noirs). Les progéniteurs situés les plus latéralement activent le gène odd-skipped (odd). Ceux des segments T1 à T3 sont les progéniteurs de la glande lymphatique (rectangles verts). Ces deux derniers lignages (cardiomyocytes et prohémocytes) peuvent émerger à partir d'un précurseur commun nommé hémangioblaste (schématisé par un cercle orange) Un rôle tardif de Notch-Delta a été démontré dans la spécification de la glande lymphatique au détriment des cardioblastes. Les progéniteurs odd+ du segment abdominal sont les progéniteurs des néphrocytes (rectangles gris). Au stade 11, l'expression de collier (col) est détectée dans des cellules des segments T2 et T3 alors que celle d'Antennapedia (Antp) est restreinte aux cellules les plus postérieures du segment T3 et au segment A1. Les axes dorso-ventral et antéro-postérieur sont schématisés. C. Au stade 13, les groupes de cellules des différents segments coalescent pour former le vaisseau dorsal et le primordium de la glande lymphatique. A partir du stade 15, le nombre de prohémocytes exprimant serpent (srp) est positivement régulé par la voie Notch et le facteur de transcription zfh1. La voie Dpp permet de limiter ce nombre via son action inhibitrice sur l'expression de zfh1. Dans les prohémocytes, l'expression de col diminue et celle d'Antp est inhibée par Homeothorax (Hht). En revanche, col reste fortement transcrit dans les cellules du PSC spécifiée par l'expression d'Antp. D. En fin d'embryogenèse, toutes les cellules de la glande lymphatique expriment srp et odd (en gras). La vintgène de prohémocytes qui constituent les lobes de la glande expriment Hht. Dans le PSC, Antp contrôle l'expression de col. Le schéma a été inspiré par les travaux suivants : [Crozatier 2004] [Mandal 2004] [Mandal 2007] [Frandsen 2008].

n'atteignent tous la circulation. Dans les lobes secondaires, une dernière phase d'expansion précède la maturation des prohémyocytes en précurseurs ensuite libérés dans l'hémolymphe (*cf.* figure 5) (Grigorian et al., 2011).

## **(2) Hématopoïèse dans la GL : de la cellule souche à l'hémocyte différencié**

### **(a) Des cellules souches...transitoires**

La glande lymphatique est un site d'hématopoïèse. Diverses études ont été menées afin de caractériser les différentes populations cellulaires générées séquentiellement au sein de cet organe. Les trois lignages sanguins sont produits à partir d'une population cellulaire restreinte et hétérogène. Pendant l'embryogenèse, parmi les premiers hémocytes spécifiés ou prohémyocytes émergeraient des cellules souches. Leur présence a été proposée grâce à une analyse clonale permettant de marquer génétiquement les cellules filles d'un hémocyte afin d'en suivre le devenir au stade L3 (Minakhina and Steward, 2010). L'existence d'hémocytes capables de former des clones dits « persistants » a été démontrée. Ces clones sont caractérisés par une taille importante (10 à 30 % des cellules totales du lobe primaire) et constitués de cellules cohésives à différents stades de maturation. Cette étude a permis de mettre à jour que parmi les hémocytes du primordium embryonnaire étaient formées des cellules ayant une certaine capacité d'auto-renouvellement en complément d'une bipotentialité (la capacité à devenir aussi bien des plasmacytes que des cellules à cristaux). Néanmoins, sur la base du critère d'auto-renouvellement la présence de ces cellules se limite aux stades embryonnaire et L1. Au stade L3, la recherche de marqueurs de division asymétrique ou de longévité du cycle cellulaire, autres caractéristiques des cellules souches, ne permet pas de conclure à leur présence (Krzemien et al., 2010). La présence des cellules souches hématopoïétiques serait donc transitoire pendant le développement.

### **(b) Une population de prohémyocytes hétérogène et engagée**

Parmi les prohémyocytes produits durant l'embryogenèse, on observe une hétérogénéité en termes de capacité de division. Durant les premières 45 heures de développement de

l'organe hématopoïétique, les prohémyocytes peuvent être classés selon la taille du clone qu'ils sont à même d'engendrer. Outre les clones « persistants », des clones dits « transitoires » contenant entre 20 et 100 cellules ou moins de 20 cellules filles ont été détectés (Minakhina and Steward, 2010). En parallèle d'une prolifération active, les prohémyocytes arrivent à maturation et expriment de nouveaux gènes tel que *hemese* dès la phase L1 ou encore *domeless* (*dome*) en L2 (Jung et al., 2005). Cependant les niveaux d'expression de *dome* (visualisées à l'aide de l'insertion d'un élément P *Gal4* dans le gène *dome*) sont variables parmi les prohémyocytes et une petite proportion d'entre eux ne semble pas exprimer ce gène. Cette population de prohémyocytes *dome* négative persiste en L3 (Jung et al., 2005; Kalamarz et al., 2012). Des expériences de traçage ont permis de suivre le destin des prohémyocytes *dome* positifs. Une fraction d'entre eux reste *domeless* positifs et constitue la zone médullaire; l'autre fraction éteint l'expression de *dome*, entre en différenciation et donne naissance à la zone corticale (Jung et al., 2005).

A la transition L2/L3 l'index mitotique des prohémyocytes diminue, ce qui témoigne d'un ralentissement voire d'un arrêt du cycle cellulaire (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010; Mandal et al., 2007). Les prohémyocytes sont donc considérés comme des progéniteurs hématopoïétiques quiescents. En L3, ils expriment de nouveaux marqueurs tel que *latran*, ou encore *tepIV* (*Thioester-containing protein 4*) (Makki et al., 2010; Benmimoun et al., 2012). Cette population reste hétérogène en termes d'expression génique. Le facteur de transcription Chinmo présente par exemple un patron « poivre et sel » (Flaherty et al., 2010). Des données plus récentes montrent que les prohémyocytes peuvent être subdivisés en trois groupes selon leur niveau d'expression des marqueurs *dome* et *ZCL2897* (Kalamarz et al., 2012). Néanmoins, aucun lien n'a été établi entre cette variabilité et une fonction ou un choix de destin particulier. La seule observation consistante/factuelle est que la diminution de l'expression de *dome* qui s'accompagne d'une co-expression d'un marqueur de différenciation permet de visualiser une population de cellules en transition du stade progéniteur vers le stade différencié (Krzemien et al., 2010; Sinenko et al., 2009).

Les premiers marqueurs de différenciation (*pvr* et *hml*) apparaissent au stade L2 dans les hémocytes qui vont constituer la zone corticale (Jung et al., 2005; Mandal et al., 2011). Ces hémocytes seraient des progéniteurs intermédiaires décrits comme n'exprimant ni les marqueurs de la ZM ni ceux de différenciation terminale (Krzemien et

al., 2010). Les progéniteurs intermédiaires prolifèrent et seraient responsables de l'expansion de la ZC (zone corticale) (Sinenko et al., 2009; Kalamarz et al., 2012). Ces progéniteurs s'engagent ensuite dans un destin plasmacytes ou cellules à cristaux: les précurseurs de chaque type cellulaire vont induire séquentiellement des marqueurs de maturation (*cf.* figure 5). Les hémocytes complètement matures expriment P1 pour les plasmacytes et PPO pour les cellules à cristaux. En termes de morphologie cellulaire, si les cellules à cristaux sont repérables par leurs inclusions cristallines, la distinction n'est pas aisée concernant les plasmacytes matures. De rares lamellocytes, identifiables par leur taille et l'expression de marqueurs de différenciation spécifiques sont produits, mais leurs précurseurs ne sont pas identifiés.

### (c) Lignage et différenciation

Les prohémocytes quiescents pendant les stades larvaires deviennent des précurseurs de plasmacytes à la métamorphose (Grigorian et al., 2011). En revanche, en L2, ceux qui entrent en différenciation deviennent des plasmacytes ou des cellules à cristaux dans des proportions qui, bien que variables, restent en faveur des plasmacytes. Cependant, en cas de parasitisme des larves au stade L2, les prohémocytes de la glande lymphatique entrent tous en différenciation. Ils s'engagent alors majoritairement vers le destin lamellocytes, forment quelques plasmacytes et pas de cellules à cristaux (Krzemien et al., 2010; Lanot et al., 2001).

#### (i) *En contexte « normal »*

Les trois types cellulaires sont produits à partir d'un même groupe de prohémocytes présents dans le primordium de la glande lymphatique mais le sont-ils à partir de prohémocytes multipotents ? D'après des expériences de lignages qui ont été réalisées, les clones issus de la division d'un prohémocytes tracé à partir des stades embryonnaire ou L1, contiennent, en L3, aussi bien des plasmacytes que des cellules à cristaux (Krzemien et al., 2010; Minakhina and Steward, 2010). Pendant ces phases, les prohémocytes sont donc bipotents. En revanche, à partir du stade L2, les hémocytes tracés génèrent des clones mitotiques uniques en termes de type cellulaire. Une restriction de potentialité s'opère donc à partir de ce stade. Les progéniteurs qui s'engagent dans la différenciation seraient donc déjà engagés dans un destin.

Néanmoins, à ce stade une fraction des prohémostocytes ne se différenciant pas, cette méthodologie n'est pas en mesure d'évaluer avec exactitude leur potentialité.

#### (a) Les plasmacytes

Peu de gènes ont été spécifiquement impliqués dans la différenciation du lignage plasmacyte dont les différentes étapes de maturation sont répertoriées par l'induction séquentiel de marqueurs (*cf.* figure 5). En l'absence de *pvr*, qui est un des premiers marqueurs des plasmacytes, les marqueurs de maturation consécutifs *pxn* et P1 ne sont pas exprimés. Ce gène est donc requis précocement dans le processus de différenciation des plasmacytes (Jung et al., 2005). L'étape de différenciation terminale, matérialisée par l'expression de P1, est également promue par le facteur de transcription membre de la famille GATA, Pannier (Minakhina et al., 2011). Par ailleurs, leur maturation peut être stoppée par la surexpression du cofacteur de Pannier U-shaped dans des précurseurs Cg positifs (Gao et al., 2009).

#### (b) Les cellules à cristaux

Comme lors de l'hématopoïèse embryonnaire, le facteur de transcription *Lz* (Lozange) est nécessaire et suffisant à la spécification des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000). Son expression est initiée et maintenue grâce à une activation continue de la voie Notch (Lebestky et al., 2003; Mukherjee et al., 2011). L'initiation de *lz* dans les hémocytes *Hml+* est dépendante d'une activation canonique de la voie qui passe par une interaction entre le récepteur Notch (dans sa forme entière et transmembranaire) et le ligand *Ser* (Serrate). Les cellules activant Notch et celles exprimant *Ser* étant mutuellement exclusives, Lebestky et ses collaborateurs, proposent que les cellules *Ser+* soient des cellules « signalisatrices » permettant l'induction du destin CCx. Le maintien de *lz* est assuré par une activation non canonique de la voie Notch, indépendante de son lignage, qui nécessite l'internalisation de Notch « activé » dans des endosomes précoces (Mukherjee et al., 2011). Cette signalisation implique le complexe Notch (domaine intracellulaire)/Sima/Su(H). Sima est l'orthologue de  $Hif\alpha$  chez les vertébrés, un facteur clé de la réponse à l'hypoxie. L'hypoxie n'est cependant pas déclenchée dans ces cellules pendant leur différenciation (Bacon et al., 1998). En revanche, une baisse d'oxygène dans l'environnement influe sur le nombre de CCx en activant ce facteur. Par ailleurs, il a été montré que dans un mutant du gène *asrij*, (qui code pour une protéine

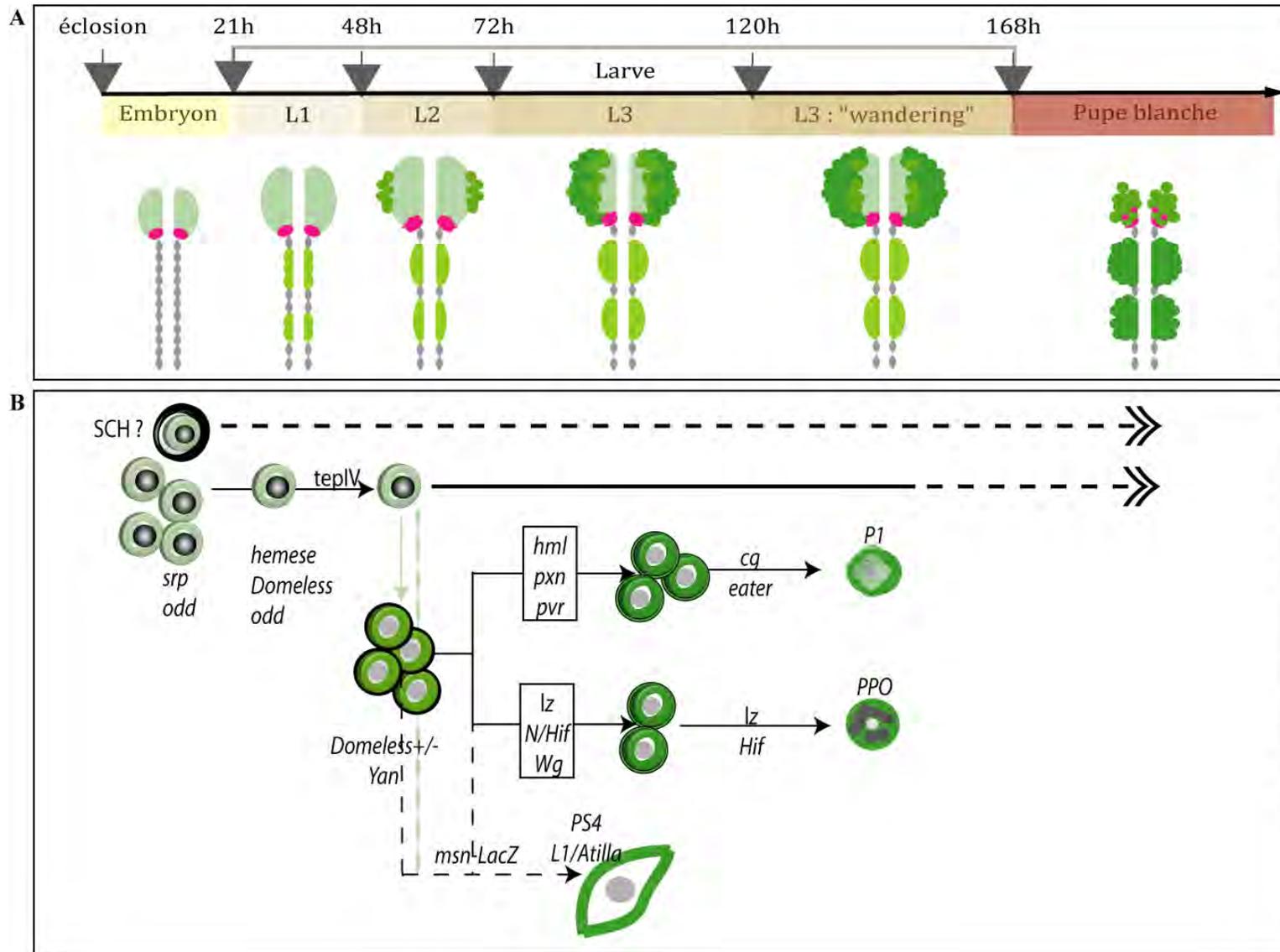
endocytique conservée) la relocalisation de Notch (domaine intracellulaire) dans des endosomes précoces coïncide avec une augmentation drastique du nombre de cellules *lz+* dans toute la glande lymphatique. Ce phénotype, qui corrobore l'étude précédemment citée, suggère que *asrij* puisse intervenir dans la restriction du nombre de CCx en contrôlant le trafic intracellulaire de Notch (Kulkarni et al., 2011).

***(i) La spécification des  
lamellocytes : un peu d'immunité  
avant l'heure !***

La différenciation des lamellocytes est induite par un contexte immunitaire spécifique : l'infection au cours du stade L2 des larves par des guêpes endoparasites (*cf.* chapitre II). La glande lymphatique a été dépeinte comme le pourvoyeur de lamellocytes (Lanot et al., 2001). Six heures après une infection, la prolifération se fait plus importante au sein de cet organe (Krzemien, 2009). Dans les 24 heures qui suivent, les hémocytes des lobes primaires et secondaires se différencient préférentiellement en lamellocytes (Krzemien et al., 2010; Makki et al., 2010) . A partir de cette étape, les hémocytes sont libérés et, 48 heures après, de nombreux lamellocytes sont présents dans la circulation. Un décalage est observé entre les lobes primaires et secondaires concernant l'induction du programme de différenciation et la libération des hémocytes (Lanot et al., 2001; Crozatier et al., 2004).

Au stade L2, les quelques progéniteurs qui mûrissent sont déjà engagés dans un destin et ne participeraient donc pas à la production de lamellocytes. Les prohémocytes *domeGal4+* constituent la population dominante dans les lobes primaires et secondaires. Parmi ces prohémocytes se trouveraient les précurseurs des lamellocytes. Dans un contexte de perte de fonction pour *collier* où les prohémocytes ne persistent pas, les lamellocytes ne sont pas formés après parasitisme (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007). Ainsi le maintien d'un groupe de prohémocytes multipotents semble prérequis pour la différenciation en lamellocytes et la réponse d'encapsulation. Normalement, la population de prohémocytes adopte un destin plasmatocte ou cellules à cristaux à la métamorphose. En cas de challenge immun particulier les prohémocytes sont à même de s'orienter vers un lignage majoritairement lamellocyte. L'induction de ce destin révèle donc une autre potentialité de ces prohémocytes. De plus, en condition

FIGURE 5 : LA GL, ONTOGENESE (2) ET HEMATOPOÏESE



**A. Représentation schématique du développement de l'organe hématopoïétique.** Les stades développementaux sont notés dans les rectangles. Les flèches indiquent les durées des phases de développement, de l'éclosion à la pupaison, à une température de 25°C. le PSC est en rose. L'intensité de la couleur verte représente l'état de maturité des hémocytes : du vert très clair (prohémocytes) au vert foncé (hémocyte différencié). **B. Hématopoïèse dans l'organe hématopoïétique.** Les marqueurs moléculaires des types cellulaires sont indiqués. SCH, cellule souche hématopoïétique. Pour plus de détails cf. texte.

de parasitisme, il a été montré que le destin lamellocytes est favorisé au détriment du destin cellules à cristaux qui se trouvent être très peu nombreuses dans ces conditions (Crozatier et al., 2004; Krzemien et al., 2010). Sur la base de ces observations, l'existence d'un précurseur commun entre ces deux lignages a été postulée. Cette hypothèse est étayée par l'existence de cellules co-exprimant les marqueurs de cellules à cristaux et de lamellocytes (Sinenko et al., 2004).

On peut noter que la compétence des hémocytes à devenir des lamellocytes serait aussi régulée pendant le développement par l'hormone contrôlant les mues larvaires, l'ecdysone. Diminuer le niveau de cette molécule signalisatrice ou entraver la réception de ce signal dans les hémocytes inhibe l'augmentation de la prolifération et la différenciation en lamellocytes qui a lieu dans la glande lymphatique après un challenge immun (Sorrentino et al., 2002).

L'induction du programme lamellocyte nécessiterait un signal « instructeur » qui permettrait à la majorité des prohémocytes d'entrer précocement en différenciation en favorisant ce destin (Crozatier et al., 2004). Ainsi, l'induction de la différenciation et l'instruction du destin seraient coordonnées afin de produire les types cellulaires adaptés à l'environnement. Quelques gènes ont été décrits pour moduler ces deux aspects. Sans parasitisme, dans des mutants de perte de fonction pour *ush*, *PTEN* (un acteur de la voie TOR/IIS), *Bam* et *mir-7*, une réduction drastique de la population de prohémocytes s'accompagne d'une différenciation des hémocytes en plasmacytes, cellules à cristaux et lamellocytes (Sorrentino et al., 2007; Benmimoun et al., 2012; Tokusumi et al., 2011). Tous ces gènes sont exprimés dans les prohémocytes dans lesquels ils pourraient réprimer l'entrée en différenciation ainsi que la spécification du type lamellocyte (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012).

Concernant *ush*, une activité dose dépendante a été révélée (Gao et al., 2009) : la perte d'une seule copie du gène induit certes une différenciation précoce, mais uniquement en plasmacyte et cellules à cristaux alors qu'on observe une différenciation massive des lamellocytes dans les larves homozygotes mutantes. La dose de *Ush* serait donc déterminante pour le choix de destin. Des études complémentaires sont nécessaires afin de comprendre le mode d'action de ce gène dans la spécification des destins hématopoïétiques.

Suite à l'engagement des prohémyocytes vers le destin lamellocyte, d'autres acteurs sont ensuite nécessaires afin de réaliser ce programme de différenciation. La MAP kinase kinase Misshapen (Msn) est exprimée dans les précurseurs des lamellocytes avant qu'ils n'aient adoptés la forme et la taille caractéristiques de ceux-ci (Braun et al., 1997; Tokusumi et al., 2009). Ce marqueur permet également de suivre les lamellocytes pleinement différenciés (Braun et al., 1997; Lanot et al., 2001). Msn est un acteur de la voie de signalisation JNK et plusieurs arguments suggèrent fortement que cette voie est requise pour la différenciation des lamellocytes. Ainsi, l'effecteur transcriptionnel de cette voie, le complexe AP-1 est requis pour la différenciation des lamellocytes en contexte mutant gain de fonction *hop<sup>tumI</sup>* (où une induction massive de lamellocytes a lieu en l'absence de parasitisme) (Tokusumi et al., 2009). Par ailleurs, l'inhibition de la voie JNK dans des prohémyocytes artificiellement dirigés vers un destin lamellocytes suite à une augmentation très importante de niveau de ROS dans ces cellules, empêche l'exécution de ce programme. L'activité de la voie JNK dans ces cellules passerait par l'inhibition des facteurs de transcription de la famille des Polycomb dont il a été montré qu'ils participent à la répression de ce destin (Remillieux-Leschelle et al., 2002; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009).

### (3) L'homéostasie de la glande lymphatique

Le contrôle du développement de l'organe hématopoïétique est requis pour atteindre un équilibre en termes de nombre et de type cellulaire produits. Au fil des stades larvaires, le programme de différenciation se surimpose à la prolifération des hémyocytes. A chaque étape de maturation le nombre de cellules produites doit être contrôlé. Dans le mutant *zfrp8*, par exemple, la taille de la glande lymphatique est déjà supérieure à la normale dès l'embryogenèse (Minakhina et al., 2007) et peut atteindre une taille 50 fois supérieure à la normale en L3. Ces phénotypes drastiques suggèrent que ce gène agisse dès l'embryogenèse afin de contrôler la prolifération des prohémyocytes et qu'il ait aussi une fonction plus tardive. Les allèles mutants *ubc9* et *wingless*, évoqués ci-après, permettent d'illustrer les contrôles exercés plus tardivement, respectivement, dans les progéniteurs intermédiaires ou les précurseurs des cellules à cristaux (Kalamariz et al., 2012; Sinenko et al., 2009). Avec des pénétrances différentes, d'autres contextes mutants affectent l'homéostasie de la glande lymphatique

en L3. Les pertes de fonction de *mlf* (*myeloid leukemia factor*) ou de *asrij* induisent une hyperprolifération associée à une différenciation précoce des prohémyocytes (Kulkarni et al., 2011; Bras et al., 2012). Dans certains contextes, la nature même des hémyocytes produits peut être modifiée. Une perte de fonction de *zfrp8* ou de *PTEN* conduit à une augmentation du nombre d'hémyocytes et à la différenciation massive de lamellocytes (Minakhina et al., 2007; Benmimoun et al., 2012). Dans tous les cas répertoriés, une augmentation de la taille de l'organe est associée à une différenciation précoce et parfois inadaptée des hémyocytes sans que l'on sache s'il s'agit d'une conséquence de cette hyperprolifération ou d'une fonction de ces gènes dans le processus de différenciation.

Le développement de l'organe hématopoïétique est un processus qui s'étend pendant toute la vie de la larve. A la durée du processus hématopoïétique s'ajoute une complexité inhérente à sa mise en place au sein d'un organe régionalisé. Dans les lobes primaires, entre les différentes zones précitées (PSC, médullaire et corticale) va s'instaurer un équilibre nécessaire à la génération d'hémyocytes adaptés au contexte environnemental. La régulation de cette homéostasie est l'objet de nombreux travaux qui ont permis de l'ériger comme modèle pour l'étude des mécanismes impliqués dans la communication entre la niche et les cellules « souches » (Martinez-Agosto et al., 2007). Avant d'aborder spécifiquement ces régulations nous nous intéresserons à la formation de ces zones. Nous discuterons également la genèse des lobes secondaires, qui est hétérochronique à celles des lobes antérieurs (Kalamarz et al., 2012).

## (a) Les lobes primaires

### (i) *Le PSC*

La spécification des cellules à l'origine du PSC serait le résultat de la restriction de l'expression du gène *Antennapedia* (*Antp*) à un groupe de cellules confinées en bordure postérieure du segment T3 dès le stade 11 (Tao et al., 2007; Mandal et al., 2007). Dans les précurseurs des prohémyocytes, l'expression de *Antp* est réprimée par le facteur *Homothorax* (*Hth*) (*cf.* figure 4). Plus tardivement (stade 15), *Antp* contrôle l'expression d'un deuxième facteur de transcription *Collier* (*Col*) dont l'expression se restreint à cette zone. Aux stades larvaires, la relation d'épistasie entre ces gènes s'inverse : il est alors requis pour l'expression d'*Antp* dans le PSC (Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007). On notera qu'il existe aussi une restriction clonale entre les cellules du PSC et les cellules

constituant les lobes primaires. En effet, ces deux populations cellulaires ne se mélangent pas entre elles comme le montre l'analyse de clones mitotiques induits dans les lobes primaires ou lors des expériences de traçage des cellules exprimant collier (Benmimoun et al., 2012; Minakhina and Steward, 2010; Krzemien, 2009). A partir du début du stade L3, de longues extensions cytoplasmiques appelées filopodes émanent des cellules du PSC, leur permettant d'établir des contacts avec des prohémyocytes de la zone médullaire (Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007) .

La phase de prolifération des cellules du PSC est plus courte que celle des prohémyocytes de la glande lymphatique. Durant l'embryogenèse et le stade L1, les cellules du PSC qui prolifèrent activement représentent 15% du total des cellules de l'organe contre 1% en milieu de L3, stade auquel ces cellules n'incorporent plus de BrdU, (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010). Au stade L3 le PSC est constitué de 20 à 50 cellules (Sinenko et al., 2009; Pennetier et al., 2012; Benmimoun et al., 2012). Différentes voies de signalisation contrôlant la croissance du PSC ont récemment été identifiées. C'est le cas notamment des voies TOR Insuline, Dpp/ (Decapentaplegic/) et Wg (Wingless) (Benmimoun et al., 2012; Sinenko et al., 2009) . Ainsi par exemple, l'activation de la voie Wg permettrait de contrôler positivement le gène *dmyc*, orthologue de *myc*, jouant un rôle dans la croissance et prolifération de nombreux tissus. Inversement, la voie de signalisation Dpp/BMP le régulerait négativement (Pennetier et al., 2012). La voie TOR/Insuline est requise pour la prolifération/maintenance et la croissance des cellules du PSC (Benmimoun et al., 2012).

### **(ii) La zone médullaire**

La ZM se forme au milieu du stade L2 et perdure jusqu'à la métamorphose quand les progéniteurs mûrissent sans proliférer en précurseur de plasmocytes et quittent l'organe hématopoïétique (Jung et al., 2005; Grigorian et al., 2011). Ces événements impliquent des changements importants de comportement de la part des prohémyocytes pour constituer une zone distincte qui plus tard sera disloquée et, pendant cet intervalle de temps, requièrent une régulation active pour maintenir ces cellules dans un état indifférencié et quiescent. Bien que la plupart des données publiées se concentrent sur le maintien des prohémyocytes, notre vision du système de régulation reste parcellaire dans la mesure où peu de relations causales ont été établies entre les différentes voies de signalisation et gènes impliqués et leurs effets directs sur l'état des cellules.

**(i) Une régulation  
intrinsèque**

Les facteurs de transcription et cofacteurs jouent un rôle clé dans les processus développementaux en assurant l'établissement de programme d'expression génique. Parmi ceux détectés dans les prohémyocytes, se retrouvent des membres des familles GATA (Serpent, Pannier) et FOG (U-shaped) dont le rôle capital a été démontré durant l'hématopoïèse embryonnaire. Mis à part pour *ush*, leur rôle n'a pas été étudié dans cette zone. Les analyses de mutant de perte de fonction pour *ush* suggèrent son implication dans la répression de la différenciation (Sorrentino et al., 2007). Sur la base de leur patron d'expression et/ou des phénotypes des mutants divers facteurs de transcription tels que *Zfrp8* sont impliqués dans le maintien de la ZM (Minakhina et al., 2007; Tan et al., 2012). Néanmoins peu d'approches ciblées à cette zone ont été réalisées afin de préciser l'activité de ces molécules dans les prohémyocytes de la ZM. Récemment, le facteur *Odd*, dont la fonction dans l'émergence des prohémyocytes larvaires a déjà été démontrée, a fait l'objet d'une étude visant à déterminer s'il exerçait une fonction plus tardive dans la mesure où son niveau d'expression va décroissant lors de la maturation des hémyocytes en L3. Une perte de fonction de ce gène par ds-RNA dans les prohémyocytes conduit à une restriction de la taille de la ZM au bénéfice d'une expansion de la ZC. Conséquemment, les auteurs ont proposé que ce facteur permette de bloquer la différenciation des prohémyocytes (Gao et al., 2011)

Afin de maintenir la quiescence des prohémyocytes le blocage de la différenciation apparaît comme une condition essentielle. La récente publication de Tokusumi et de ses collaborateurs permet d'apprendre davantage sur la mécanistique relative à cette étape. Le facteur de répression traductionnel *Bam* (Bag of Marbles) fonctionnant en association avec le micro ARN *mir-7* est à même de réduire l'activité de la protéine *Yan*, un facteur de transcription impliqué dans la promotion de la différenciation et considéré comme un marqueur de progéniteurs intermédiaire (Zettervall et al., 2004; Tokusumi et al., 2011). *Bam* ainsi que *mir-7* sont nécessaires et suffisants au maintien de la population des prohémyocytes. L'activité conjuguée de ces deux gènes contribue au contrôle de la sélection des ARNm à traduire et influe sur la décision entre quiescence et différenciation.

## **(ii) Une régulation groupée**

Une communication paracrine s'instaurerait entre les prohémyocytes, leur permettant d'entretenir leurs caractéristiques.

Il a été proposé que la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) était active dans les prohémyocytes suite à la découverte d'un faisceau d'éléments. Trois acteurs sont exprimés dans les hémyocytes de la ZM : *domeless (dome)*, *latran (lat)* et *unpaired 3 (upd3)* qui sont, respectivement, les deux seuls récepteurs à cytokine identifiés chez la Drosophile et une des trois cytokines de cette voie (Brown et al., 2001; Makki et al., 2010). Chez la Drosophile, la liaison de Upd3 à Dome induit l'activation de la kinase JAK Hopscotch (Hop), qui par phosphorylation des récepteurs permet le recrutement du facteur de transcription STAT92E / Marelle (Yan et al., 1996; Harrison et al., 1998). Activé, ce facteur de transcription est transloqué dans le noyau où il va réguler l'expression de ses gènes cibles. Un rapporteur d'activité de cette voie, le transgène *domemeso-lacZ*, récapitulant l'autorégulation de *dome* cible de la voie JAK-STAT dans le mésoderme, est par ailleurs exprimé dans la ZM (Hombría et al., 2005; Krzemień et al., 2007).

L'implication de la voie JAK/STAT dans la maintenance des prohémyocytes de la ZM, hypothèse formulée par Krzemien et al, repose notamment sur l'analyse d'un mutant hypomorphe de *STAT92E*, seul effecteur transcriptionnel de la voie chez la Drosophile (Krzemień et al., 2007). En effet, dans ce contexte génétique, l'expression du marqueur de la ZM *TepIV* est perdue/fortement diminuée et, de manière concomitante, le nombre de cellules exprimant les marqueurs de différenciation tel que *Doxa3* augmente (Krzemień et al., 2007). Bien que cette analyse ne permette pas de démontrer que l'activation canonique de la voie est requise au sein de la ZM de manière cellulaire autonome, il a été proposé que l'inactivation de la voie JAK/STAT serait un prérequis à la différenciation des prohémyocytes (Mandal et al., 2007; Krzemień et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que *Latran*, un récepteur non signalisateur de la voie JAK/STAT, qui agirait comme un dominant négatif de *Dome*, est requis pour la différenciation des lamellocytes suite à un parasitisme (Makki et al., 2010). En effet, dans ce contexte immun qui s'accompagne d'une maturation massive et précoce des prohémyocytes, l'extinction rapide (4 heures) de la voie (visualisée par la perte d'expression de *domemeso-lacZ*) requiert *latran*. Dans un contexte de perte de fonction

pour *latran*, les prohéocytes ne seraient pas à même d'inactiver cette voie de signalisation ce qui expliquerait la conservation de l'homéostasie ZM/ZC après parasitisme (Makki et al., 2010).

Cependant, des données récentes remettent en cause l'importance de l'activation de la voie JAK/STAT au sein de la ZM. En effet, dans un mutant *Hop*, contexte où la transduction du signal est altérée, l'équilibre ZC/ZM ne semble pas rompu : la différenciation des plasmocytes reste régionalisée (Mondal et al., 2011). De plus, des clones de perte de fonction *dome* ou *STAT92E* induits dans la ZM n'entraînent pas à la différenciation terminale de ces cellules mutantes (Minakhina et al., 2011; Mondal et al., 2011). L'inactivation de la voie JAK/STAT ne serait donc pas suffisante pour induire de manière cellulaire autonome la différenciation des prohéocytes de la ZM.

Les cellules de la ZM se distinguent également par leur compaction et un fort niveau d'expression de la protéine d'adhésion cellulaire DE-cadhérine/Shotgun, (Oda et al., 1994; Jung et al., 2005). Une concomitance entre la diminution d'expression de ce marqueur et la perte de quiescence de cette zone a été observée (Mandal et al., 2007; Kulkarni et al., 2011). De plus, une perte de fonction ciblée de *shotgun* entraîne une dissémination d'une partie de la population *dome+* au sein de la ZC (Mondal et al., 2011). Ces cellules seraient en majorité en transition car elles co-expriment *dome* et le marqueur de maturation précoce *pxn* (Sinenko et al., 2009). Les voies Wg et PVR/PV2 participent au contrôle de l'expression de *shotgun* mais d'autres études sont nécessaires afin de savoir si cette régulation est directe (Mondal et al., 2011; Sinenko et al., 2009). Ces travaux suggèrent que la régulation de la cohésion des prohéocytes pourrait être impliquée dans le contrôle de leur destin (Sinenko et al., 2009).

### **(iii) Une influence environnementale**

Les voies de signalisation TOR (Target of Rapamycin) et IIS (Insulin/IGF signaling), qui constituent un système interconnecté impliqué dans la croissance de l'individu en réponse aux conditions nutritives, sont également requises pour le maintenir la population de prohéocytes (Tennessee and Thummel, 2011; Benmimoun et al., 2012). Il a été mis en évidence que le ratio entre la ZM/ZC était modulé en fonction du niveau

d'activation de ces voies. De façon intéressante, une carence nutritionnelle conduit à une inactivation systémique de la voie IIS/TOR et provoque une différenciation précoce des prohémyocytes (Benmimoun et al., 2012; Shim et al., 2012). Ainsi, le destin de ces cellules est régulé non seulement par des signaux développementaux et immuns mais aussi par les conditions nutritives.

### *(iii) Zone Corticale*

La zone corticale prend forme au milieu du stade L2 avec l'émergence des progéniteurs intermédiaires qui reste à ce jour encore peu comprise (Krzemien et al., 2010; Mondal et al., 2011). Le développement de cette zone serait soumis à la capacité d'une partie des prohémyocytes *dome+* à réprimer les mécanismes de quiescence. Ainsi la maintenance de l'activation de la voie Wg ou encore l'expression constitutive de facteur de traduction Bam dans ces cellules empêche le développement de la ZC (Sinenko et al., 2009; Tokusumi et al., 2010). En parallèle, des mécanismes promouvants la différenciation doivent être activés. Le niveau de dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species) augmente pendant les premières phases développementales de la vie larvaire dans les prohémyocytes. Un délai dans cette augmentation induit un retard de maturation des hémocytes indiquant ainsi que « la compétence à la maturation » est contrôlée dans le temps (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Le facteur de transcription Yan, un des rares identifiés comme étant fortement et spécifiquement exprimé dans les progéniteurs intermédiaires, jouerait aussi un rôle dans la maturation : sa surexpression est suffisante pour induire une différenciation terminale massive de la majorité des prohémyocytes (Tokusumi et al., 2011).

En parallèle à la différenciation, s'opère un contrôle du cycle cellulaire. Dans un premier temps, les progéniteurs intermédiaires prolifèrent activement (Krzemien et al., 2010). Peu de gènes spécifiquement requis dans la ZC ont été mis en évidence. *Ubc9* code pour une enzyme catalysant la sumoylation, une modification post-traductionnelle permettant l'ajout de protéine de type SUMO (Chiu et al., 2005; Kalamarz et al., 2012). Sa déplétion induit, entre autre, un phénotype d'hyperplasie qui peut être en partie sauvé par la réexpression du gène dans des progéniteurs intermédiaires. Ce phénotype peut également être modulé par des acteurs du cycle cellulaire plaçant ainsi *Ubc9* au

cœur de ce processus. Dans un deuxième temps, une restriction de la capacité à proliférer a lieu. Les précurseurs peuvent encore se diviser, ce qui est rarement le cas des hémocytes matures (Krzemien et al., 2010). Dans les précurseurs des cellules à cristaux, le nombre de division est dépendant de l'activité de la voie Wg qui agit de façon autocrine dans ces cellules. En revanche, les précurseurs des plasmacytes ne sont pas sensibles à l'activité de cette voie de signalisation (Sinenko et al., 2009). Par ailleurs, des analyses clonales révèlent que les précurseurs de ces deux lignages possèdent des capacités prolifératives différentes ce qui pourrait expliquer que des mécanismes distincts régulent leur cycle cellulaire (Krzemien et al., 2010).

Avec l'extension de la zone corticale, une subdivision apparaît selon l'état de maturité des hémocytes. L'étude de clones perte de fonction pour *STAT* ou *pannier*, suggère une fonction contexte dépendante de ces deux gènes. Dans les cellules situées à la frontière de la ZM, ces facteurs de transcription permettent la répression de la différenciation terminale (P1+) d'une façon non autonome. En revanche, lorsque les cellules sont en position distale par rapport à la ZM, ces facteurs deviendraient nécessaires à la maturation terminale des hémocytes en plasmacytes (Minakhina et al., 2011).

#### *(iv) Des zones interactives*

Dans les lobes primaires, l'organisation des hémocytes selon leur état de maturation est très structurée et reproductible d'un individu à l'autre. L'équilibre qui s'instaure lors de la formation des zones médullaire et corticale est maintenu grâce à une communication paracrine permettant une interaction à distance des cellules des zones médullaire, corticale et du PSC. Ce niveau de régulation s'ajoute aux régulations internes, évoquées dans les paragraphes précédents, des populations d'hémocytes composant ces régions.

##### *(a) Le modèle de la niche hématopoïétique*

Les pro-hémocytes de la zone médullaire sont comparés à des cellules souches dont le maintien à l'état "quiescent"/indifférencié est dépendant d'une signalisation émise par une niche, rôle que jouerait ici le PSC, pour revue cf (Martinez-Agosto et al., 2007) (cf. figure 6). Ce modèle est basé sur deux travaux. Ainsi, en l'absence de PSC (mutant collier

ou Antp ou élimination ciblée des cellules du PSC), on observe une perte de la zone médullaire (identifiée via l'expression des marqueurs tel que *dome-meso-lacZ* ou *shg*) dès le milieu du stade L3 et une augmentation du nombre d'hémocytes pleinement différenciés (P1 ou PPO positifs) (Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007). L'expression du rapporteur d'activité de la voie JAK/STAT étant dépendante d'un PSC fonctionnel, il a été proposé que le PSC permette le maintien des prohémocytes de la ZM en induisant l'activation de la voie JAK/STAT dans ces cellules grâce à une signalisation paracrine (Krzemień et al., 2007). Une signalisation mise en jeu implique la voie Hh (Hedgehog), nommée ainsi d'après son ligand qui est lui-même exprimé par les cellules du PSC (Mandal et al., 2007). En effet il a été montré que l'activation de cette voie était requise dans la ZM dès le milieu du stade L2 pour empêcher la maturation précoce de la majorité des prohémocytes en plasmacytes et cellules à cristaux. Ces résultats combinés aux patrons d'expression d'effecteurs de cette voie (le récepteur *ptc* (*patch*), et le facteur de transcription *Ci(act)* (*Cubitus interruptus* sous sa forme active) qui montrent que ces gènes sont exprimés dans la ZM, ont permis de déterminer que cette voie était active dans les prohémocytes et que le blocage de leur maturation était tributaire de son activation. Des travaux supplémentaires doivent être réalisés afin de comprendre comment les voies Hh et JAK/STAT coopèrent au sein de la ZM.

L'expression de *hh* dans le PSC dépend de l'activité du facteur GATA SRP et est restreinte au PSC grâce à l'action inhibitrice des facteurs Su(H) (Suppressor of Hairless) et Ush dans la zone médullaire et corticale. De façon inattendue, une extension du domaine d'expression de *hh* à la ZM n'aboutit pas à un blocage de la différenciation mais, au contraire, à son augmentation (Tokusumi et al., 2010). La restriction de la zone d'émission du ligand semble donc importante afin d'assurer un maintien de l'homéostasie des lobes primaires.

La mise en place de la signalisation Hh est concomitante à l'apparition des filopodes dans le PSC et il a été proposé que ces extensions participent à la communication avec la ZM. Ce modèle ne permet néanmoins pas d'expliquer comment se fait la diffusion du signal Hh dans toute la ZM qui compte des centaines de cellules alors que d'après les observations les filopodes n'assurent des contacts qu'avec deux ou trois rangs de cellules (Mandal et al., 2007).

(a) La ZC, un relais du PSC

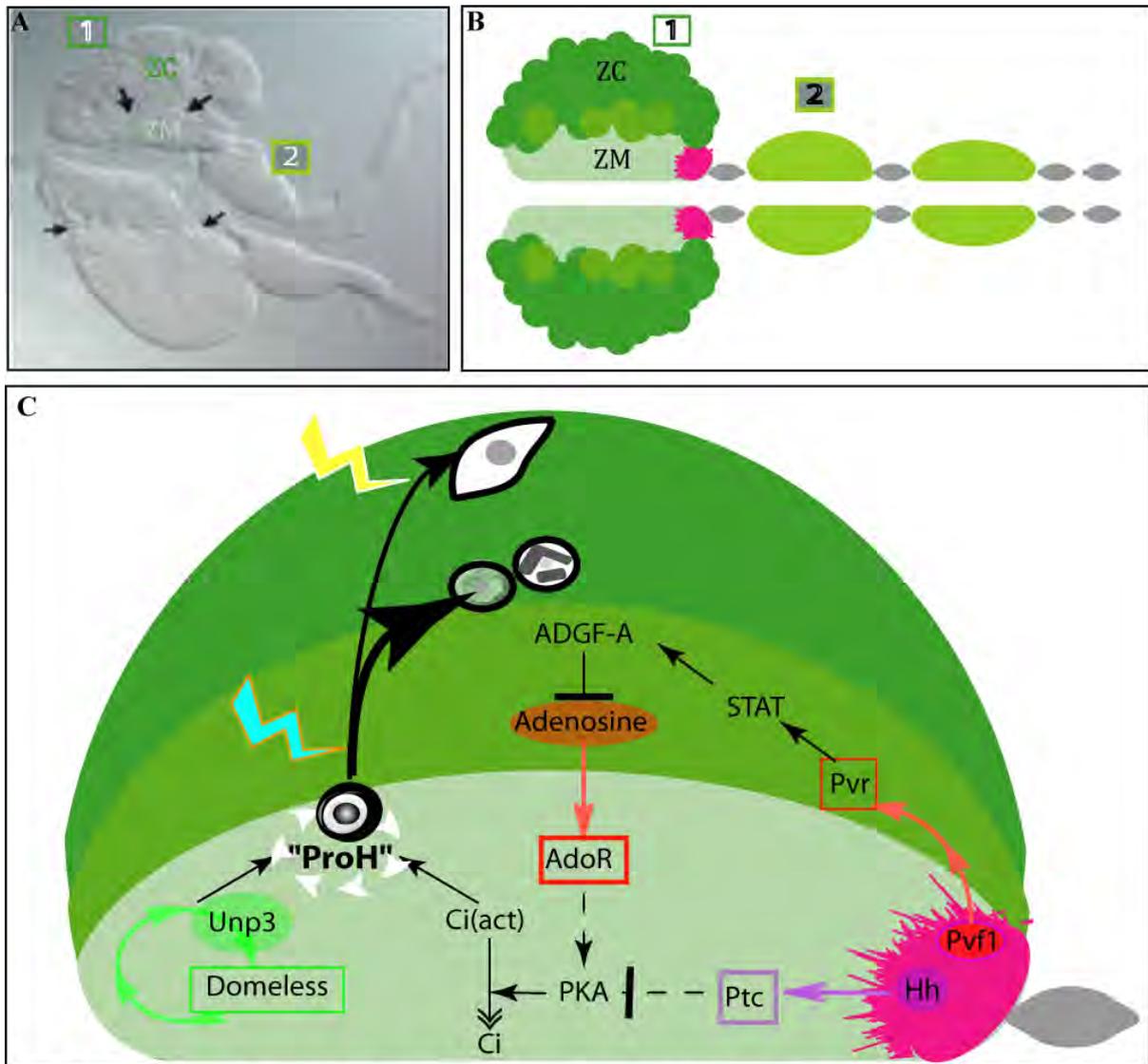
Plus récemment, une activation indirecte de l'effecteur transcriptionnel de la voie Hh, Ci, par le PSC a été mise en évidence (*cf.* figure 6). Cette activation non canonique implique un relais : la zone corticale. L'activité du récepteur transcriptionnel Ci est modulée par la protéine kinase A, ou PKA, intégrant, en plus des signaux relatifs à la voie Hh, des signaux relatifs au niveau d'adénosine extracellulaire (Dolezal et al., 2005; Mondal et al., 2011). Un fort niveau d'adénosine qui est détecté par l'intermédiaire d'un récepteur à adénosine (AdoR), promeut la forme répressive de Ci, stimulant la différenciation terminale des prohémyocytes et contre carant ainsi l'effet de Hh. Le niveau d'adénosine présent dans le milieu extracellulaire est modulé par une enzyme ADGF-A (Adenosine Deaminase Growth Factor-A) produite par les hémocytes de la zone corticale. Epistatiquement, *adgf-a* est en aval de *STAT*, lui même dépendant de *Pvr*. Le récepteur *Pvr* est activé par les ligands de la famille des *Pvf*, dont un des membres, *Pvf1* est produit par le PSC (Mondal et al., 2011). L'activation de la voie *Pvr/PVF1* dans les progéniteurs de la zone corticale permet d'éviter une élévation importante du niveau d'adénosine extracellulaire et donc de favoriser la forme active de Ci.

### (b) Les Lobes secondaires

D'après les analyses des clones mitotiques induits pendant l'embryogenèse, les hémocytes des lobes secondaires dériveraient du même primordium de la glande lymphatique que ceux des lobes primaires (Krzemien, 2009). Ils se forment au stade L2, à partir de quatre à six paires de groupes de cellules qui coalescent pour constituer deux grands ensembles de lobes postérieurs entre lesquels s'intercalent des cellules péricardiaques (Kalamarz et al., 2012). L'émergence de ces cellules étant asynchrone à celle des lobes primaires, les hémocytes générés sont plus immatures que ceux des lobes primaires. Ces lobes sont considérés comme un réservoir composé principalement de prohémyocytes (Jung et al., 2005; Kalamarz et al., 2012).

Même s'il s'instaure un décalage dans la réalisation du programme hématopoïétique, les prohémyocytes des lobes secondaires ont les mêmes potentialités en termes de destin : des plasmacytes, des cellules à cristaux et des lamellocytes peuvent être induits selon

FIGURE 6 : GL AU STADE L3, HOMEOSTASIE ET REGIONALISATION



**A,B. Glande lymphatique au stade L3.** ZM, Zone médullaire et ZC, Zone corticale (1),lobes primaires, (2), lobes secondaires. **A.** (D'après Jung et al ; 2005) Observation en Nomarski permettant la visualisation de deux régions morphologiquement distinctes au sein des lobes primaires. Les flèches indiquent les frontières entre les zones. Structuellement, les lobes secondaires sont proches des lobes primaires. **B.** Représentation schématique d'une GL. La ZM est en vert très clair. La ZI (zone intermédiaire) est en vert clair. La zone corticale est en vert foncé. Le PSC est en rose. Les cellules péricardiques sont représentées en gris. **C. Mécanismes de régulation de l'homéostasie des lobes primaires.** Le caractère prohémyocytes « ProH » est maintenu par des régulations internes aux hémyocytes (flèches blanches). Des communications de type autocrine (flèches vertes) et paracrines émanant du PSC (mauve) et de la ZC (orange) influent aussi sur le maintien de la ZM. La sortie de la ZM est couplée au choix de destin qui peut être modulée par des stimuli exogènes comme le parasitisme (éclair jaune) ou les conditions nutritives (éclair bleu). Pour les détails concernant les éléments régulateurs cf. texte.

les conditions de développement (Lanot et al., 2001). Les marqueurs connus des prohémyocytes des lobes primaires sont également exprimés dans ces lobes. Les régulateurs du programme hématopoïétique seraient communs aux différents territoires. Une différence porte sur le fait que les hémyocytes de ces lobes secondaires n'entrent pas en phase de quiescence et que ces lobes ne présentent pas d'organisation en zones suggérant que les mécanismes de maintien de quiescence mettant en jeu la voie Hh/Pvf/ADGF-A n'aient pas cours. De plus, ces lobes ne sont pas en contact direct avec le PSC et les interactions fonctionnelles entre cette niche et les lobes secondaires restent peu étudiées. Dans les contextes « d'hyperprolifération » précédemment décrits, ce phénotype est plus pénétrant dans les lobes postérieurs que dans les lobes primaires ; peut-être est-ce en lien avec l'immaturation de ces cellules qui auraient une capacité de division plus importante (Qiu et al., 1998; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009; Kalamarz et al., 2012). La manifestation la plus extrême est observée dans le mutant *asrij* où le nombre de paires de lobes secondaires est supérieur à la normale ce qui pourrait aussi refléter un défaut lors de la spécification de ces lobes (Kulkarni et al., 2011).

## b) LES CELLULES D'ORIGINE EMBRYONNAIRE

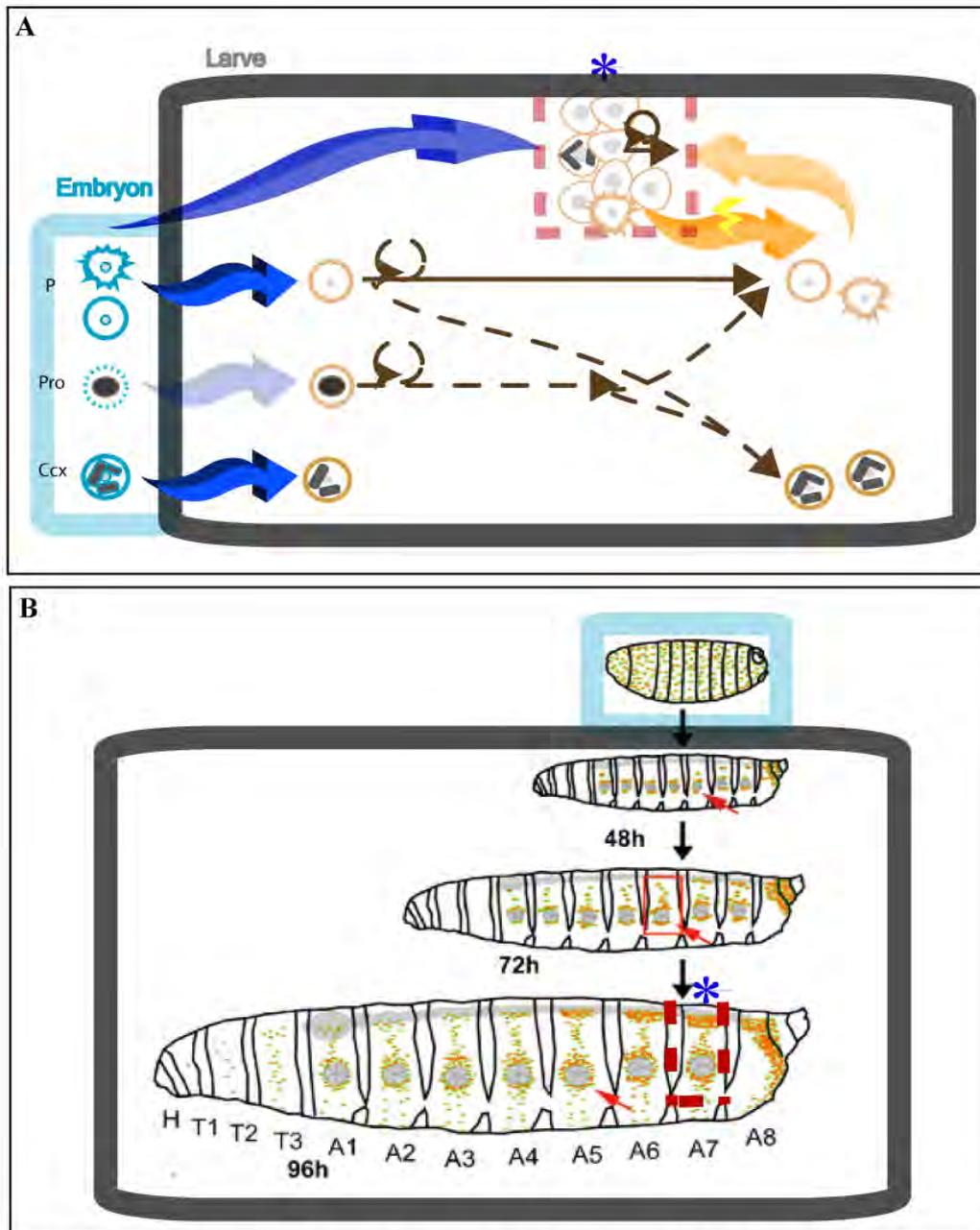
### (1) Des cellules circulantes ou résidentes

Les hémyocytes d'origine embryonnaire persistants colonisent différents territoires de la larve. Leur localisation est stéréotypée ; les hémyocytes se répartissant de façon dynamique entre différents « compartiments ». Une ségrégation s'opère entre les cellules en libre circulation dans l'hémolymphe et celles associées à des tissus larvaires. Le compartiment d'ancrage le plus étendu est constitué par des îlots d'hémyocytes s'attachant au niveau de la cuticule. Ces groupes d'hémyocytes nommés sessiles, se distribuent selon les segments de la larve (*cf.* figure 7) (Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Dans des proportions plus restreintes, les hémyocytes s'associent à des épithélia comme celui de l'intestin ou des disques « œil-antenne » ; toujours dans des régions précises de ces tissus (Zaidman-Rémy et al., 2012; Kelsey et al., 2012).

Alors que les hémocytes en circulation sont isolés, dans les îlots sessiles ils sont liés par des inter-digitations complexes mais réversibles. Narita *et al*; proposent que ces interactions soient dépendantes de la laminine, une protéine de la matrice extracellulaire (Narita et al., 2004). Leur dynamique de formation a depuis peu été mise en évidence. Dès le stade L1, les hémocytes s'organisent selon une configuration qui préfigure les îlots sessiles décrits par Lanot et al ; en L3. Ils se placent dorsalement au niveau du segment terminal et latéralement autour des oenocytes (*cf.* figure 8). Leur disposition autour des oenocytes, fonctionnellement proches des cellules hépatiques, forme une « pochette épidermo-musculaires » (Makhijani et al., 2011). Pendant le développement de la larve, le nombre croissant d'hémocytes va se répartir près des oenocytes en suivant un axe latéro-dorsal puis latéro-ventral. Les hémocytes ont la capacité de migrer entre ces différents sites (Welman et al., 2010; Makhijani et al., 2011). De plus, des hémocytes, délogés suite à une perturbation physique, ont la capacité de réintégrer les sessiles. L'attractivité de ces points d'ancrage perdure pendant toutes les phases larvaires (Makhijani et al., 2011).

La structuration de ces îlots implique une régulation conjointe des pôles attracteurs et des hémocytes résidents. En modulant l'activité de certains gènes dans les hémocytes, il est possible d'induire des détachements ou des localisations aberrantes (Williams, 2009; Stofanko et al., 2008). La perturbation du réseau d'actine, impliqué dans la mobilité cellulaire, est notamment délétère pour la formation de ces îlots sessiles (Makhijani et al., 2011). En contrepartie, ces pôles constituent des environnements trophiques dont la modification influe sur le recrutement. Les pochettes épidermo-musculaire sont dépendantes du système nerveux périphérique qui innerve les oenocytes (Makhijani et al., 2011). Cependant, la localisation des hémocytes au niveau du segment le plus postérieur est sous le contrôle d'un autre mécanisme, inconnu à ce jour. Cette différence comportementale suggère que le compartiment sessile ne soit pas régi uniformément.

FIGURE 7 : LES HEMOCYTES D'ORIGINE EMBRYONNAIRE, CIRCULATION ET CYCLE



**A. Répartition des cellules d'origine embryonnaire dans la larve.** A la transition embryon/ larve les hémocytes expriment de nouveaux marqueurs. Ils se répartissent entre la circulation et les îlots sessiles (flèches bleues). Une dynamique de localisation (flèches oranges) s'instaure pendant les stades larvaires entre les îlots sessiles et la circulation. Cette répartition peut être modifiée par des stimuli d'ordre mécanique ou immun (éclair jaune). Les flèches marron représentent les relations de lignage (droites) et les capacités de prolifération (rondes). L'existence de progéniteurs dont l'origine est inconnue a été démontrée en circulation. **B.** (D'après Makhijani et al ; 2011). **Dynamique de formation des îlots sessiles.** Représentation schématique du développement larvaire. Les hémocytes (orange) se répartissent latéralement autour des oenocytes (gris) et dorsalement. Encadré bleu, embryon ; Encadré noir, larve ; Encadré pointillé rouge et étoile bleue, délimitation schématique d'un îlot sessile.

## (2) Une expansion de la diversité

Le passage à la vie larvaire des hémocytes persistants s'accompagne de modifications. Premièrement, un nouveau programme d'expression génique s'initie dans ces cellules. Pour les plasmacytes, la perte de marqueurs embryonnaires comme *singed* ou *gcm* est contrebalancée par l'expression de *hemese*, (Kurucz et al., 2003). Ce marqueur pan-hémocytaire est aussi exprimé par les cellules à cristaux. Par ailleurs, d'autres sous-populations d'hémocytes peuvent être distinguées moléculairement (Vilmos et al., 2004)(Kurucz et al., 2007) Des études sont encore nécessaires afin de déterminer si ces marqueurs moléculaires sont représentatifs d'un état de maturation et/ou peuvent être reliés à une fonction biologique. Deuxièmement, les hémocytes réintègrent (ou poursuivent) le cycle cellulaire. Cette prolifération présente une particularité : celle d'être générée dans des cellules matures alors que la différenciation et la prolifération sont habituellement des processus mutuellement exclusifs (Makhijani et al., 2011). En effet, il a été montré que les plasmacytes capables de phagocytose s'auto-renouvellent au niveau des îlots sessiles.

D'autre part, deux études indépendantes suggèrent l'existence de cellules progénitrices dans la circulation. La première combine des critères morphologiques, prolifératif et fonctionnel, et la seconde, la co-expression et/ou exclusion de marqueurs moléculaires (Lanot et al., 2001; Sinenko et al., 2010). Ces progéniteurs ne semblent pas être présents au niveau des îlots sessiles (Makhijani et al., 2011).

Les compartiments circulatoire et sessile s'accroissent pendant la vie larvaire. Entre le stade L1 et L3w, la quantité d'hémocytes cumulée de ces deux compartiments est multipliée d'un facteur 10 environ (Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Ce développement est ponctué par des phases d'expansion subites succédant à des phases plus progressives. Malgré leur origine commune, leur dynamique de formation est sensiblement décalée dans le temps. De plus, la répartition des hémocytes est asymétrique ; les sessiles regroupant la majorité des hémocytes jusqu'au stade L3w. Différentes études de traçage montrent que l'organe hématopoïétique ne libère des cellules qu'en cas de parasitisme (Lanot et al., 2001) (Márkus et al., 2009; Makhijani et al., 2011). L'augmentation du nombre d'hémocytes circulant ou sessiles est donc liée à

une vague d'hématopoïèse active qui a lieu hors de la glande lymphatique et qui pourrait reposer sur les capacités d'auto-renouvellement de cellules différenciées.

Notre connaissance des mécanismes de régulation des hématopoïèses au sein des compartiments circulant et sessile est fragmentaire. Génétiquement, ces deux sites partagent des régulateurs avec l'organe hématopoïétique. Des mécanismes communs sont mis en œuvre dans les trois territoires pour la différenciation des cellules à cristaux. La voie Notch et la protéine MLF (Myeloid leukemia factor) sont nécessaires à l'activité de *lozenge* qui contrôle le destin cellules à cristaux (Duvic et al., 2002; Bras et al., 2012). La différenciation des plasmacytes serait dépendante du facteur Dorsal (Davidson et al., 2005) et du facteur Myb (Matova and Anderson, 2006; Huang et al., 2005) . Concernant la prolifération, un différentiel existe selon la localisation des hémocytes. En effet, les hémocytes prolifèrent davantage au niveau des sessiles suggérant que ce microenvironnement puisse être favorable à leur expansion (Makhijani et al., 2011). Les voies Egfr et Toll seraient impliquées dans le contrôle de la prolifération des hémocytes d'origine embryonnaire (Zettervall et al., 2004).

### c) "L'HEMATOPOÏÈSE LARVAIRE"

Nous avons précédemment détaillé les 3 différents compartiments de l'hématopoïèse : la glande lymphatique, les sessiles et la circulation sanguine. On relève l'existence de différents mécanismes de régulation des hématopoïèses de ces compartiments. Et parmi ces mécanismes, certains sont communs aux 3 compartiments tandis que d'autres sont spécifiques à un compartiment. Il est alors intéressant de noter que l'homéostasie globale du système hématopoïétique est aussi bien influencée par une action sur les régulateurs communs que par une modification de l'homéostasie « restreinte » d'un des compartiments.

Après avoir abordé les homéostasies restreintes d'un point de vue génétique, nous allons maintenant illustrer les modifications de l'homéostasie générale du système hématopoïétique sous un angle physiologique, par des stimuli immuns particuliers.

## II. L'IMMUNITÉ

L'immunité est la préservation de l'intégrité d'un organisme, son exemption de maladies. Le système immunitaire permet de limiter les dommages que pourraient causer des micro-organismes pathogènes mais protège également l'organisme du soi altéré, potentiellement délétère. Tous les métazoaires ont développé des réactions immunitaires assurant leur défense contre ces dangers. Tout danger doit donc être détecté et neutralisé. Le déclenchement de la réponse immunitaire se base sur deux grands paradigmes de l'immunité. Le premier repose sur une distinction entre le « soi » et le « non soi ». En cas d'infection, les micro-organismes, considérés comme du « non soi », sont directement reconnus grâce à des récepteurs (Medzhitov and Janeway, 2002). De même, des cellules lésées ou infectées, reconnues comme du « soi altéré » ou « soi modifié », peuvent être identifiées. Dans la théorie du signal de danger proposée par Matzinger, les signaux ultimes contrôlant l'immunité ne sont pas exogènes mais endogènes (Matzinger, 1998). Ces signaux, produits par les cellules lésées ou infectées, sont reconnus comme des signaux d'alerte qui induisent la réponse immunitaire.

Deux types de réponses immunitaires ont été mis en place au cours de l'évolution. La réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative, uniquement présente chez les vertébrés. Ce second système repose sur la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre un pathogène préalablement identifié. La production de ces effecteurs est consécutive à un réarrangement génique somatique. La mise en place de cette réponse dépend de l'activation de la première ligne de protection constituée par la réponse « innée ». Cette réponse est présente chez toutes les espèces et assure, pour la majorité d'entre elles, l'unique système de défense. Chez la *Drosophile*, la réponse immunitaire est donc de type « innée ». Cet organisme sert de modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires de cette facette de l'immunité (Volchenkov et al., 2012).

Dans ce chapitre, nous décrirons la réponse immunitaire chez la *Drosophile* en nous

focalisant sur le stade développemental d'intérêt, la vie larvaire. Tout d'abord, nous nous intéresserons aux mécanismes de déclenchement de la réponse contre le « non soi », micro-organismes et gros pathogènes, sans exposer la réponse virale (pour revue : (Kemp and Imler, 2009)). La réponse au « soi altéré » ou aux tissus endommagés sera également abordée. Puis nous décrirons brièvement les effecteurs de la réponse immune qui est médiée selon deux principes : la réponse « humorale » qui consiste en la production et sécrétion de facteurs dans l'hémolymphe et la réponse « cellulaire », dont les effecteurs sont les cellules hématopoïétiques. Ces composantes cellulaire et humorale ne sont pas exclusives et peuvent coopérer pour la mise en œuvre de stratégies de défense efficaces qui seront mentionnées. Nous porterons une attention particulière à la réaction d'encapsulation cellulaire déclenchée par des parasitoïdes aux stades larvaires.

## A. LA DÉTECTION

### 1. LES PETITS PATHOGENES, LE NON-SOI ET LE DANGER

La présence d'intrus est décelée via des récepteurs codés par la lignée germinale. Ces derniers permettent la reconnaissance de motifs généraux et spécifiques aux grandes classes de micro-organismes. Ces récepteurs, introduits par Janeway et appelés PRR pour « Pattern Recognition Receptor », se lient aux PAMP pour "Pathogen Associated Molecular Patterns" déclenchant ainsi une cascade d'activation visant l'élimination des pathogènes Medzhitov 1997. Ces PRR appartiennent à deux grandes familles : les PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein), (pour revue cf (Charroux et al., 2009) et les GNBP (Gram Negative Biding Protein). Leurs formes transmembranaires et solubles permettent d'activer des cascades de signalisation. D'autres types de récepteurs peuvent jouer ce rôle de détection. Les EGF-like-repeat-containing receptors (Epidermal Growth Factor) représentent une famille émergente de molécules (Manaka et al; 2004). L'anticorps P1/Nimrod C1, utilisé pour marquer les plasmocytes actifs, reconnaît une de ces molécules, qui se lie aux bactéries (Kurucz et al., 2007). Enfin, des récepteurs appartenant à la super famille des immunoglobulines nommés DSACM (Down Syndrome Associated Molecule) participent à la reconnaissance et à l'élimination des bactéries. Leur spectre de reconnaissance est hautement diversifié, 18 000 variants, issus d'un

épissage alternatif, pouvant potentiellement être exprimés par les cellules immunitaires (Watson et al., 2005). L'existence d'un certain degré de *spécificité* vis-à-vis du pathogène est envisagée avec la découverte de ce type de récepteur présentant une grande diversité.

La présence des petits pathogènes peut aussi être détectée via leur activité métabolique. Par exemple, une des protéases produites par *Beauveria bassiana*, induit, en parallèle à la digestion de la cuticule de l'hôte, la cascade d'activation de la réponse humorale (Gottar et al., 2006).

## 2. LE SOI ALTÉRÉ

Les cellules apoptotiques peuvent être directement reconnues par des récepteurs au nom évocateur de Scavenger ou « éboueurs » parmi lesquels se trouve Croquemort (Franc et al., 1996). Par ailleurs, la rupture de l'homéostasie engendrée par des lésions correspond à une rupture de la membrane basale ce qui cause l'adhésion et l'activation des hémocytes au niveau du site lésé (Pastor-Pareja et al., 2008). L'altération de la membrane basale qui recouvre la cavité ainsi que tous les tissus larvaires, baignant directement dans l'hémolymphe, serait un indicateur d'un danger. La capacité des cellules hématopoïétiques à se lier au soi altéré a été proposée comme une fonction ancestrale du système immunitaire. Cette hypothèse postule l'existence des DAMP pour "Damage Associated Molecular Pattern" qui, à l'instar des PAM, induiraient une activation des cellules immunitaires (Seong and Matzinger, 2004).

## 3. LES PARASITES

La reconnaissance des parasites n'est pas très bien comprise à ce jour. Etant plus phylogénétiquement proche de leurs hôtes que les petits pathogènes, ces parasites ne pourraient pas être reconnus via des PAMs (Lavine and Strand, 2002). En revanche, la similarité des composants de la surface des œufs de parasite à la propre membrane basale pourrait aider à déterminer la capacité des hôtes à établir la réponse immunitaire. En effet, la réponse d'encapsulation est déclenchée pour neutraliser des parasites ou des transplants hétérotypiques préalablement altérés mécaniquement ou enzymatiquement (Rizki and Rizki, 1980). La présence de ce « non soi » pourrait être

interprété soit comme du « soi altéré » soit comme une « absence de soi » (Lavine and Strand, 2002)

## B. LES “ARMES”

Les deux principaux tissus immuns chez la larve sont le corps gras et les cellules hématopoïétiques. Le premier organe, le corps gras (équivalent fonctionnel du foie des mammifères), est un organe acteur de la réponse humorale. Le deuxième « tissu » correspond aux cellules hématopoïétiques qui sont réparties dans les trois compartiments évoqués dans le premier chapitre.

### 1. LA RÉPONSE HUMORALE

La réponse humorale est une réponse antimicrobienne qui consiste l'activation de nombreux gènes de la réponse immunitaire dont les peptides antimicrobiens ou AMP (AntiMicrobial Peptides) sécrétés dans l'hémolymphe (Irving et al., 2001)(Tzou et al ; 2002 Bien que le mode d'action des AMP ne soit pas connu avec précision, leur activité antiseptique a largement été démontrée et leur spécificité vis-à-vis des différents types de microorganismes testée. Différents tissus ont la capacité de produire ces peptides : les epithelia tel que les intestins servant de première barrière protectrice; ainsi que le corps gras et les hémocytes circulants, deux autres acteurs de l'immunité (Ferrandon, 1998). Il existe des divergences concernant la mise en place de cette réponse selon le tissu. Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous intéresserons au mécanisme de la mise en place de cette réponse au niveau du corps gras larvaire ; réponse dépendante des facteurs REL et GATA (Senger et al., 2006).

La réponse humorale est discriminante par rapport aux micro-organismes infectieux. Un distinguo est réalisé lors de la reconnaissance de ces derniers via des récepteurs dédiés à l'identification des bactéries à Gram négatif, positifs ou des levures (*cf.* détection, les PRR). Cette distinction est traduite par l'activation de voies de signalisation différentes. En réponse à l'intrusion de bactéries Gram-positif ou de champignons la voie Toll est induite. Les bactéries Gram-négatif conduisent à l'activation de la voie IMD (IMMune Deficiency). Ces activations ne sont cependant pas totalement sélectives. Si la production des AMP Drosomycine et Dipéricine sont représentatives d'une activation de Toll et IMD

respectivement, le niveau des divers PAM est lui variable selon les microorganismes et les conditions.

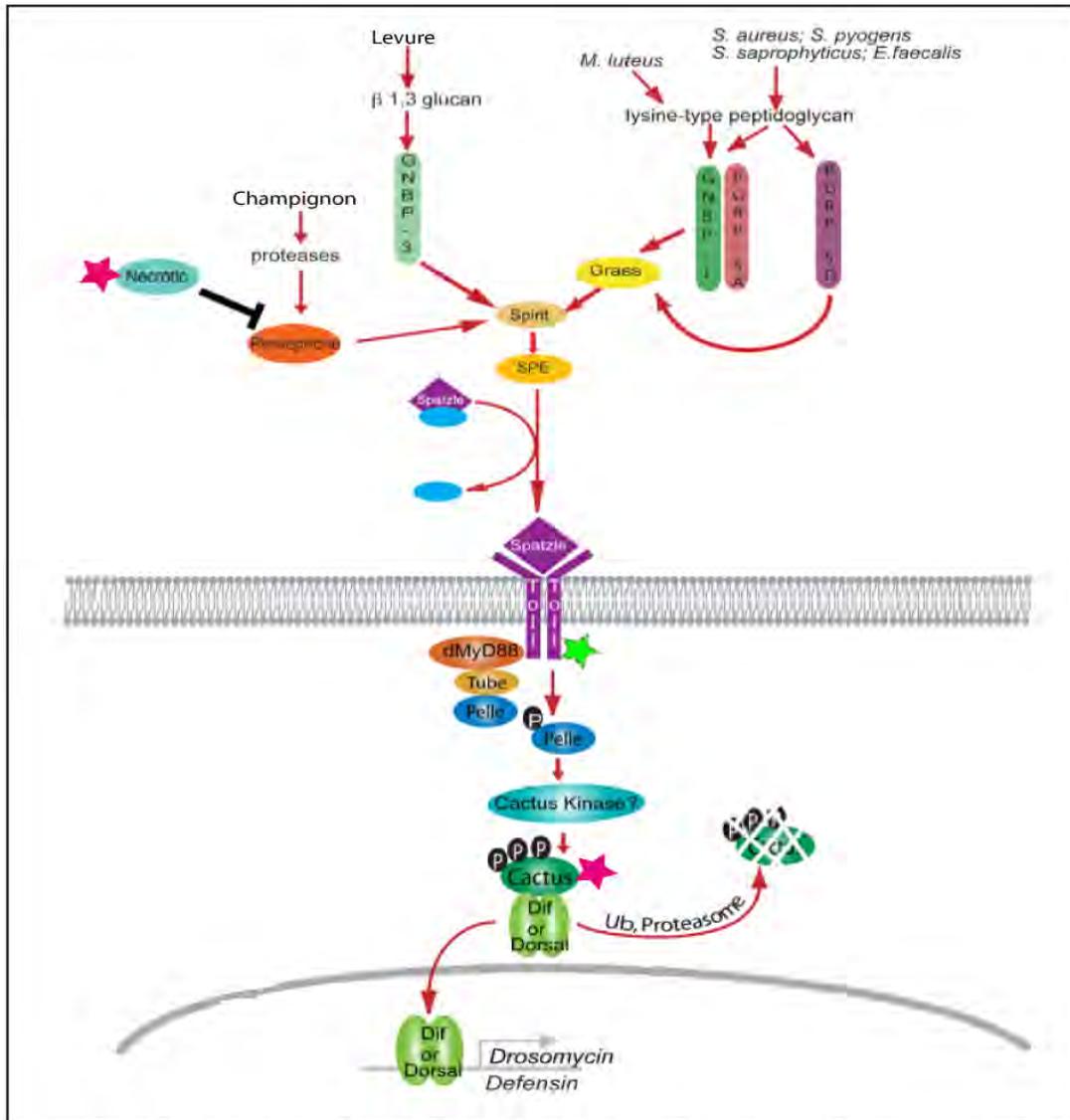
#### a) LA VOIE TOLL

La voie Toll qui a premièrement été identifiée pour mise en place de l'axe dorso-ventral chez l'embryon, joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire (Lemaitre et al ; 1996) Rutschmann et al ; 2002. Elle a été nommée d'après son récepteur Toll qui a conduit à l'identification, chez les mammifères, d'une classe de récepteurs ; les Toll-like Receptors (TLRs). Cette famille de molécules est caractérisée par un domaine extracellulaire riche en leucine (Leucine Rich Repeats, LRR) et un domaine intracellulaire Toll/IL-1 Receptor (TIR, domaine intracytoplasmique commun aux récepteurs Toll et de l'Interleukine 1 chez les mammifères) (Takeda and Akira, 2003). Les TLRs jouent un rôle dans la réponse inflammatoire en reconnaissant directement les motifs microbiens, contrairement à la Drosophile chez qui l'activation est due à la liaison avec une cytokine, Spätzle. Outre des similitudes entre les récepteurs, la voie Toll et la voie signalisation NF- $\kappa$ B des mammifères de nombreuses homologues sont présentes entre les effecteurs responsables de la transduction du signal (Aggarwal and Silverman, 2008).

Chez la larve, la voie Toll est impliquée dans la réponse systémique aux bactéries Gram positif et aux champignons (cf. figure 8) (Aggarwal and Silverman, 2008). De plus son activation constitutive est également associée à l'apparition de « tumeurs mélanotiques » (amas mélanisés de cellules hématopoïétiques) dont nous discuterons dans le chapitre suivant (Qiu et al., 1998). L'activation de la voie Toll sera décrite dans le cadre d'une infection aux petits pathogènes. Les effecteurs impliqués dans une activation constitutive semblent être les mêmes Les effecteurs de la voie dont une mutation induit un phénotype de « tumeurs mélanotiques » sont signalés sur la figure 8 par une étoile.

Le récepteur Toll ne se liant pas directement aux pathogènes, la reconnaissance s'effectue en amont. Bien que les détections soient sélectives, elles aboutissent toutes deux au clivage du ligand, Spätzle, via une cascade protéolytique. La liaison Toll/ Spätzle permet la transduction du signal qui requiert une activation successive de kinases permettant la translocation des facteurs de transcription Dorsal ou Dif (Dorsal-related

FIGURE 8 : LA VOIE TOLL



**La voie Toll.** (D'après Aggarwal *et al* ; 2008) L'infection est détectée soit directement par des PRR solubles dans l'hémolymphe tels que les PGRP-SA et SD reconnaissant les motifs des bactéries à Gram positif (peptidoglycan de type lysine). Soit, elle est détectée indirectement via l'activité des protéases des champignons qui sont des facteurs de virulence interprétés comme des « signaux de danger ». Ces deux modes de détection induisent l'activation d'une cascade protéolytique impliquant des sérines protéases à domaine CLIP (telle que Persephone pour les champignons). Necrotic (nec) encode un inhibiteur de sérine protéase de la famille des serpinines et dont l'activation constitutive conduit à une activation constitutive de la voie Toll dépendante de *persephone*. La dernière protéase de la cascade, SPE (Spätzle Processing Enzyme), clive le précurseur de la cytokine Spätzle. La molécule résultante est à même de se lier au récepteur Toll et, par conséquent, de l'activer. La transduction de la voie Toll requiert la mise en complexe de protéines à domaine « death »: dMyD88 (*Drosophila* Myeloid Differentiation primary response gene 88), Tube et Pelle. S'en suit la phosphorylation de l'inhibiteur Cactus, un homologue de la protéine Nf(kappa)B chez les mammifères. Le rôle de chaque protéine lors de ces étapes n'est pas clairement établi. La phosphorylation de Cactus conduit à sa polyubiquitination et dégradation ce qui permet de libérer le facteur de transcription qui lui était associé, Dorsal ou Dif (Dorsal-related immunity factor). Transloqué dans le noyau, le facteur de transcription se lie aux éléments de réponse des facteur Nf(kappa)B. Dif et Dorsal ont, chez la larve, un rôle redondant dans l'activation des gènes cibles : les gènes codant pour les AMP dont la drosomycine. Etoile : protéine dont la perte (rose) ou le gain (verte) de fonction du gène correspondant induit la formation de tumeurs mélanotiques.

immunity factor) (pour davantage de détails (*cf.* figure 8). De nombreux gènes cibles sont alors régulés et parmi eux, l'AMP Drosomycine qui est un considéré comme un marqueur d'activation de cette voie (Irving et al ; 2001).

## b) LA VOIE IMD

La voie IMD a été identifiée pour son rôle dans la réponse immunitaire ciblée aux bactéries Gram positif (pour revue : Lemaitre *et al*; 1995; Aggarwal and Silverman,2008). Le récepteur Imd (Immune deficiency), qui a été le premier membre identifié de cette voie de signalisation, est une protéine à DD (Death Domain). Ce récepteur présente des homologies avec la protéine RIP des mammifères appartenant au complexe adaptateur impliqué dans la signalisation TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ). D'autres acteurs de cette voie sont des homologues de molécules agissant dans la signalisation activée lors de la réponse inflammatoire.

L'activation de la voie IMD est dépendante des PRR dédiés à la reconnaissance des motifs de peptidoglycan de type DAP. La transduction du signal se fait selon différents embranchements qui aboutissent à l'expression de deux batteries de gènes cibles. Les AMP, dont le plus représentatif est la diptéricine, sont induits par le facteur de transcription Relish dont la translocation nucléaire est, notamment, dépendante du complexe de kinases IKK.

## 2. LA PHAGOCYTOSE

La phagocytose est un processus hautement conservé permettant l'élimination de petites particules. Ses particules peuvent correspondre à des cellules apoptotiques ou des petits pathogènes. La reconnaissance est associée à une phase d'opsonisation qui permet l'activation des plasmacytes en macrophages (Fauvarque and Williams, 2011). La particule ciblée est internalisée grâce à un remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine. De nombreux gènes impliqués dans ces processus contrôlent la réponse de phagocytose (Brennan et al., 2007; Matova and Anderson, 2006; Xavier and Williams, 2011). Une digestion de cette particule s'opère ensuite dans l'espace intracellulaire (pour revue *cf.* Stuart et al ; 2008).

### 3. LA MÉLANISATION

La mélanisation est une déclenchée par une cascade d'activation de protéases intégrant des composantes humorales et cellulaires. Les derniers effecteurs, les prophénoloxydases ou PO, ont pour substrat, la tyrosine, qu'ils oxydent (pour revue Söderhäll 1998). Les produits de cette réaction sont la mélanine et des réactifs intermédiaires d'oxygène et de nitrogène. Ces produits peuvent s'associer pour former des radicaux hydroxyles qui sont cytotoxiques (Söderhäll and Cerenius, 1998) (Cerenius Soderhall 2004). Les PO agissent dans l'hémolymphe où ils sont relargués sous forme inactive par les cellules à cristaux (RIZKI and RIZKI, 1959) (Crozatier et al., 2004). Un défaut de présence de ces cellules est associé à un défaut de mélanisation indiquant le rôle indispensable de ces cellules lors de ce processus (RIZKI and RIZKI, 1959; Braun et al., 1998; Galko and Krasnow, 2004). Les lamellocytes sont également des producteurs de PPO et pourraient prendre part à la mélanisation lors de l'encapsulation (Irving et al., 2005).

La régulation des deux composantes de la réaction de mélanisation permet de la contrôler afin d'éviter des activations délétères pour les cellules du soi. Les serpinines inhibent la cascade d'activation des PO. Parmi elles se trouve la Serpine-27A, dont l'action inhibitrice est levée en cas de contexte infectieux (DeGregorio et al ; 2002 Ligoxygakis et al ; 2002). En parallèle, le relargage des PO par les cellules à cristaux est circonstanciel. L'activation des cellules à cristaux implique une rupture de leur membrane plasmique qui est permise en réponse à certains facteurs : l'activation de la voies de « stress » JNK, les RhoGTPases qui jouent un rôle dans le cytosquelette ou encore l'activité du facteur de réponse à l'hypoxie Hif(alpha) (Bidla et al., 2007)(Mukherjee et al., 2011).

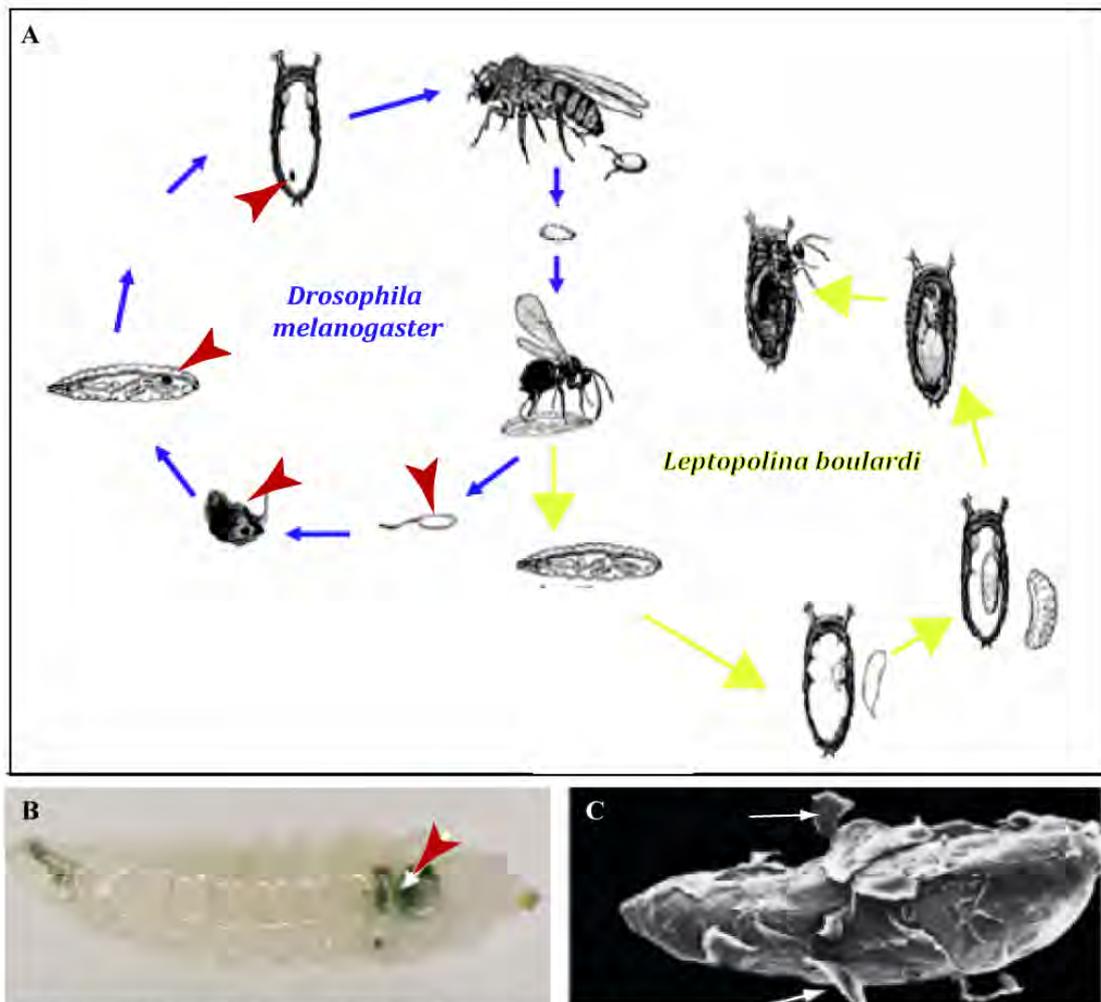
### 4. L'ENCAPSULATION

La réaction d'encapsulation est déclenchée par une incapacité à phagocyter. Des œufs de guêpes endoparasites ou des objets inertes et volumineux, introduits dans la cavité de la larve, induisent ce processus de neutralisation par isolement. Les hémocytes vont entourer le corps étranger par de multiples couches qui vont progressivement se mélaniser.

## a) LA DYNAMIQUE D'ENCAPSULATION

La dynamique de formation de la capsule mélanotique nécessite la coopération des réponses à médiation cellulaire et humorale. Trois principales étapes ont été décrites dans la littérature : l'initiation, le recrutement et la terminaison (Russo et al., 1996; Lavine and Strand, 2002). Les œufs de parasitoïdes détectés sont recouverts d'une couche dense aux électrons dont la nature n'est pas connue à ce jour (Russo et al., 1996; Williams et al., 2006). Il a été récemment proposé que cette couche soit constituée de protéines de la matrice extracellulaire qui seraient attractives pour les plasmotocytes (Howell et al., 2012). Durant les vingt premières heures, en adhérant à l'œuf, les plasmotocytes adoptent une conformation plus étirée et développent des filopodes dans le but de constituer une première couche cellulaire recouvrant entièrement le pathogène. Leurs propriétés adhésives sont également modifiées. Elles sont médiées par des récepteurs transmembranaires tels que TM9SF4 et Myosphéroïde qui permettent de détecter le substrat sur lequel se rattacher et de transmettre l'information qui engendre un remaniement du cytosquelette (Irving et al., 2005) (Bergeret et al., 2008). Cette première couche de cellules est indispensable à la phase de recrutement des lamellocytes (Williams et al., 2006; Russo et al., 1996). Dans les trente à quarante heures suivantes, des couches successives de lamellocytes permettent la croissance de la capsule (Williams et al., 2005; Williams et al., 2007) (*cf.* figure 9). Les lamellocytes subissent aussi des changements conformationnels importants lors de l'encapsulation (Sampson et al., 2012). La cohésion et l'étanchéité de l'ensemble sont assurées par des jonctions septées entre les hémocytes (Williams, 2009). L'arrêt de l'agrégation cellulaire pourrait être lié à l'épuisement d'hémocytes immunocompétents. Rizki et Rizki proposent que les lamellocytes des couches les plus externes possèdent des propriétés adhésives différentes de ceux des couches les plus internes (Rizki and Rizki, 1983). Cette capacité à consolider la capsule pourrait être liée à des modifications post-traductionnelles des protéines de surface des lamellocytes (Mortimer et al., 2012). Une fois une capsule intègre constituée, la réaction de mélanisation peut s'initier (Russo et al., 1996). Les cellules à cristaux, et très probablement les lamellocytes, ainsi que des facteurs humoraux

FIGURE 9 : LE PARASITISME CHEZ LA DROSOPHILE



**A. Cycles de vie de *Drosophila melanogaster* et *Leptopilina boulardi*.** Flèches bleues. Les œufs pondus par la femelle *Drosophile* éclosent pour donner des larves qui vont endurer 3 stades de mues. Au second stade, une femelle parasitoïde peut infecter les larves. L'œuf de la guêpe (têtes de flèche rouge), s'il est reconnu, est neutralisé par encapsulation. La capsule mélanotique restera dans l'individu qui poursuit son cycle de développement en passant par une étape de métamorphose suite à laquelle l'individu adulte émerge. Flèches jaunes. Si l'œuf de guêpe n'est pas neutralisé il va se développer au détriment de l'hôte et donner naissance à une guêpe adulte. **B,C. Capsule mélanotique.** B. Observation au travers la cuticule d'une larve L3w. C Oeuf de guêpe au cours d'encapsulation par les lamellocytes (flèches blanches). (D'après Nappi *et al*; 2009)

participent à la production de mélanine associée à la libération de radicaux cytotoxiques (Nappi et al., 2009). Cette ultime étape participerait à la mort du parasite. Le noircissement de la capsule ne serait pas le fait de la mélanisation mais de la nécrose des cellules encapsulées (Russo et al., 1996). La capsule va persister dans la cavité de l'animal sans en altérer le développement.

## b) ENCAPSULATION ET EVOLUTION

### (1) Chez les insectes

Chez de nombreux insectes, la capacité d'encapsulation est liée à leur habilité à produire un type cellulaire dédié à cette fonction. Chez *Drosophila melanogaster*, les lamellocytes sont indispensables à la constitution d'une capsule alors que chez le sphinx du tabac *Manduca sexta*, ce sont des granulocytes (Dean, Potter et al. 2004). Inversement, différentes espèces de drosophiles comme *Drosophila subobscura* (Eslin and Doury, 2006), *Drosophila azteca* et *Drosophila bifasciata*, incapables d'encapsuler des corps étrangers volumineux, sont démunies de lamellocytes (Sturtevant et al ; 1936). Trois espèces du groupe *subobscura*, *Drosophila affinis*, *Drosophila tolteca* et *Drosophila obscura* sont aptes à former des capsules mélanotiques (Eslin and Doury, 2006). Bien que limitée, l'encapsulation est assurée par des hémocytes qualifiés d'atypiques (Eslin et al., 2009). Ces « pseudopodocytes » sont morphologiquement entre les lamellocytes et les plasmatocytes (Havard et al., 2012).

### (2) En comparaison des vertébrés

L'encapsulation est une réaction de défense spécifique des insectes. Néanmoins, cette réaction présente des analogies avec deux réactions de type inflammatoire présentes chez les vertébrés : la thrombose et le granulome. Markus *et al* ; proposent une analogie avec le granulome (Márkus et al., 2009; Paddibhatla et al., 2010; Kleinhesselink et al., 2011). Ce terme médical désigne un amas constitué de cellules sanguines (des macrophages entourés de leucocytes), organisé en structure sphérique autour d'un agent central tel que l'œuf de shistosome ou un objet inerte. L'analogie porte sur deux

aspects : le déclenchement de la réaction et sa résultante. En effet, ces amas cellulaires, structurellement proches, se forment pour neutraliser un corps étranger résistant à la phagocytose. Fauvarque *et al*; comparent la réponse au parasitisme à la formation de caillot sanguin lors de la thrombose (Fauvarque and Williams, 2011; Howell et al., 2012) Les auteurs proposent que l'injection du parasitoïde dans la cavité abdominale mime une blessure vasculaire. Une première comparaison est faite concernant la dynamique des évènements. Les cellules hématopoïétiques s'activent au contact de composants de la membrane extracellulaire qui ont été, soit endommagés au niveau du site de lésion, soit déposés au niveau du pathogène. L'initiation de la réaction induit un changement important des propriétés adhésives des cellules. Le recrutement d'effecteurs complémentaires qui vont former des contacts cellulaires entre eux permet la croissance et la stabilisation du caillot ou de la capsule. Enfin, parmi les gènes activés pendant le processus d'encapsulation, se trouve l'homologue de *L1CAM*, *neuroglian* chez la Drosophile, qui joue un rôle dans l'agrégation des plaquettes. Ces deux modèles comparatifs s'accordent sur l'aspect inflammatoire de la réaction. La construction de la capsule par couches successives d'hémocytes adhérents nécessite le recrutement des trois compartiments hématopoïétiques. De plus, l'implication d'ADGF-A, un modulateur de l'inflammation chez les vertébrés, a récemment été démontré dans la construction de la capsule (Novakova and Dolezal, 2011).

## C. LA COORDINATION DE LA DÉFENSE

Le déclenchement de la réponse immunitaire est conditionné par l'activation de cellules immunes adaptées à la menace détectée. Chez la larve, l'acquisition de cette capacité des cellules immunitaires à exercer leur fonction ou « immunocompétence » présente quelques particularités qui seront mentionnées. Nous allons nous intéresser à la mise en place des réponses et à l'impact de cette dernière sur l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. Les réponses aux tissus endommagés et aux petits pathogènes seront brièvement évoquées. Nous nous concentrerons sur la réponse aux gros pathogènes.

### 1. IMMUNOCOMPÉTENCE

L'immunocompétence des acteurs immunitaires est régulée pendant les différents stades larvaires. Elle est liée au niveau d'ecdysone ; l'hormone de régulation des mues. Le corps gras est un organe dont les cellules présentent une homogénéité en termes de maturation. A partir du stade L3 la capacité à induire la réponse humorale est optimale. (Meister and Richards, 1996). En revanche, les hémocytes représentent une population « chimérique » en termes développementale. L'impact de cette hormone est différent selon les populations ciblées. Des hémocytes d'origine embryonnaire, matures et opérationnels, côtoient des cellules « naïves ». Le niveau d'ecdysone joue sur les propriétés adhésives des plasmotocytes en circulation. (Dimarcq et al., 1997; Sorrentino et al., 2002) . Dans la glande lymphatique, c'est la capacité des prohémocytes à proliférer et produire des lamellocytes qui est régulée (Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002). Une fenêtre de compétence s'ouvre entre les stades L2 et L3.

## 2. RÉPONSE AUX TISSUS ENDOMMAGÉS

Lors de la réponse au soi altéré, des signaux de dangers instruisent le système immunitaire d'une rupture de l'homéostasie. Des mécanismes semblables à ceux impliqués dans l'inflammation chez les vertébrés permettent le recrutement d'hémocytes adhérents. Les cellules tumorales ou les tissus blessés émettent des signaux de « stress » en activant la voie de signalisation JNK (Pastor-Pareja et al., 2008; Babcock et al., 2008; Kelsey et al., 2012). La voie JAK-STAT est ensuite séquentiellement induite dans le tissu en détresse et les acteurs de la réponse. Une communication systémique s'engage grâce à la diffusion de cytokine. Tout d'abord, le corps gras sert de relais amplificateur. Puis, les hémocytes vont proliférer pour augmenter les nombres de plasmotocytes (Babcock et al., 2008). Dans ces contextes, seul le compartiment circulant est mobilisé pour nettoyer les débris cellulaire et contenir une invasion potentielle (dans le cas de blessures).

## 3. RÉPONSE AUX PETITS PATHOGÈNES

Les petits pathogènes sont neutralisés par l'action concertée du corps gras, principal producteur d'AMP, et des hémocytes qui phagocytent ces microorganismes. Le corps gras n'étant pas mobile et ayant un spectre de reconnaissance restreints de PAM, le déclenchement de cette réponse peut être d'ordre systémique (Foley and O'Farrell,

2003; Brennan et al., 2007). Les plasmatocytes peuvent servir de relais de communication pour instruire cette réponse. L'efficacité de la réponse contre les pathogènes requiert certes la production de peptides antimicrobiens par le corps gras mais un nombre suffisant d'hémocytes immunocompétents. Les protéines, Dif et Dorsal, de la famille REL/NfκB sont requises pour l'activité des tissus immuns et leur coordination (Matova and Anderson, 2006; Matova and Anderson, 2010). En contexte infectieux, la prolifération des hémocytes circulants est stimulée. Dans deux cas répertoriés d'ingestion de microorganismes par voie orale, une induction modérée de lamellocytes est même observée en circulation et dans la glande lymphatique (Frandsen et al., 2008; Jin et al., 2009). Bien que l'organe hématopoïétique ne semble pas prendre directement part à l'élimination de ces petits pathogènes (bactéries ou champignon), des régulations croisées entre les voies Toll et Notch s'établissent pour une modification ponctuelle du programme génétique au sein de cet organe (Jin et al., 2009). L'homéostasie de la glande lymphatique peut donc être influencée par les infections par des petits pathogènes.

#### 4. RÉPONSE AU PARASITISME

De nombreuses espèces d'hyménoptères, on en dénombre pas moins d'une cinquantaine, infestent les larves de *Drosophila* (Carton and David, 1985). Le dépôt dans la cavité abdominale des œufs de ces endoparasites, appartenant notamment aux genres *Leptopilina*, *Asobara* et *Ganopsis*, induit la réponse d'encapsulation (cf. figure 9).

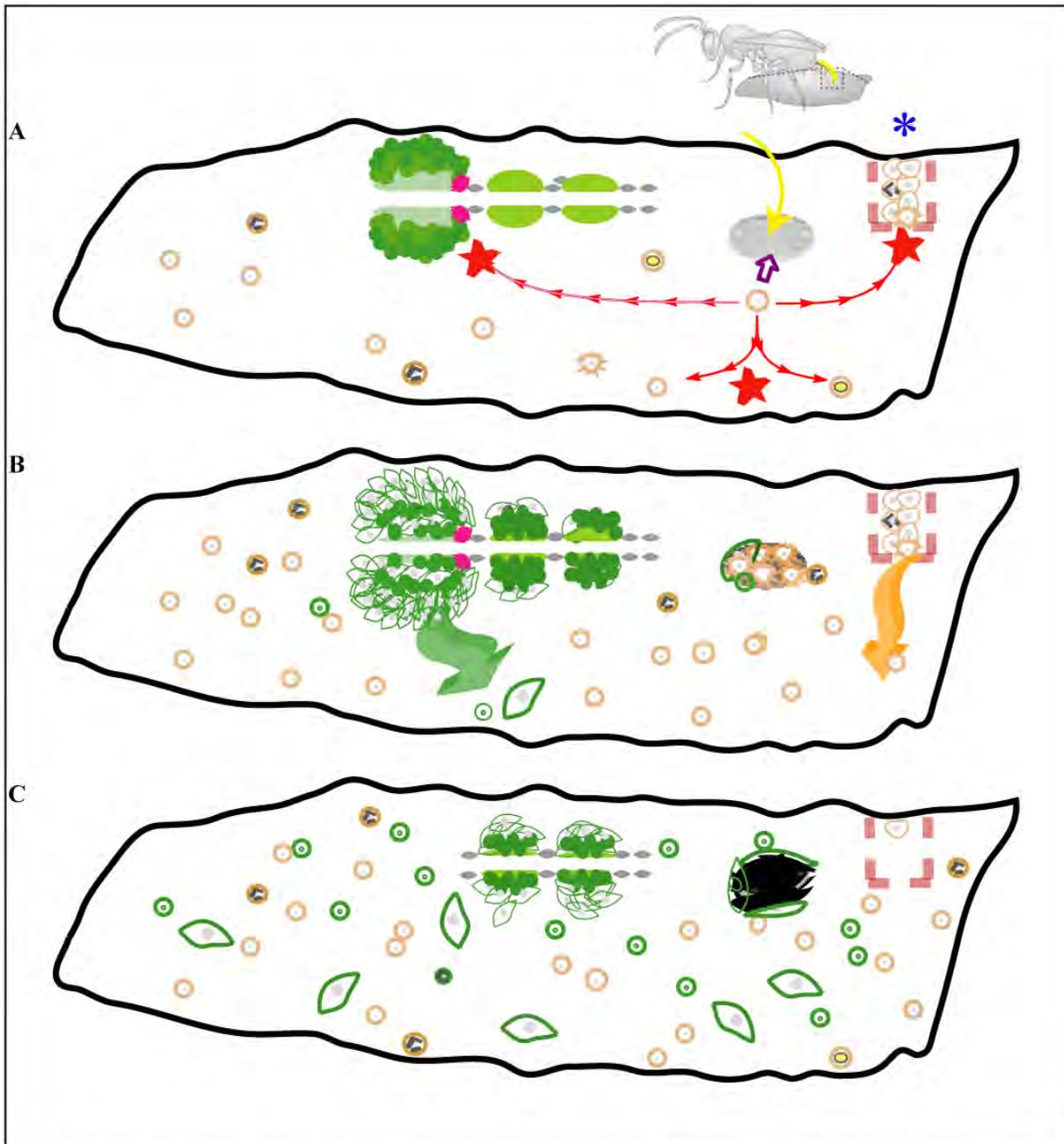
Une régulation génique des différentes étapes de cette réponse serait mise en place. L'analyse du transcriptome de larves parasitées par la guêpe *Asobara tabida* révèle l'induction d'un programme génétique différent de celui requis pour la réponse aux petits pathogènes (Wertheim et al., 2005). L'exécution de ce programme serait néanmoins dépendante des facteurs GATA, NF-κ B/REL and Stat impliqués dans l'immunité humorale et l'hématopoïèse. Cette étude révèle également la présence de nombreux gènes impliqués dans le remaniement du cytosquelette et l'adhésion cellulaire qui sont importants pour l'activation des hémocytes. L'expression d'*hemese* qui module la réponse d'encapsulation est par exemple contrôlée au cours du temps (Kurucz et al., 2003).

Le déclenchement de cette réponse implique une modification drastique de

l'homéostasie des hémocytes qui culmine avec la désintégration de l'organe hématopoïétique (*cf.* figure 10). Dans cet organe, l'hématopoïèse est réorientée pour produire massivement des hémocytes un nouveau type cellulaire. Un pic de prolifération, observé 6 heures après l'infection, est suivi par une différenciation massive des hémocytes en lamellocytes (Krzemien et al., 2010). 24 heures après l'infection les hémocytes sont libérés dans la circulation (Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002). Les autres compartiments hématopoïétiques sont également mobilisés pour augmenter le nombre d'hémocytes qui vont aussi participer à la constitution de la capsule.

Des communications systémiques permettent de coordonner l'hématopoïèse et la réponse cellulaire (*cf.* figure 10). La glande lymphatique n'étant pas en contact avec le parasite, elle doit être informée de la présence de ce dernier. Russo et ses collaborateurs postulent que les plasmacytes circulants qui sont les premiers recrutés sur l'œuf sont les effecteurs de cette signalisation systémique (Russo et al., 1996). Agaisse *et al.* propose que la voie JAK-STAT serve de voie de communication entre ces acteurs (Agaisse and Perrimon, 2004). La réaction d'encapsulation des parasites est également considérée, depuis peu, comme une réaction de type inflammatoire (Novakova and Dolezal, 2011). La construction de la capsule par couches successives d'hémocytes adhérents serait modulée par ADGF-A, présenté comme un rapporteur de l'inflammation (Novakova and Dolezal, 2011).

FIGURE 10 : LA REPONSE AU PARASITISME



**A,B,C.** Schéma de la répartition des hémocytes d'origine embryonnaire (orange) et larvaire (vert) dans la larve de *Drosophile* aux stades L2 (A) et L3 (B et C). Les cellules hématopoïétiques sont distribuées entre la circulation, les îlots sessiles (\*) et l'organe hématopoïétique. **A.** Une femelle endoparasite a pondu un œuf (ovale gris clair) dans la cavité de la larve (flèche jaune). L'intrusion du pathogène est détectée (flèche mauve). Une communication systémique (flèches rouges) induit une modification de l'homéostasie des différents compartiments hématopoïétiques (étoiles rouges) **B.** Les plasmatocytes circulants sont les premiers à reconnaître le corps étranger et à y adhérer. Les îlots sessiles sont mobilisés (flèche orange). Les hémocytes de la glande lymphatique prolifèrent et initient leur différenciation en lamellocytes qui sont libérés dans l'hémolymphe. **C.** Les lamellocytes libérés par la glande lymphatique participent à l'encapsulation de l'œuf de parasite. Lorsque la capsule est constituée, la mélanisation est déclenchée.

### III. LES TUMEURS MÉLANOTIQUES

#### A. HISTORIQUE : 100 ANS D'OBSERVATIONS !

Chez la drosophile, les capsules ou « tumeurs » mélanotiques correspondent à des amas, variables en taille, de cellules mélanisées. Du fait de la présence de mélanine, elles sont visibles au travers de la cuticule des larves au stade L3. L'implication des cellules hématopoïétiques dans la formation de ces capsules, et particulièrement des lamellocytes dont la différenciation est initiée en absence de parasitisme, a pu être démontrée (RIZKI, 1960)(Watson et al., 1991). Les lamellocytes s'agrègent entre eux et forment une capsule (Gateff, 1978; Minakhina and Steward, 2006). Dans certains contextes la présence de tissus larvaire annexe tel que le corps gras peut être décelée (Corwin and Hanratty, 1976).

Le nom de tumeur ou pseudotumeur fait référence à l'historique de ce phénotype observé en concomitance avec une hyperplasie de la glande lymphatique lors des premiers cribles larvaire visant à identifier des gènes suppresseurs de tumeurs (SCHARRER and LOCHHEAD, 1950). En regard de ce qui avait été découvert chez l'homme, ces gènes suppresseurs de tumeur étaient supposés contrôler la prolifération cellulaire. La modification de la taille d'un organe apparaissait ainsi comme un indicateur que ce processus était perturbé. De nombreux autres mutants seront classés pour le même phénotype de tumeur mélanotique. Ce phénotype de capsules mélanisées, observé dans de nombreux contextes mutants, est un phénotype repéré par les premiers généticiens, comme par exemple le mutant [tu-bw](#) identifié par Morgan en 1922. Cependant, sur la centaine mutations répertoriées dans la bibliographie et dans [Flybase](#), une vingtaine n'est toujours pas, à ce jour, associée à un gène donné. Cette différence tient au fait que la majorité d'entre elles ont été découvertes avant le décryptage complet du génome (Lindsley et al., 1967).

L'appellation attribuée aux mutants était évocatrice : « tumeur » ou encore « néoplasme malin du sang » ou *l(3)mbn-1* (Gateff, 1977)(Watson et al., 1991). Ce dernier exemple pointe sur une autre notion dégagée par des études plus approfondies des cellules hématopoïétiques qualifiées de cellules tumorales, celle de l'autonomie de leur transformation (Hanratty and Ryerse, 1981; Gateff and Mechler, 1989; Török et al., 1993). En effet, des expériences de transplantation de glandes lymphatiques issues de larves mutantes dans l'abdomen d'adultes ont pu établir la capacité, variable selon les contextes, de ces cellules à continuer de proliférer et, parfois même, à tuer leur hôte. En se basant sur ces critères d'hyper-prolifération et d'autonomie, Dearolf propose même que certains de ces contextes puissent être présentés comme des « leucémies chez la mouche du fruit » (Dearolf, 1998). Certains mutants de tumeurs mélanotiques pourraient ainsi servir de modèle d'étude pour la compréhension des leucémies chez l'homme.

Cette interprétation concernant la genèse des « tumeurs mélanotiques » ne peut s'appliquer à l'ensemble des contextes phénotypiques. D'une part, l'autonomie de la transformation n'a été étudiée et démontrée que dans un nombre restreint de contextes. D'autre part, cette hypothèse implique que le défaut originel soit intrinsèque aux constituants de la capsule ; les hémocytes. Ce dernier point n'est, en effet, pas toujours vrai selon les mutations. Une seconde interprétation est proposée dans la littérature : la formation des tumeurs est assimilée à une réaction d'encapsulation de type « pathologique ». Elle serait comparable à la réaction d'encapsulation "physiologique" qui est déclenchée par l'intrusion d'un parasite dans la larve de la drosophile. La démonstration ayant été apportée que ces lamellocytes « mutants » ont la capacité d'encapsuler les œufs des endoparasites tel que *Leptopilina boulardi*, ces contextes servent ainsi de modèle afin de mieux comprendre cette réaction immunitaire (Nappi, 1975). Des expérimentations sont, par exemple, menées afin de savoir si l'encapsulation de parasites résistants à cette réaction est affectée de manière similaire à celle produite par des lamellocytes sauvages (Rizki and Rizki, 1994). Les travaux réalisés justifient la comparaison entre ces réactions d'encapsulation.

## B. ORIGINE DES “TUMEURS MELANOTIQUES”

### 1. CLASSIFICATION SELON WATSON

L'étude bibliographique révèle une diversité des capsules mélanotiques au niveau de leur composition ou encore de leur fréquence d'apparition. Entre les contextes répertoriés, la pénétrance du phénotype de prolifération peut également être variable avec des organes hématopoïétiques hypertrophiés conduisant parfois à l'éclatement précoce. Cette hétérogénéité du phénotype a conduit Watson à proposer une classification basée sur l'origine supposée de la formation des capsules mélanotiques. En conséquence, les mutations sont classiquement divisées en deux catégories (Watson et al., 1991; Dearolf, 1998).

1. des mutations de classe I impliquant une modification d'un tissu non hématopoïétique, qui décelé comme altéré, est encapsulé puis mélanisé. Cette réaction est qualifiée de réaction de type « auto-immune » et fait appel à un système hématopoïétique intègre (Rizki et al ; 1957)
2. des mutations de classe II, « la vraie classe de tumeur sanguine », affectant les voies de régulation interne des hémocytes eux-mêmes impliquant, notamment, une hyper-prolifération de l'organe hématopoïétique, une différenciation des lamellocytes, leur agrégation et mélanisation (Oftedal et al ; 1953, Rizki, 1960).

A ce jour, parmi tous les mutants répertoriés, seule l'étude de deux d'entre eux suggère qu'ils font partie de la première classe : *kurtz* - codant pour une arrestine non visuel - et *spaghetti* -codant pour une protéine de la famille des TRP capable d'interagir avec Hsp90- (Roman et al., 2000; Minakhina and Steward, 2006). La perte de fonction du gène *kurtz*, dont l'expression est détectée dans le corps gras mais pas dans la glande lymphatique, conduit à sa désintégration ce qui serait l'élément déclencheur de la réponse des cellules immunitaires. Concernant la perte de fonction du gène *spaghetti*, les tissus à l'origine de la réponse seraient les disques imaginaires. Néanmoins, une analyse phénotypique plus détaillée serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

La majorité des mutations connues sont rangées dans la seconde classe. Parmi les gènes caractérisés, apparaissent, des gènes jouant un rôle clé dans l'hématopoïèse. Par

exemple, « *Tumourous-lethal* » qui sera ensuite identifié comme un allèle gain de fonction du gène *Hopscotch* codant pour un récepteur tyrosine-kinase de type JAK, influe dramatiquement sur la prolifération cellulaire (Corwin and Hanratty, 1976; Hanratty and Dearolf, 1993). Cette mutation induit une activation constitutive de la voie JAK/STAT et le développement de glandes lymphatiques extrêmement grosses contenant des lamellocytes ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules circulantes (Harrison et al., 1995). Une hyperprolifération associée à une différenciation massive des cellules hématopoïétique en lamellocytes est également observée dans différent contextes de perte de fonction sans que l'on puisse déterminer si ces évènements sont reliés l'un à l'autre (Konrad et al., 1994; Remillieux-Leschelle et al., 2002; Sinenko et al., 2004) .

Les mutations de classe 2 incluent aussi des gènes connus pour être impliqués dans l'immunité de la Drosophile comme des acteurs de la voie Toll. Une mutation qui induit à une activation constitutive de la voie comme un gain de fonction *Toll* ou une perte de fonction de *cactus*, conduit à la formation de capsules mélanotiques (Lavine and Strand, 2002; Qiu et al., 1998; Lemaitre et al., 1995). Dans ce cas, une production constitutive et concomitante de la production de peptides antimicrobiens est décelée dans le corps gras sans que l'on puisse établir un lien de causalité entre la réaction cellulaire et humorale.

De manière plus inattendue, des mutations dans des gènes aux fonctions plus générales tels que le gène de « ménage » *rpS6* -protéine ribosomale S6 ou des modificateurs de chromatine tel que *multi sex combs* ou *Su(Var)29502* -suppresseur de variégation - causent aussi le développement de tumeurs mélanotiques (Watson et al., 1992; Minakhina and Steward, 2006). L'expression de ces gènes n'est pas restreinte aux hémocytes et, concernant *rpS6*, elle est même ubiquitaire. Comment des mutations dans ces gènes aux fonctions potentiellement pléiotropiques modifient le programme hématopoïétique et provoquent la formation de tumeurs mélanotiques reste à élucider.

En fait, dans de nombreux cas publiés, il n'est pas toujours possible d'affirmer que c'est l'altération de la fonction du gène dans les hémocytes qui est à l'origine de la formation des capsules mélanotiques. Afin d'éviter cette écueil, des études dans lesquelles la perturbation de la fonction était ciblée aux cellules sanguines ont été menées. Une première étude, a été réalisée dans le but de tester la contribution de différentes voies de signalisation dans la prolifération des cellules hématopoïétiques et leur

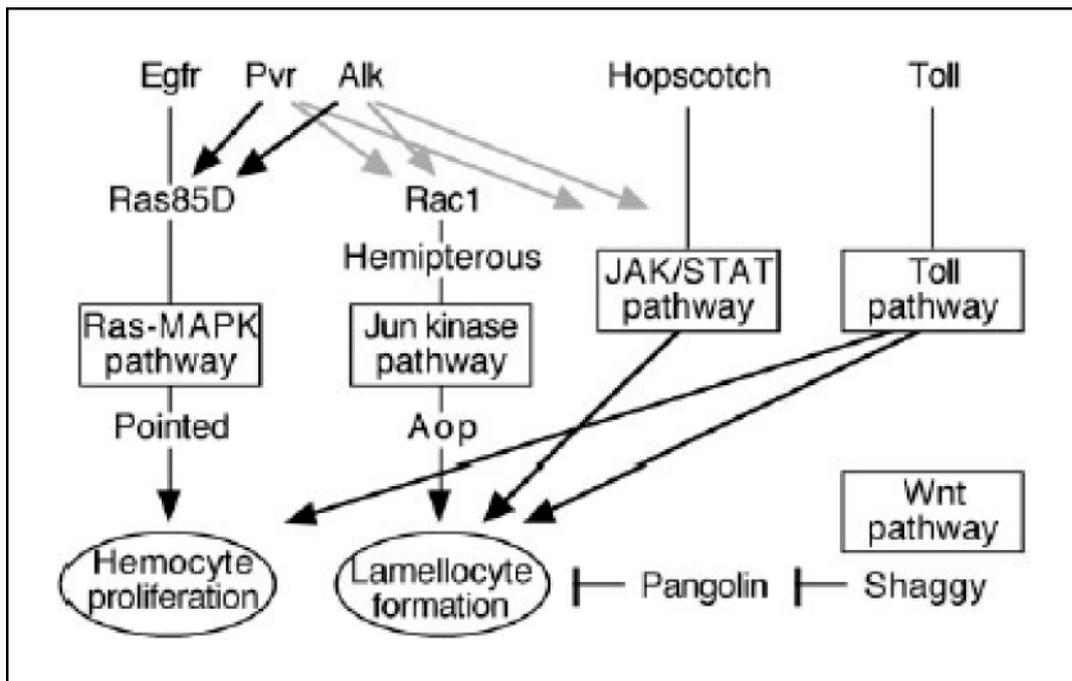
différenciation massive en lamellocytes en exprimant spécifiquement dans les hémocytes des versions normales, constitutivement actives ou dominantes négatives de composants de différentes voies (*cf.* figure 11) (Zettervall et al., 2004). Cette analyse confirme le rôle inducteur des voies Toll et JAK/STAT dans la formation des lamellocytes. et a mis à jour un effet inhibiteur de la voie Wnt dans ce processus. La voie des Ras-MAPK kinase semble uniquement moduler la prolifération des hémocytes. Ces expériences reposant sur la surexpression de transgènes sont, cependant, à interpréter avec précaution dans la mesure où des effets annexes, sans rapport avec la fonction normale du gène ciblé, peuvent apparaître.

Dans une seconde étude, les deux approches, générale et ciblée, ont été combinées. L'analyse de la perte de fonction du gène *ADGF-A* (facteur de croissance A associé à la désaminase d'adénosine) a mis en évidence la présence de tumeurs mélanotiques associées à un corps gras désintégré (Dolezal et al., 2005). Les auteurs ont voulu comprendre si cette dislocation du corps gras était la cause ou la conséquence de l'encapsulation. Des expériences de sauvetage ciblées aux hémocytes ont permis de réduire drastiquement le phénotype, arguant d'un rôle actif des cellules hématopoïétiques dans cette altération. Pour démontrer que l'activation des hémocytes était cruciale, ils ont réalisé des doubles mutants *adgf-a, croquemort*. Croquemort est un récepteur qui permet aux macrophages de reconnaître les cellules apoptotiques (*cf.* chapitre II). Dans ce contexte génétique, le corps gras ne se désagrège pas et aucune tumeur mélanotique, ni même la différenciation massive des lamellocytes n'est observée.

## 2. UN ASPECT DÉVELOPPEMENTAL

Dans la littérature, un faisceau d'éléments pointe sur une régulation développementale de l'émergence des tumeurs mélanotiques. Elles sont observables à partir du milieu du stade L3 indépendamment du gène, du type et du moment d'induction des mutations. En effet, les perte/gain de fonction zygotiques n'induisent pas de formation de tumeurs plus précocement que quand on cible directement les cellules hématopoïétiques larvaire. De plus, le mutant *Hop<sup>tuml</sup>* dont le phénotype varie selon la température d'élevage, voit sa fenêtre de thermo-sensibilité s'ouvrir au stade L2 (Hanratty and

FIGURE 11 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ACTIVATION DES HEMOCYTES



**Voies de signalisation impliquées dans l'activation des hémocytes.**

(D'après Zetterval et al ; 2004) Pour plus de simplicité les voies sont représentées indépendamment bien qu'il ne soit pas exclu qu'elles puissent agir en série. Les possibles signalisations croisées entre les facteurs ETS Pointed et Ago ne sont pas symbolisées sur ce schéma. Les têtes flèches symbolisent une action activatrice alors que les barres verticales représentent une action inhibitrice.

Dearolf, 1993). Un autre fait notable est le délai apparent entre la dislocation précoce du corps gras, qui s'amorce au stade L2, et la formation des tumeurs mélanotiques chez les mutants *kurtz* et *tumourous<sup>w</sup>* (Roman et al., 2000; Rizki, 1957). Par ailleurs, la période d'apparition des capsules mélanotiques concorde avec celle où les précurseurs hématopoïétiques acquièrent la capacité à se différencier en lamellocytes. Des travaux réalisés sur des mutants de l'ecdysone en condition parasitaire montrent que cette hormone, confère également aux hémocytes cette compétence, car dans ce contexte génétique, la propension à former des lamellocytes -et donc à encapsuler la pathogène- est fortement restreinte (Garen et al., 1977; Sorrentino et al., 2002) . L'analyse du double mutant *ecdysone/Hop<sup>tuml</sup>* permet d'observer un sauvetage partiel de la pénétrance et de l'intensité du phénotype de tumeurs mélanotiques et met ainsi en évidence l'effet potentialisateur de cette hormone sur la différenciation des lamellocytes. La formation des tumeurs mélanotiques serait, par conséquent, tributaire de la compétence/maturation immunitaire des cellules hématopoïétiques.

### C. LE MODÈLE DE FORMATION

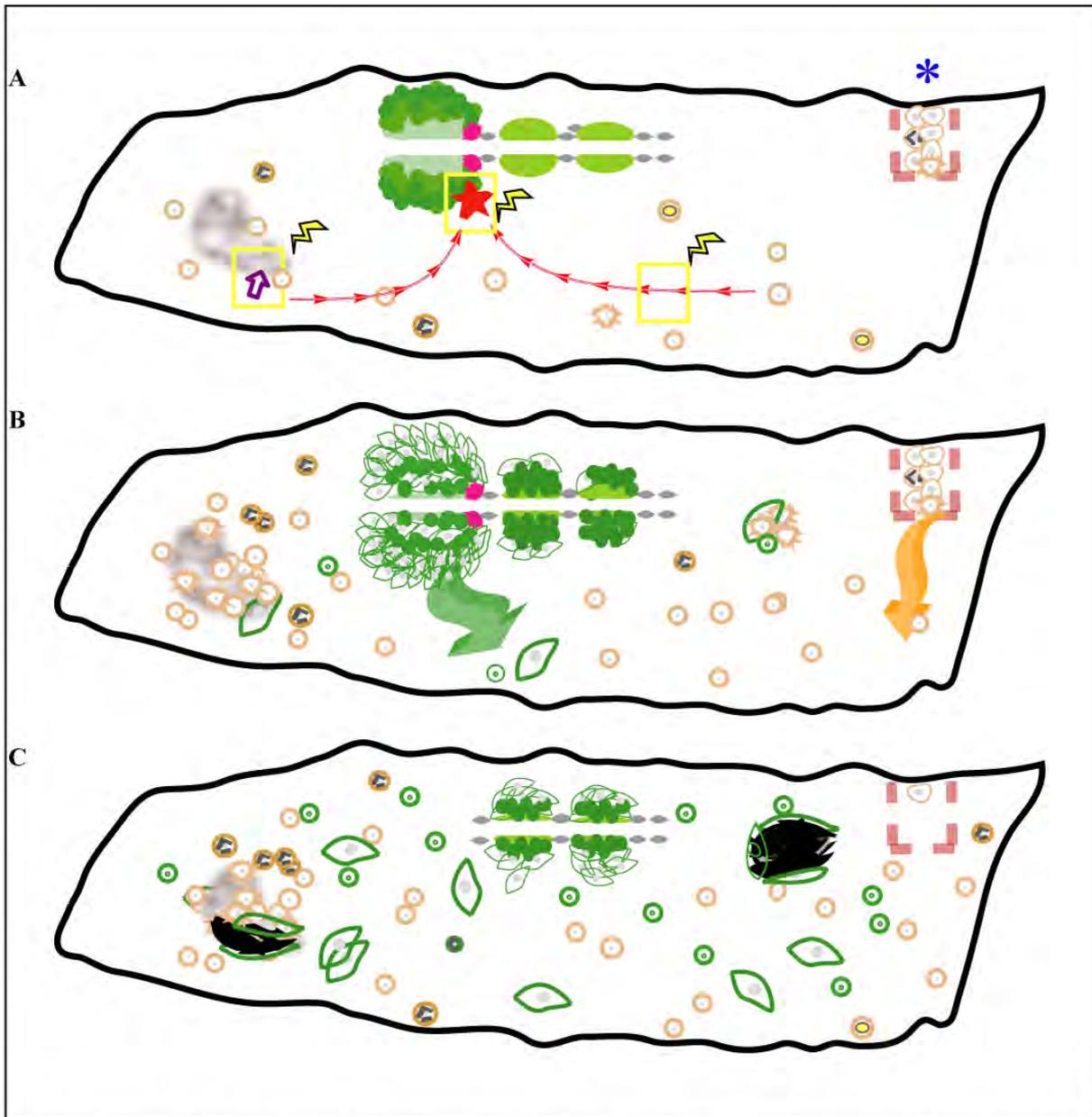
L'ensemble des données bibliographiques nous permet d'établir un modèle de formation des capsules mélanotiques dans les différents contextes mutants. Leur formation est associée à une modification importante de l'homéostasie des cellules hématopoïétiques qui prolifèrent et se différencient massivement en lamellocytes. La modification du programme hématopoïétique peut être causée par des mutations affectant directement le programme hématopoïétique. Une induction indirecte due à une activation des hémocytes circulants ou à un défaut de communication est aussi envisageable.

Les différentes étapes de formation des tumeurs mélanotiques sont exposées et résumées dans la figure 12 et exposées dans les paragraphes suivants. En revanche, nous n'aborderons pas en détails l'induction du programme lamellocyte qui a déjà été développé dans la première partie (*cf.* Hématopoïèse de la glande lymphatique).

## 1. LA « TUMEUR MELANOTIQUE » : CONSTITUTION ET CONSTITUANTS

La « tumeur mélanotique » est le résultat d'une encapsulation pathologique du soi. Bien que l'élément initiateur de cette réaction soit différent d'une réponse cellulaire physiologique, les étapes d'agrégation des cellules entre elles ainsi que de mélanisation de l'amas cellulaire sont considérées comme similaires dans les deux types d'encapsulation. L'analyse de la composition des tumeurs mélanotiques dans différents contextes mutants réalisée par Minakhina confirme que les lamellocytes sont un élément constitutif des capsules (Minakhina and Steward, 2006). Cet examen approfondi a également révélé l'existence d'une classe de capsules réminiscentes des tumeurs des vertébrés car constituées d'hémocytes et d'agglomérat de tissus « transformés ». Le seul contexte dans lequel elle apparaît est la perte de fonction du gène *cactus* ce qui suggère que ces amas puissent être engendrés par une activité incontrôlée de l'activité de la protéine NF-κB Dorsal (*cf.* chapitre II). Les tumeurs mélanotiques peuvent être constituées uniquement d'hémocytes ou d'hémocytes associés à un tissu pris comme cible par ces derniers. Parmi les cellules hématopoïétiques, si les lamellocytes sont un élément constitutif des capsules, la contribution des deux autres types cellulaire (plasmacytes et cellules à cristaux), reste à étudier. La mélanisation de la capsule suggère que les cellules à cristaux puissent participer à ce phénomène mais leur degré d'implication n'a pas été évalué. De plus, les lamellocytes expriment une PO, DoxA3, et pourraient donc contribuer directement à la mélanisation (Irving et al., 2005). En termes de compartiments hématopoïétiques, il est généralement proposé dans la littérature que la glande lymphatique est le contributeur majeur aux amas cellulaire dans la mesure où les lamellocytes se différencient massivement au sein de cet organe qui est souvent hypertrophié ou a "explosé" précocement dans ces contextes mutants. Néanmoins, les observations de Zettervall indiquent que les cellules des îlots sessiles sont également mobilisées lors de la formation de capsules, aussi bien en cas de parasitisme que dans les contextes mutants (Zettervall et al., 2004). Ce constat plaide en faveur d'une contribution des autres compartiments cellulaires à la formation des tumeurs mélanotiques.

FIGURE 12 : LE MODELE DE FORMATION DES CAPSULES MELANOTIQUES



**A,B,C.** Schéma de la répartition des hémocytes d'origine embryonnaire (orange) et larvaire (vert) dans la larve de *Drosophile* aux stades L2 (A) et L3 (B et C). Les cellules hématopoïétiques sont distribuées entre la circulation, les îlots sessiles (\*) et l'organe hématopoïétique. **A.** Les stimuli pouvant causer une activation du système immunitaire sont représentés par les carrés et éclairs jaunes. A noter qu'ils sont induits indépendamment dans différents contextes génétiques. De gauche à droite : une reconnaissance (flèche mauve) défailante, une modification directe du programme hématopoïétique (étoile rouge) ou indirecte (flèche rouge). A noter qu'ils interB, C. Les étapes relatives à l'encapsulation des objets sont représentées. Elles sont similaires à celles de l'encapsulation des pathogènes (*cf.* figure 10 )

## 2. RECONNAISSANCE D'UN TISSU ALTÉRÉ

Dans la description qui est faite de la formation des capsules mélanotiques, un des événements initiateurs est la « reconnaissance d'un tissu altéré ». L'hypothèse sous-jacente est que l'organisme, en plus de se défendre contre des agents pathogènes, est également capable de se protéger des dangers endogènes. Une réponse immunitaire serait initiée afin de les contenir et/ou de les éliminer. L'encapsulation serait déclenchée dans ce but. Pour se faire, une distinction doit être établie entre un tissu sain et anormal. Les données bibliographiques suggèrent qu'un tel mécanisme est à l'œuvre chez la *Drosophile*. En effet, des expériences réalisées par Rizki *et al*, révèlent la capacité des lamellocytes à encapsuler des transplants de corps gras à condition que leur membrane basale ait été préalablement altérée (Rizki and Rizki, 1980). Ces travaux ont été menés dans un contexte mutant (chez qui la formation des lamellocytes est constitutive) *tumorous-Sz* qui était évalué par rapport à un contexte sauvage. Dans une larve contrôle, la transplantation homotypique ne déclenche ni la différenciation massive de lamellocytes, ni la formation de capsules mélanotiques. En présence de lamellocytes, l'immunogénicité de l'implant réside dans son absence d'intégrité (détérioration de la membrane basale). En revanche, dans un contexte sauvage ce même tissu n'est pas immunogène. Ce dernier point n'a pas été davantage investigué par les auteurs. La différenciation des lamellocytes ayant un aspect développemental, il est envisageable que la stimulation immunitaire ne soit pas opérée dans la fenêtre de temps requise.

## 3. RÉPONSE SYSTÉMIQUE ET COMMUNICATION CELLULAIRE

La formation des capsules mélanotiques est intrinsèquement liée au déclenchement du programme de différenciation des lamellocytes qui est amorcé dans la glande lymphatique. Au sein de cet organe, une communication entre les zones corticales, médullaire et le centre signalisation postérieur permet l'orientation du destin cellulaire. Comme précisé dans le chapitre 1, les voies de signalisation et gènes mis en jeu ne sont pas encore tous caractérisés. Afin que l'engagement dans la voie de différenciation des lamellocytes puisse être initiée, la glande lymphatique doit être informée d'un danger potentiel ; directement ou par l'intermédiaire d'un relais. Les cellules hématopoïétiques circulantes pourraient jouer ce rôle informatif du fait de leur capacité à distinguer les pathogènes et les cellules apoptotiques et à produire des cytokines (Agaisse et al., 2003;

Agaisse and Perrimon, 2004). Par ailleurs et bien que leur contribution exacte n'ai pas été déterminée, les cellules des îlots sessiles semblent également être recrutées dans le cadre de la formation de capsules mélanotiques (Zettervall et al., 2004). Une coordination semble donc s'établir entre les différents compartiments hématopoïétiques durant la réponse cellulaire, Néanmoins, la nature des signaux permettant cette coordination reste à déterminer.

#### 4. ACTIVATION DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Si les lamellocytes sont nécessaires à la formation des tumeurs mélanotiques, en revanche, la présence -en abondance- de ce type cellulaire apparait insuffisante à induire systématiquement une agrégation des cellules entre elles. En effet, l'apparition des lamellocytes n'est pas nécessairement associée à une capsule mélanotique. Ainsi, l'expression constitutive de la protéine Alk dans les hémocytes circulants induit une différenciation massive des lamellocytes qui circulent librement dans l'hémolymphe, sans formation de tumeurs mélanotiques (Zettervall et al., 2004). De plus, dans les mutants thermosensibles tel que *hop<sup>tuml</sup>* ou *tumorous-Szts*, la formation de masses mélanotiques n'est observée qu'à une température permissive alors que ces cellules sont produites massivement quelle que soit les conditions thermiques d'élevage. La différence quantitative des cellules différenciées ne permet pas à elle seule d'expliquer la versatilité du phénotype. En effet, dans le cas du mutant *hop<sup>tuml</sup>*, le parasitisme des larves à une température restrictive induit l'encapsulation du pathogène dans moins de 5% des cas alors qu'elle est très élevée à une température permissive. L'immunocompétence des cellules hématopoïétiques semble ici être le facteur limitant de la réaction d'encapsulation. Les analyses réalisées sont cependant à approfondir.

#### 5. LA PROLIFÉRATION

Une augmentation du nombre d'hémocytes contenus dans l'organe hématopoïétique et/ou en circulation a été observée dans la majorité des contextes étudiés. Par ailleurs, une gradation du phénotype de sur-prolifération est liée à la formation des tumeurs mélanotiques si bien qu'une interdépendance entre les phénomènes différenciation et de prolifération a été envisagée. Au contraire, les travaux, plus récents de Zettervall et de Davidson, suggère que ces deux évènements sont découplés. Par exemple, une expression constante d'une forme constitutivement activée de Hep (Hemipterous) dans

les hémocytes larvaires en circulation, induit une différenciation de lamellocytes et la formation de capsules mélanotiques sans changement qualitatif du nombre de cellules circulantes (Davidson et al., 2005; Zettervall et al., 2004). De même, dans un double mutant pour *mx* et *Toll*, la prolifération des cellules en circulation est modulée alors que la proportion de lamellocytes est à un niveau comparable. Ainsi, la prolifération excessive des hémocytes, qui apparaît selon les interprétations comme une cause, ferait partie intégrante de la réponse cellulaire déclenchée lors de la formation des capsules mélanotiques (Remillieux-Leschelle et al., 2002).

#### IV. OBJECTIF ET STRATÉGIE

Notre objectif est d'explorer, *in vivo*, les mécanismes du contrôle de l'homéostasie du système hématopoïétique. Pour ce faire, nous avons décidé d'identifier de nouveaux gènes « supprimeurs de capsules mélanotiques » (*i.e.*, dont la perte de fonction conduit à la formation de capsules mélanotiques). Les « tumeurs » ou capsules mélanotiques étant des indicateurs facilement repérables d'une modification de l'homéostasie, nous avons utilisé leur formation comme phénotype discriminant dans un crible génétique de perte de fonction *in vivo* de grande ampleur. Nous avons opté pour une approche de perte de fonction ciblée aux tissus immuns ce qui nous a permis d'étudier l'implication des différents lignages et compartiments hématopoïétiques (circulant et glande lymphatique) de la *Drosophila* dans la réponse d'encapsulation.

# *-RESULTATS-*

I. ARTICLE

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# An *in vivo* RNA interference screen identifies gene networks controlling *Drosophila melanogaster* blood cell homeostasis

Amélie Avet-Rochex<sup>1,2,3</sup>, Karène Boyer<sup>1,2</sup>, Cédric Polesello<sup>1,2</sup>, Vanessa Gobert<sup>1,2</sup>, Dani Osman<sup>1,2</sup>, Fernando Roch<sup>1,2</sup>, Benoit Augé<sup>1,2</sup>, Jennifer Zanet<sup>1,2,3</sup>, Marc Haenlin<sup>\*1,2</sup> and Lucas Waltzer<sup>\*1,2</sup>

## Abstract

**Background:** In metazoans, the hematopoietic system plays a key role both in normal development and in defense of the organism. In *Drosophila*, the cellular immune response involves three types of blood cells: plasmacytes, crystal cells and lamellocytes. This last cell type is barely present in healthy larvae, but its production is strongly induced upon wasp parasitization or in mutant contexts affecting larval blood cell homeostasis. Notably, several zygotic mutations leading to melanotic mass (or "tumor") formation in larvae have been associated to the deregulated differentiation of lamellocytes. To gain further insights into the gene regulatory network and the mechanisms controlling larval blood cell homeostasis, we conducted a tissue-specific loss of function screen using hemocyte-specific Gal4 drivers and *UAS-dsRNA* transgenic lines.

**Results:** By targeting around 10% of the *Drosophila* genes, this *in vivo* RNA interference screen allowed us to recover 59 melanotic tumor suppressor genes. In line with previous studies, we show that melanotic tumor formation is associated with the precocious differentiation of stem-cell like blood progenitors in the larval hematopoietic organ (the lymph gland) and the spurious differentiation of lamellocytes. We also find that melanotic tumor formation can be elicited by defects either in the fat body, the embryo-derived hemocytes or the lymph gland. In addition, we provide a definitive confirmation that lymph gland is not the only source of lamellocytes as embryo-derived plasmacytes can differentiate into lamellocytes either upon wasp infection or upon loss of function of the Friend of GATA cofactor U-shaped.

**Conclusions:** In this study, we identify 55 genes whose function had not been linked to blood cell development or function before in *Drosophila*. Moreover our analyses reveal an unanticipated plasticity of embryo-derived plasmacytes, thereby shedding new light on blood cell lineage relationship, and pinpoint the Friend of GATA transcription cofactor U-shaped as a key regulator of the plasmacyte to lamellocyte transformation.

## Background

In metazoan, blood cells play a critical role in establishing the proper response against invading pathogens or in removing both cancerous and apoptotic cells [1]. Conversely, deregulations of the hematopoietic differentiation program are at the origin of numerous pathologies, including leukemia and auto-immune diseases [2]. As

many key signaling pathways and transcription factors controlling blood cell development and functions have been conserved from humans to *Drosophila* [3], this organism has emerged as an attractive model to investigate the genetic basis controlling blood cell homeostasis.

*Drosophila* hematopoiesis occurs in two spatially and temporally distinct phases. In the early embryo, blood cell progenitors (prohemocytes) arise from the head mesoderm [4]. These hemocytes subsist in the larva either in circulation in the hemolymph or attached to the inner surface of the integument, forming the so-called sessile islands that can be mobilized upon infection [5,6].

\* Correspondence: haenlin@cict.fr, waltzer@cict.fr

<sup>1</sup> Université de Toulouse, UPS, CBD (Centre de Biologie du Développement), Bât4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> Université de Toulouse, UPS, CBD (Centre de Biologie du Développement), Bât4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

† Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article



A second hematopoietic wave occurs in the larva in a specialized organ called the lymph gland [5]. In third instar larvae, the lymph gland is composed of a pair of primary lobes and several more posterior secondary lobes. Each primary lobe is subdivided into three zones: (1) the cortical zone, containing differentiated hemocytes; (2) the medullary zone, containing prohemocytes; and (3) the posterior signaling center, a small group of cells whose activity is required to maintain medullary zone cells into a progenitor state [7-9]. The smaller posterior lobes, presenting no organized structure, consist mainly of prohemocytes [7]. In normal conditions, both the circulating and sessile cells in the larva are only of embryonic origin [6] whereas hemocytes from the lymph gland are released into circulation only at pupariation [5]. Finally, in the adult, no hematopoietic tissue has been described and hemocytes of both embryonic and lymph gland origin are observed [6].

Prohemocytes give rise to three terminally differentiated cell types: plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes [3]. Plasmatocytes, which comprise 90-95% of the larval circulating blood cells, are phagocytic cells that engulf apoptotic bodies and pathogens [10-13]. Crystal cells secrete components of the melanization cascade, an insect-specific immune reaction involved in wound healing and in the encapsulation of large foreign bodies [14-16]. Lamellocytes are large flattened non-phagocytic cells normally scarcely present in the larva but their development is massively induced upon certain immune challenges such as infection of the larvae by eggs of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* [17]. Parasitization elicits lymph gland overgrowth, massive production of lamellocytes, and precocious hemocyte release from the lymph gland into the circulation. Together with the other blood cell types, lamellocytes form a melanotic capsule around the parasitoid egg to prevent its development [5,18]. While it was initially proposed that lamellocytes might represent an ultimate state of plasmatocyte differentiation [17,19-21] further evidence suggests that they derive only from lymph gland progenitors [5,8,18,22,23]. Yet this view has been recently challenged as cells from the sessile islands were shown to differentiate into lamellocytes after wasp infection [24].

Interfering with normal blood cell development and/or function can trigger an aberrant immune response characterized by lymph gland overgrowth and massive differentiation of lamellocytes [25]. This response culminates with the premature disintegration of the lymph gland and the formation in the larvae of "melanotic tumors" (also called melanotic masses, melanotic nodules or pseudotumors) constituted by melanized aggregates of hemocytes, mostly lamellocytes, sometimes surrounding cells from other tissues. Melanotic masses are easily observable through the larval cuticle and a large number of « melan-

otic tumor suppressor genes », were identified based on such phenotype [25]. Unfortunately, the nature of the mutated gene has not been ascertained in the majority of the cases and the contribution of blood cells to the phenotype has seldom been evaluated [26]. Notwithstanding, available evidences suggest that presence of melanotic tumors reflects defects in the hematopoietic developmental program and/or in the immune surveillance of self-tissues. Accordingly, melanotic mutations have been classically subdivided in two categories [25,27]: (1) class I mutations modify a non-hematopoietic tissue and induce a kind of "autoimmune response", as the mutations in *kurtz* or *spaghetti* [26,28], (2) class II mutations affect internal regulatory pathways within the hemocytes themselves, such as gain of function mutations in JAK/STAT or Toll signaling pathway [29-34]. Hence, melanotic tumor suppressor genes are potential candidates for regulating both hematopoiesis and blood cell function.

In this work, we conducted a large-scale screen for melanotic tumor suppressor genes aimed specifically at the identification of genes involved in blood cell homeostasis, taking advantage of recently developed *UAS-dsRNA* transgenic line collections. Down-regulation of the targeted genes was specifically induced in the blood cells or both in the blood cells and the fat body using different Gal4 drivers. By individually inactivating the function of around 10% of the *Drosophila* genes, we recovered 59 melanotic tumor suppressor genes. This approach allowed us to pinpoint several new pathways controlling blood cell homeostasis. By analyzing some of these candidates, we further demonstrate that melanotic masses can be induced by defects in a specific subset of cells and demonstrate that embryonic-derived plasmatocytes can differentiate into lamellocytes.

## Results

### A loss of function screen for melanotic tumor suppressor genes

To identify new genes regulating *Drosophila* blood cell homeostasis, we performed a screen for melanotic tumor suppressor genes (*i.e.* genes whose loss of function induces melanotic mass formation in third instar larvae). For this, we used of a collection of RNAi transgenes (*UAS-dsRNA*) that consist of short gene fragments (300-500 bp) cloned as inverted repeats and expressed via the binary Gal4/UAS system <http://www.shigen.nig.ac.fly/nigfly>, thus allowing tissue-specific gene knock-down. We took advantage of this collection to induce RNAi in blood cells using three different drivers: *srp-Gal4*, *cg-Gal4*, and *hmlΔ-Gal4* [35-37]. *srp-Gal4* is expressed in all the embryo-derived hemocytes from the early embryonic stages, as well as in the larval lymph gland and fat body [35]. *cg-Gal4* is expressed in the plasmatocytes both in the late embryo and in the larvae, including in the lymph

gland cortical zone, and also drives at high levels in the larval fat body [7,36]. *hmlΔ-Gal4* is expressed only at the larval stages, in almost all the circulating blood cells and in the cortical zone of the lymph gland [38]. All together these three drivers, whose expression patterns are illustrated in Additional file 1, Figure S1, allow targeting most of the tissues involved in hematopoietic development and cellular immunity in *Drosophila*.

Based on pilot experiments, our screen was first performed with *srp-Gal4* and *hmlΔ-Gal4* on *UAS-dsRNA* transgenes predicted to target 1341 of the 13825 predicted protein-coding genes of *Drosophila* (*Drosophila* genome release 5; <http://flybase.org>) (Additional file 4, Table S1). All the hits were subsequently retested with the three drivers on a higher number of larvae. Given that all together 2.5% of the ± 145000 larvae that we screened had melanotic nodules, we selected as positives only those lines that scored two folds above this baseline, *i.e.* with a tumor index ≥5% (Figure 1A). Thereby we identified 96 genes whose RNAi-induced down-regulation with one of the three drivers induced melanotic masses in at least 5% of the emerging larvae (Additional file 5, Table S2). Interestingly four of these genes (*cactus*, *DREF*, *ush* and *ND75*) were already known to be implicated in melanotic mass formation and/or lamellocyte differentiation [39-42], thereby validating our screening strategy. Figure 1B displays some representative larvae harboring melanotic tumors that we obtained in the screen. We did not consider melanotic spots (on the cuticle, gut, trachea...) as genuine melanotic tumors since they were shown to arise independently of a modification in larval blood cell homeostasis [26]. While smaller nodules were circulating freely in the hemocoel, larger ones were most often localized to the posterior part of the larvae. In some rare cases, we observed lymph gland melanization or disintegration of the fat body (Figure 1B, right most panel). Moreover, for a given gene, the penetrance of the phenotype is largely dependent on the *Gal4* line (Additional file 5, Table S2). Indeed, the median tumor index for the 96 candidates was 1.5% with *hmlΔ-Gal4*, 9% with *srp-Gal4* and 19% with *cg-Gal4*. Of note, *cg-Gal4* also caused severe growth delay or lethality before the third instar larval stage with a few candidates, which impaired the analysis of melanotic mass formation in such cases and excluded its use in the screen first step (Additional file 5, Table S2).

#### Validation of the candidates

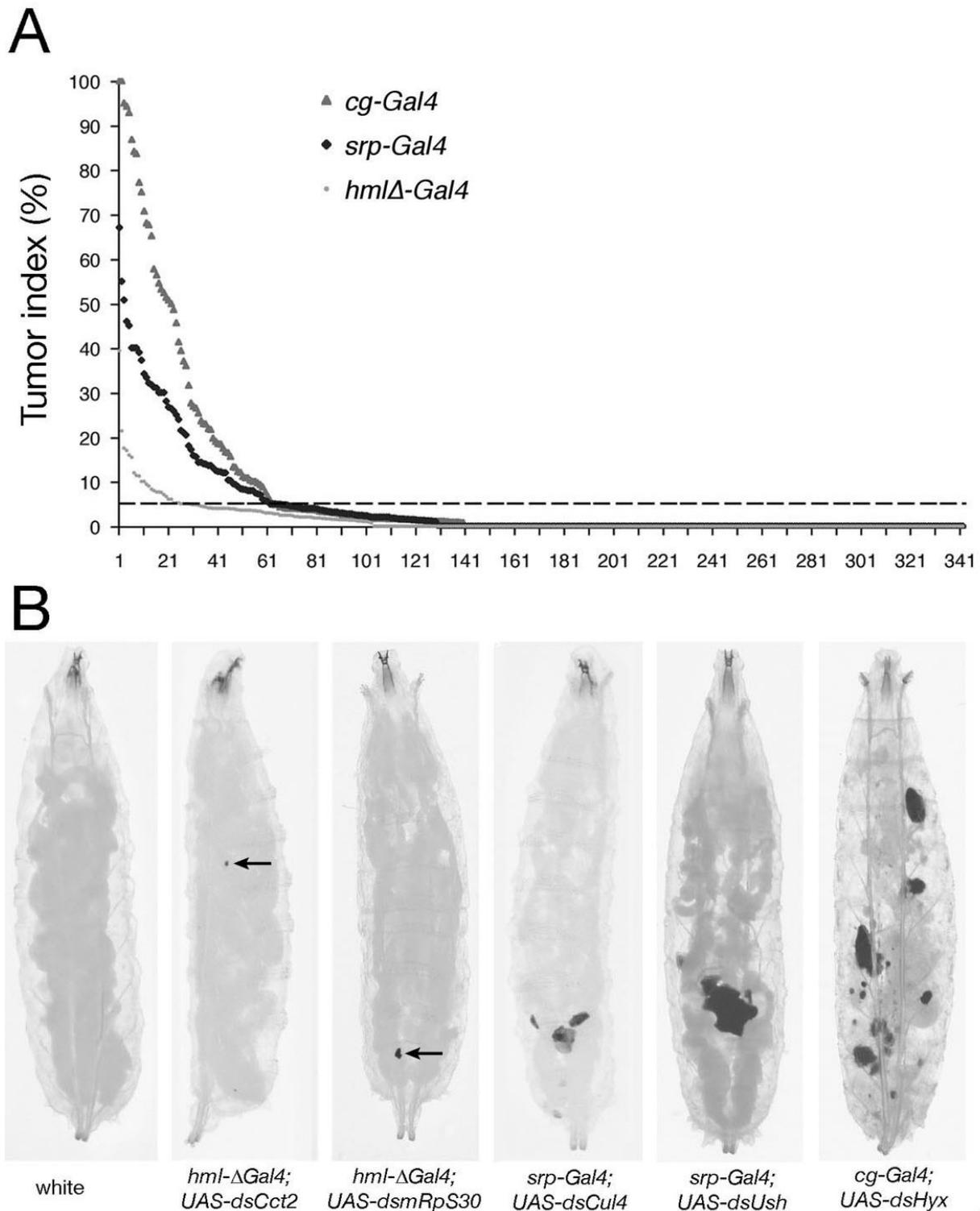
Expression of long double stranded RNA can cause non-specific phenotypes due to off-target effects (OTE) [43]. A common measure of dsRNA targeting specificity is the specificity score, S19, which is the number of all on-target 19-mer matches divided by the total number of matches of a given RNAi hairpin [43]. Among the candidates we

isolated, 43 of the 96 hairpins tested had no predicted off-target (S19 = 1), 25 had a S19 above 0.99, 22 between 0.99 and 0.8 and 16 below 0.8, suggesting that the vast majority of the dsRNA we used were specific (Additional file 5, Table S2). Besides OTE, another potential source of false positives is the dsRNA transgene insertion itself, which might interfere with expression of nearby genes and produce melanotic nodules. To validate our hits, we obtained independent secondary *UAS-dsRNA* lines for the entire set of candidate genes, except two for which no secondary lines were available: *cactus*, a negative regulator of the Toll pathway well known as a melanotic tumor suppressor gene [32,34,40], and CG9663, which codes for an ABCG transporter. Of note, 59 of these 94 secondary *UAS-dsRNA* targeted a non-overlapping sequence in the candidate gene mRNA as compared to the original set (Additional file 5, Table S2). Using these secondary RNAi lines, we could phenocopy formation of melanotic masses for 58 genes, including 40 of them (70%) using non-overlapping dsRNA (Additional file 6, Table S3). Among the 18 genes where overlapping dsRNA were used, mutant alleles for two of them induced melanotic tumor formation (*Dref* and *Aos1*) and 10 code for proteins that interact with an other melanotic suppressors validated by non-overlapping dsRNA or genetic means (see below and Figure 2). As for the 6 remaining genes in that category (CG14512, CG15784, CG31044, CG8444, *Cp7Fa* and *fne*), we cannot exclude an off-target effect although dsRNA lines targeting CG14512, CG8444 and *fne* have an S19 score of 1 and above 0.9 for CG15784 and *Cp7Fa*. Hence, together with *cactus*, our screen allowed us to identify 59 genes potentially controlling larval blood cell homeostasis.

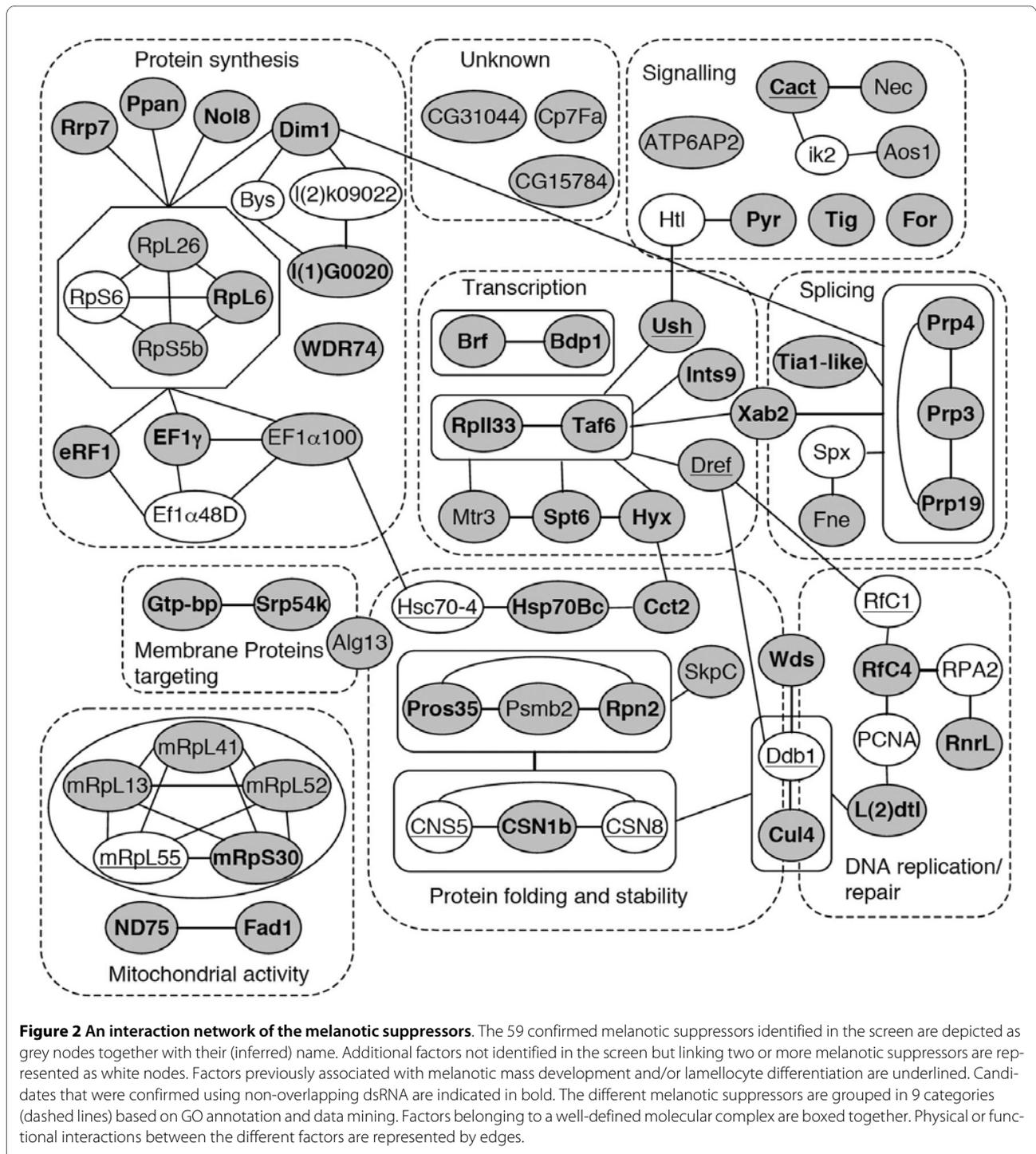
We also sought to validate these candidates by checking the phenotypes of genetic mutants affecting their activity. However, in most cases, no mutants have been described for these genes or the available mutations result in lethality before the third instar larval stage, thereby precluding this kind of analysis. Nonetheless, beside the already described mutations in *cactus* [32,34,40], we could confirm presence of melanotic nodules in larvae carrying zygotic mutations for five genes: *u-shaped* (previously associated only to lamellocyte differentiation) [41], *pyramus*, *RfC4*, *tiggrin* and *Aos1* (Additional file 6, Table S3). These results support the idea that the use of *UAS-dsRNA* allows efficient identification of a large panel of genes participating in blood cell development.

#### Identification of gene networks controlling blood cell homeostasis

To gain insights into the putative functions of the candidate genes and into the different pathways regulating blood cell homeostasis, we built an interaction network between the candidates. Accordingly, we searched for



**Figure 1 An RNAi screen for melanotic suppressor genes.** (A) Distribution of tumor indices for the 342 UAS-dsRNA lines retested with the three drivers (*hmlΔ-Gal4*, *srp-Gal4*, *cg-Gal4*). For each of the three driver lines, the candidates are classified by decreasing tumor index (% of larvae carrying at least one melanotic nodule). The dotted line indicates the 5% threshold that we used to select 96 candidates for secondary validations. (B) Example of melanotic mass mutant phenotypes recovered in the screen. Third instar larvae are shown with their corresponding genotypes. Small melanotic masses are indicated by an arrow. Note the dissociation of the fat body in the *cg-Gal4*; *UAS-ds-hyx* larva.



high confidence yeast two-hybrid, biochemical or genetic interactions data using various databases (DroID, BioGrid, Flybase...) as well as manual text mining for each of the 59 genes and their mammalian or yeast orthologs. We only considered first order (direct) and second order (through one intermediate) interactions between genes contained in our hit list or previously

identified as melanotic tumor suppressors. This approach allowed us to uncover several nodes of interactions between them (Figure 2) as 47 of the candidates are linked to at least one other gene in the network. Interestingly, 14 of the candidate genes code for proteins that are part of complexes with previously described melanotic tumor suppressors, thereby confirming that they are gen-

uine melanotic tumor suppressor genes. Namely, these 14 genes code for the cytoplasmic ribosomal constituents RpL26, RpL6 and RpS5b, which associate with RpS6 [44], the mitochondrial ribosomal constituents mRpL13, mRpL41, mRpL52 and mRpS30, which bind to mRpL55 [45], the COP9 signalosome component CSN1b, which associates with CSN5 and CSN8 [46,47], Hsp70Bc and EF1 $\alpha$  (100)E, which are linked to Hsc70-4 [48], the replication factor RfC4, which associates with RfC1 [49], as well as Wds, l(2)dtl and Cul4, which bind to DDB1 [50]. In addition, it is worth noting that DREF was shown to regulate the transcription of two melanotic suppressors, *ddb1* and *rfc1*, in cell culture [49,50]. Finally, several candidates are indirectly connected to such melanotic suppressors. For instance, the translation factors (EF1 $\alpha$ (110), EF1 $\gamma$  and eRF1) or the factors involved in ribosome assembly (Dim1, Nol8, l(1)G0020, Rrp7 and PPAN) are functionally linked to RpS6 function.

Given that our screen allowed identification of several sets of interconnected genes, we asked whether conversely known partners of the genes we identified also behave as melanotic tumor suppressor genes. As a root, we chose Cct2, a component of the well defined and evolutionarily conserved chaperonin complex TriC/CCT (TCP1-ring Complex or Chaperonin Containing TCP1) [51], which had not been linked to melanotic mass development before. The CCT complex is composed of eight subunits (Tcp1 and Cct2-8) and is a cytosolic chaperonin complex regulating protein folding. We obtained UAS-dsRNA lines against 5 other CCT subunits (Tcp1, Cct4, Cct5, Cct7 and Cct8) and tested their capacity to induce melanotic nodules upon expression under the control of the three hematopoietic drivers used in the screen. As summarized Table 1, downregulation of any of the six CCT components tested induced melanotic masses. These results show that the CCT complex plays a pivotal role in regulating larval blood cell homeostasis and indicate that the different candidates from the screen can be

used as entry points to explore the network of genes implicated in melanotic mass formation.

For further analysis of melanotic tumor formation process, we focused our attention on 5 genes that induced melanotic mass to high frequency and might represent different classes of melanotic tumor suppressor genes: *cct2*, *cul4*, *hyx*, *mRpS30* and *ush*.

#### Melanotic masses are associated to lamellocyte production and premature lymph gland differentiation

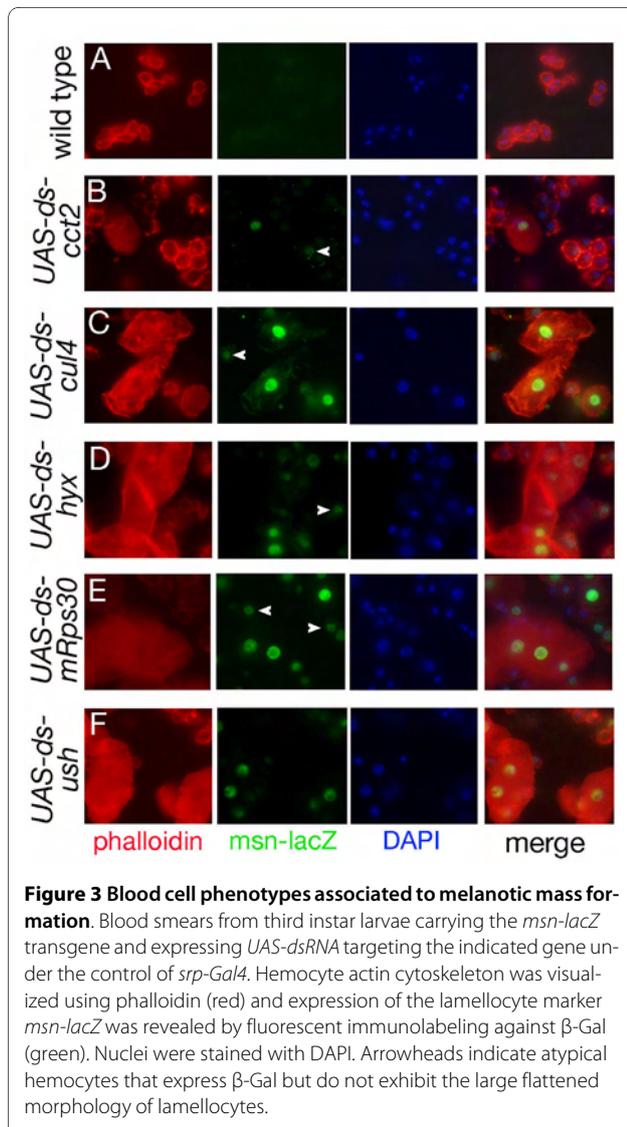
To confirm that the melanotic masses we observed arise from a modification in larval blood cell homeostasis, we bled larvae expressing dsRNA for *cct2*, *cul4*, *hyx*, *mRpS30* and *ush* and looked for lamellocyte differentiation. Figure 3 shows representative bleeds obtained from third instar larvae expressing the indicated dsRNA under the control of *srp-Gal4* (similar results were obtained with *hml $\Delta$ -Gal4* and *cg-Gal4*, data not shown). Lamellocytes are normally absent in healthy larvae and can be easily distinguished from other blood cell types based on their morphology (large flattened cells) and the expression of high levels of actin as well as specific markers such as *msn-lacZ* and  $\alpha$ -*ps4* [5,52,53]. Phalloidin staining and morphological examination of larval blood smears showed that all the larvae with melanotic nodules contained numerous lamellocytes in circulation, whereas this blood cell type was scarcely found in wild type controls. As expected, *msn-lacZ* was strongly expressed in the induced population of lamellocytes. In addition, we observed a reproducible, albeit weaker, expression of *msn-lacZ* in smaller blood cells unveiling a  $\beta$ -gal<sup>+</sup> population that is not present in wild type larvae. These results suggest that melanotic tumor formation is also associated to the activation of *msn-lacZ* in plasmatocytes or in circulating lamellocyte progenitors (see below). Finally, analysis of the melanotic masses themselves confirmed that they contained numerous lamellocytes (Additional file 2, Figure S2).

**Table 1: Melanotic masses induction upon loss of CCT complex component**

CG	SYMBOL	S19	UAS-dsRNA driver		
			<i>srp-Gal4</i>	<i>hml<math>\Delta</math>-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>
CG7033	Cct2	1	+++	-	++ <sup>a</sup>
CG5525	Cct4	0.99	+++	-	++++ <sup>a</sup>
CG8439	Cct5	0.99	+++	+	++ <sup>a</sup>
CG8351	Cct7	0.99	++++	-	+++
CG8258	Cct8	0.99	++	-	+++
CG5374	TCP1	0.99	+++	++	+++ <sup>a</sup>

Melanotic masses indices: (-) < 5%; (+) 5-10%; (++) 10-20%; (+++) 20-50%; (++++) > 50%.

<sup>a</sup> Dead second and third instar larvae were observed and no or only few adults emerged.



**Figure 3 Blood cell phenotypes associated to melanotic mass formation.** Blood smears from third instar larvae carrying the *msn-lacZ* transgene and expressing *UAS-dsRNA* targeting the indicated gene under the control of *srp-Gal4*. Hemocyte actin cytoskeleton was visualized using phalloidin (red) and expression of the lamellocyte marker *msn-lacZ* was revealed by fluorescent immunolabeling against  $\beta$ -Gal (green). Nuclei were stained with DAPI. Arrowheads indicate atypical hemocytes that express  $\beta$ -Gal but do not exhibit the large flattened morphology of lamellocytes.

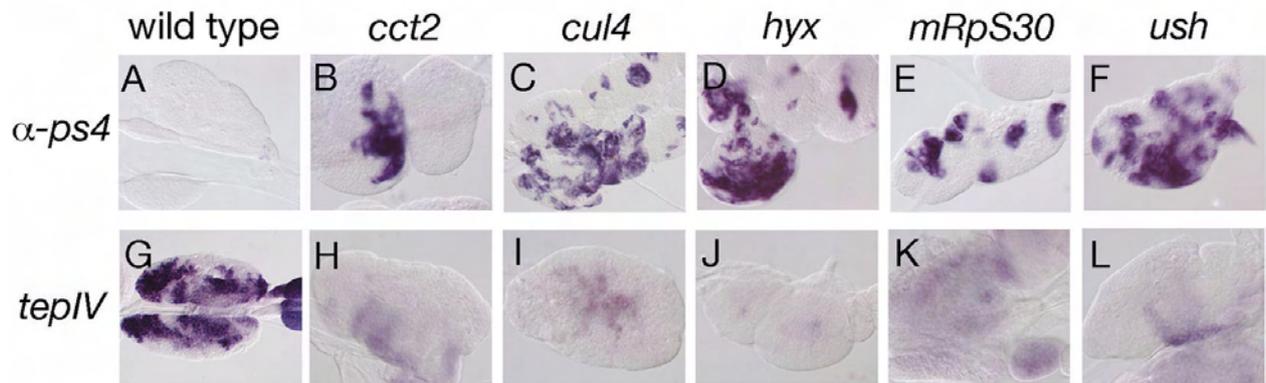
We also monitored lymph gland differentiation status. Consistent with previous reports, we observed precocious disintegration of the lymph gland in most larvae harboring melanotic masses. By collecting larvae without macroscopically apparent or with smaller nodules, we were able to recover intact lymph gland and found that, contrary to wild type, larvae expressing *UAS-dsRNA* contained lamellocytes in their lymph glands, as revealed by *in situ* hybridization against  $\alpha$ -*ps4* (Figure 4A-F). In addition, *tepIV* staining revealed that the medullary zone, which contains stem-like blood progenitors, was markedly reduced or absent (Figure 4G-L). Thus, similar to wasp-egg parasitization [8,18,22], dsRNA-induced capsule formation affect larval blood cell homeostasis by activating lamellocyte development and premature differentiation of lymph gland prohemocytes.

### Melanotic capsule formation is induced in response to defect in specific tissues

The three *Gal4* drivers we used in our screen are predominantly expressed in blood cells, but they are also expressed in other territories (e.g. the fat body for *srp-Gal4* and *cg-Gal4*) and in overlapping patterns within the hematopoietic lineages (embryonic and larval hemocytes for *srp-Gal4*, differentiated embryonic and larval plasmatocytes for *cg-Gal4*, differentiated larval hemocytes for *hml $\Delta$ -Gal4*). We thus asked whether melanotic nodule formation reflected a general response to a defect in any tissue or was directly elicited by the modification of a (particular) blood cell type. To investigate this issue, we used a battery of *Gal4* lines that are either not expressed in hematopoietic tissues (*fb-Gal4*, *cad-Gal4*, *repo-Gal4*, *elav-Gal4*, *MS1096*) or in restricted hematopoietic compartments (*sn-Gal4*, *gcm-Gal4*, *tepIV-Gal4*), or in overlapping patterns with the previous drivers (*sn-Gal4*, *gcm-Gal4*, *tepIV-Gal4*, *fb-Gal4*, *cad-Gal4*) (Table 2). These different drivers were used to assess through which cell type the targeted loss of *cct2*, *cul4*, *hyx*, *mRps30* or *ush* can induce melanotic tumors.

We could induce both melanotic nodules and lamellocyte differentiation by targeting *cul4* or *cct2* dsRNA specifically in the lymph gland prohemocytes with the *tepIV-Gal4* line (see Additional file 1, Figure S1 for its expression pattern), indicating that these genes may participate in blood cell progenitor fate maintenance and/or restrict their differentiation potential. Interestingly, targeting dsRNA expression only in plasmatocytes during embryogenesis either with *sn-Gal4* [54], Zanet *et al.*, in preparation] or *gcm-Gal4* [35] (which are not maintained in larval hemocytes, see Figure 5 and Additional file 1, Figure S1) induced lamellocyte differentiation and melanotic mass formation in the case of *ush*, *hyx*, *cct2* and *cul4*. Therefore, loss of function restricted to embryo-derived plasmatocytes or to lymph gland prohemocytes is sufficient to induce these phenotypes.

In addition we observed melanotic mass formation and lamellocyte differentiation upon expression of the dsRNA against *mRps30* or *cul4* specifically in the fat body using the *FB-Gal4* line (see Additional file 1, Figure S1 for its expression pattern). However, induction of melanotic tumors or lamellocytes was never observed for any of the five genes when dsRNA were expressed under the control of *MS1096*, *repo-Gal4*, *elav-Gal4* or *cad-Gal4*, which respectively drive expression in the wing discs, the glial cells, the central nervous system and the gut. Thus gene knock down in the fat body, which plays a key role in innate immune response, can elicit a non-autonomous cellular immune response that culminates with the formation of melanotic nodules by the hemocytes. These results also show that the genes we tested act as melanotic tumor suppressors only in the immune system (blood



**Figure 4 Lymph gland differentiation status.** Expression of the lamellocyte differentiation marker  $\alpha$ -*ps4* (A-F) or of the prohemocyte marker *tepIV* (G-L) was revealed by *in situ* hybridization on lymph glands from early third instar larvae expressing *UAS-dsRNA* targeting the indicated gene under the control of *srp-Gal4*.

cells and fat body) and not in other tissues, perhaps reflecting that only immune tissues can elicit melanotic capsule formation (see discussion).

All together, it appears that there are at least three different means of inducing melanotic mass formation: affecting the fat body, impinging on prohemocyte development or modifying differentiated blood cells.

#### Embryo-derived plasmatocytes can cell autonomously differentiate into lamellocytes

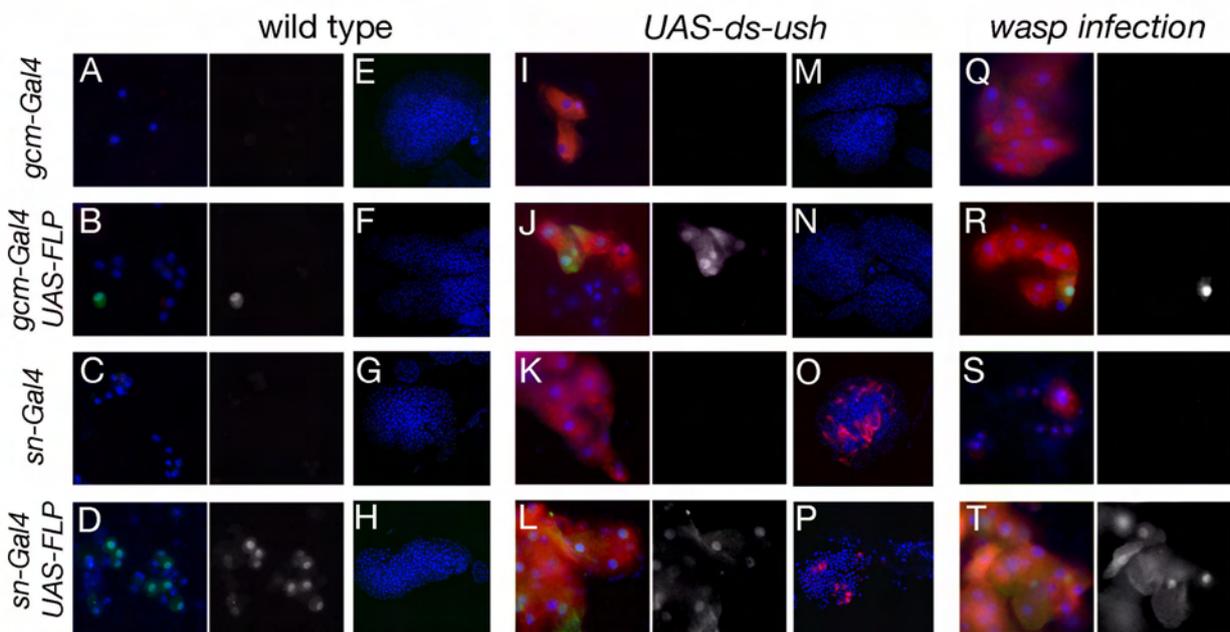
The fact that some of the genes we recovered in the screen induced melanotic mass formation and lamellocyte differentiation when they were knocked-down spe-

cifically in embryonic plasmatocytes raised several questions. In particular we wondered whether these genes knock-downs provoked a cell-autonomous transformation of embryo-derived plasmatocytes into lamellocytes. Alternatively, these knock-downs might non-autonomously induce lamellocyte differentiation in the lymph gland. To test these possibilities, we monitored the fate of embryo-derived hemocytes that expressed the *UAS-dsRNA* as compared to that of the lymph gland-derived hemocytes. Accordingly, we used the flip-out technique to permanently label embryonic plasmatocytes and follow their fate in larval stages. Flies carrying the embryonic-specific plasmatocyte drivers *sn-Gal4* or *gcm-*

**Table 2: Melanotic masses and lamellocytes are induced in response to defects in specific tissues**

driver	expression pattern	wild type	UAS-dsRNA				
			<i>cct2</i>	<i>cul4</i>	<i>Hyx</i>	<i>mRpS30</i>	<i>ush</i>
<i>srp-Gal4</i>	EH, LH, LG, FB	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>cg-Gal4</i>	EH, LH, LG (CZ), FB	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>hmlΔ-Gal4</i>	LH, LG (CZ), HG	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>sn-Gal4</i>	EH	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+
<i>gcm-Gal4</i>	EH, GC	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+
<i>tepIV-Gal4</i>	LG (MZ), CNS	-/-	+/+	+/+	Lethal	-/-	-/-
<i>fb-Gal4</i>	FB, WD, CNS	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
<i>cad-Gal4</i>	HG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>repo-Gal4</i>	GC	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>elav-Gal4</i>	CNS, PNS	-/-	lethal	-/-	Lethal	lethal	-/-
MS1096	WD	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

CNS: central nervous system, HG: hindgut, PNS: peripheral nervous system, CZ: cortical zone, EH: embryonic hemocytes; FB: fat body, GC: glial cells, LH: larval hemocytes, LG: lymph gland, MZ: medullary zone, WD: wing disc. -/-: absence of melanotic masses or lamellocytes; +/+ : presence of melanotic masses and lamellocytes; -/+ : rare melanotic masses but presence of lamellocytes.



**Figure 5 Fate of embryonic blood cells.** (A-T) Blood smears (A-D, I-L and Q-T) and lymph glands (E-H and M-P) of third instar larvae. The *Act > FRT > CD2 > FRT > GAL4* cassette and the *UAS-FLP* and *UAS-GFP* transgenes were used to permanently label the cells that express *sn-Gal4* or *gcm-Gal4*. Immunostaining against GFP (green, also displayed in white on right panel of each blood smear) was used to monitor *gcm-Gal4*, *UAS-GFP* or *sn-Gal4*, *UAS-GFP* expression. *In situ* hybridization against  $\alpha$ -*ps4* (red) was used to reveal lamellocyte differentiation. Nuclei were counterstained with DAPI. GFP labeling alone is shown to the right. (A-H) larvae raised in wild-type conditions, (I-P) larvae carrying a *UAS-dsRNA* transgene against *ush*, (Q-T) larvae submitted to parasitization by *L. boulardi*. (A, E, I, M, Q) *gcm-Gal4*, *UAS-GFP*; *Act > FRT > CD2 > FRT > GAL4*; (B, F, J, N, R) *UAS-FLP*; *gcm-Gal4*, *UAS-GFP*; *Act > FRT > CD2 > FRT > GAL4*; (C, G, K, O, S) *sn-Gal4*, *UAS-GFP*; *Act > FRT > CD2 > FRT > GAL4*; (D, H, L, P, T) *UAS-FLP*; *sn-Gal4*, *UAS-GFP*; *Act > FRT > CD2 > FRT > GAL4*;

*Gal4* recombined with a *UAS-FLP* were crossed to a strain bearing a flip-out cassette (*Act5C > FRT > CD2 > FRT > Gal4*) and a *UAS-GFP*. This technique allowed us to recover GFP-expressing circulating blood cells in third instar larvae in wild type conditions, whereas GFP-expressing cells were never observed in the absence of *UAS-FLP* (Figure 5A, B and D). Labeling with the plasmacyte-specific marker P1/NimC1 confirmed that these cells were plasmacytes (Additional file 3, Figure S3). Of note, probably due to the limited efficiency of the FLIP-FRT recombination, only a fraction of the blood cells was GFP<sup>+</sup>. Also, *sn-Gal4* reproducibly gave higher frequency of GFP<sup>+</sup> cells than *gcm-Gal4*. Importantly, we never observed GFP<sup>+</sup> cells in the lymph glands demonstrating that these drivers are not sporadically expressed in this compartment during larval development and that embryo-derived plasmacytes do not normally enter the lymph gland (Figure 5E-H).

We then made use of this technique to label the cells expressing a dsRNA targeting *ush*. As reported above (Table 2), expression of *ush* dsRNA under the control of *gcm-Gal4* or *sn-Gal4* was sufficient to induce the differentiation of lamellocytes in circulation, as revealed by *in situ* hybridization against  $\alpha$ -*ps4* and morphological analy-

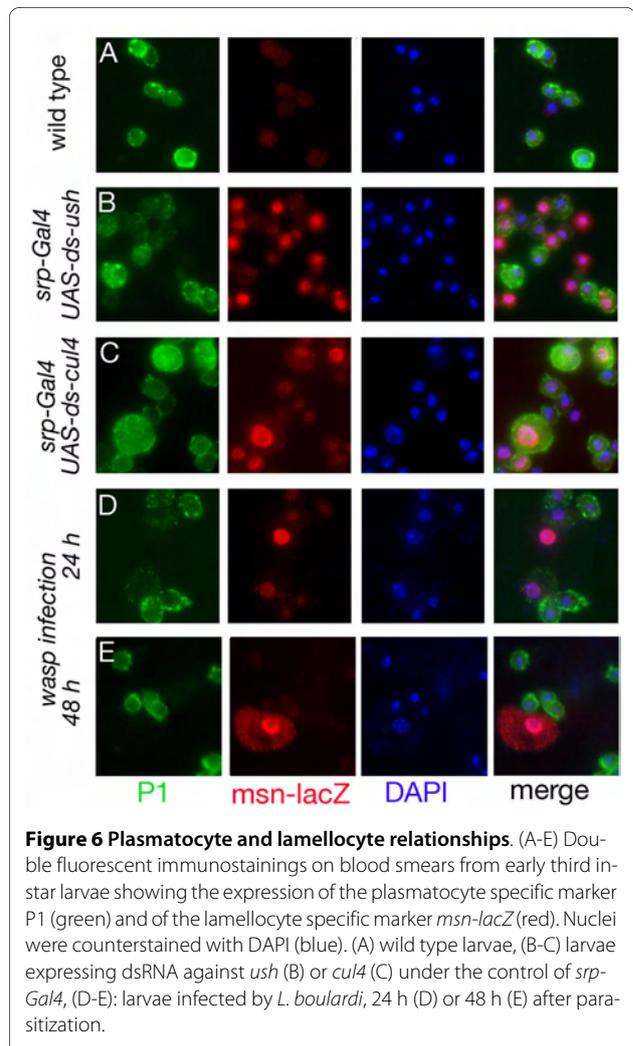
sis (Figure 5I and 5K). In the absence of Flipase, no GFP<sup>+</sup> cells were observed in circulation or in the lymph gland, indicating that these two drivers are not re-activated upon lamellocyte differentiation (Figure 5I, K, M and 5O). Strikingly, we observed GFP<sup>+</sup> lamellocytes in circulation in the presence of Flipase (Figure 5J and 5L) and these GFP<sup>+</sup> cells were also recovered in larvae with intact lymph glands. Therefore *ush* loss of function is sufficient to induce the cell autonomous transformation of embryo-derived plasmacytes into lamellocytes. In addition, while *gcm-Gal4*-driven *ush* dsRNA induced lamellocyte production in circulation but not in the lymph gland (Figure 5J and 5N), we observed lamellocyte differentiation in both compartments using *sn-Gal4* (Figure 5L and 5P). Again, none of the lamellocytes in the lymph gland were GFP<sup>+</sup>, indicating that they do not arise from *sn-Gal4*-expressing blood cells. This indicates that embryo-derived plasmacytes participate in the production of lamellocytes both through cell autonomous and non-autonomous processes. Since *sn-Gal4* gave rise to more GFP<sup>+</sup> cells than *gcm-Gal4*, it is possible that the non-autonomous induction of lamellocytes in the lymph gland is elicited in response to a threshold level of signalization by circulating hemocytes. To assess whether

embryo-derived plasmatocytes also give rise to lamellocytes upon a natural immune challenge, we infected wild type larvae with eggs from the parasitoid wasp *L. bouvardi*. As shown Figure 5Q-T, wasp infection induced lamellocyte differentiation and flip-out analysis showed that some of these lamellocytes are derived from cells that had expressed *gcm-Gal4* or *sn-Gal4*. Thus, we conclude that embryo-derived plasmatocytes can differentiate into lamellocytes both upon intrinsic modification of the blood cell developmental program or in response to parasitoid infection.

To get further insights into the lamellocyte differentiation process induced by melanotic tumor suppressor genes or wasp infection, we analyzed circulating blood cell differentiation status by monitoring the expression of the plasmatocyte-specific marker P1/NimC1 and the lamellocyte-specific marker *msn-lacZ*. In control larvae, most blood cells expressed P1/NimC1 and only background  $\beta$ -gal staining was detected (Figure 6A). On the contrary, in third instar larvae expressing dsRNA against *ush* or *cul4* under the control of *srp-Gal4*, *msn-lacZ* was expressed in most hemocytes (Figure 6B and 5C). Interestingly, a large fraction of these  $\beta$ -Gal<sup>+</sup> hemocytes also expressed P1, albeit often at lower levels. Similarly, 24 h after infection by *L. bouvardi*, we found that most P1<sup>+</sup> cells also expressed *msn-lacZ* (Figure 6D). However, cells expressing both markers were rare 48 h after infestation: almost all the  $\beta$ -Gal<sup>+</sup> cells corresponded to typical lamellocytes with large flattened morphology, big nuclei and no P1 staining, whereas P1<sup>+</sup> hemocytes had the characteristic small and round morphology of plasmatocytes (Figure 6E). Thus, together with the above results, these data suggest that lamellocytes differentiate from plasmatocytes *via* a stepwise process implicating activation of *msn-lacZ*, change in cell morphology and repression of P1 expression.

## Discussion

In this study we have conducted a loss of function screen to identify factors that regulate *Drosophila* blood cell development and/or function. Thus far, screens aiming at uncovering genes controlling hemocyte development relied primarily on the use of zygotic mutants potentially acting in other tissues ([25] and references therein) or on misexpression of factors potentially not expressed in blood cells [55,56]. Likewise, the conclusion that a given melanotic suppressor gene was specifically affecting blood cells rather than an other tissue was based mostly on the targeted expression of dominant negative (*e.g. ush* or *lwr* with *cg-Gal4*) [41,57], rescue experiments (*e.g. vsp35* with *hml-Gal4*, or *ADGF-A* with *cg-Gal4*) [58,59], or other indirect evidences (*e.g. cactus*, *yantar*, *zfrp8*) [40,60,61]. To target more specifically genes expressed in hemocytes and to be able to study genes required for



**Figure 6 Plasmatocyte and lamellocyte relationships.** (A-E) Double fluorescent immunostainings on blood smears from early third instar larvae showing the expression of the plasmatocyte specific marker P1 (green) and of the lamellocyte specific marker *msn-lacZ* (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (A) wild type larvae, (B-C) larvae expressing dsRNA against *ush* (B) or *cul4* (C) under the control of *srp-Gal4*, (D-E): larvae infected by *L. bouvardi*, 24 h (D) or 48 h (E) after parasitization.

embryonic or early larval viability, we choose a tissue-specific loss of function approach that relied on the use of a collection of *UAS-dsRNA* transgenic lines and of three different Gal4 drivers expressed in the hemocytes. To the best of our knowledge this is the first time that such cell-targeted loss of function approach is used to identify new regulators of blood cell function and development.

By screening 1340 genes by RNA interference, we recovered 96 candidate melanotic tumor suppressor genes among which 59 were confirmed with secondary RNAi lines and/or by genetic means. This corresponds to a hit rate of 7.1% (4.4% if we only consider confirmed hits). For comparison, a recent genome wide RNAi screen for genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection resulted in 8.6% of hits [62], while a gain of function screen in larval hemocytes led to 3.2% of hits [55]. Yet, in neither case a systematic validation of the candidates was carried out. In a genome-wide RNAi screen for genes affecting adult thorax development (19.6% of hits, excluding genes required for viability) [63], 63% of the 73 candi-

dates retested with secondary RNAi lines were confirmed, which is similar to our confirmation rate (94 candidates retested with secondary RNAi lines, 62% confirmed). Since in 31% of the cases, the primary and secondary RNAi lines targeted overlapping sequences, we cannot rule out that some of the melanotic masses might be caused by off-target effects. The analysis of the expression pattern of the candidates and of the RNAi efficiency might help resolving this issue. Interestingly though, data mining showed that most of the confirmed genes are functionally connected to one another or to a previously identified melanotic suppressor, further substantiating our conclusion that they work in a common process. Thus, altogether, this screen allowed us to find 59 genes that likely contribute to larval blood cell homeostasis, among which 55 had not been directly associated with blood cell development or function before.

In contrast to the customary partition of the melanotic tumor suppressor into class I/ class II genes [25,27], we propose that the capacity to elicit melanotic mass development is restricted to the blood cells and the fat body (*i.e.* immune tissues). Indeed, none of the candidates we tested induced lamellocytes or melanotic masses when knocked-down in other territories. Similarly, knocking down the melanotic tumor suppressors *ddb1* or *DREF* by RNAi in several non-immune tissues did not induce melanotic masses [42,50], and  $\text{Hop}^{\text{TumI}}$  or a dominant negative form of GCM induced melanotic masses when ectopically expressed respectively in blood cells or in the fat body, but not in other tissues [31,64,65]. All together, there is no strong evidence that melanotic capsule can arise from genetic defects outside the hematopoietic system or the fat body. Indeed, the rare "class I" mutations that have been studied (*kurtz*, *tuW* and *tu-Sz<sup>ts</sup>*) have been shown to affect fat body integrity [28,66]. While our results demonstrate for the first time that fat body-specific loss of function can cause lamellocyte differentiation and melanotic mass production, the mechanisms involved remain unclear. The fat body may be a specific source of signaling molecules that activate lamellocyte differentiation or more generally control hemocyte differentiation. Conversely, several lines of evidence show that hemocytes can signal to the fat body to regulate the humoral immune response [12,13,67,68]. This cross talk between the fat body and the hematopoietic system is likely to play a crucial role in coordinating the cellular and humoral immune response to ensure efficient defense of the organism.

Our results show that, within the hematopoietic system, loss of function in larval lymph gland prohemocytes, in differentiated larval blood cells or in embryonic plasmatocytes is sufficient to induce melanotic masses in the larvae. The only resilient blood cell type seemed to be the crystal cells, as we never observed nodules or lamello-

cytes induction with the *lz-Gal4* driver, even by overexpressing with this driver the two paradigmatic melanotic tumor inducers  $\text{Toll}^{\text{I0b}}$  and  $\text{Hop}^{\text{Tum}}$  (AAR, unpublished observations). Thus melanotic tumor formation can serve as a read out to identify genes potentially controlling several steps of blood cell development. For instance, it may help defining the gene regulatory network that control the maintenance of a pool of stem-like blood cells in the lymph gland cortical zone [8,9]. Actually, the respiratory chain component ND75 that we recovered in the screen, was recently shown to participate in the maintenance of these progenitors by controlling the levels of reactive oxygen species [39].

An important finding that stems out of the analysis of some genes identified in the screen is that impinging on the function of embryo-derived hemocytes is sufficient to cause lamellocyte differentiation in the larvae. Our cell lineage analysis demonstrates that embryo-derived plasmatocytes cell-autonomously give rise to lamellocytes in response to a genetic defect (*ush* loss) or to wasp infection. These results are consistent with and extend the recent observation that embryo-derived hemocytes can differentiate in lamellocytes after wasp infection [24]. Whereas Markus *et al.* proposed that lamellocytes differentiate from hemocyte precursors [24], our analysis strongly suggests that they derive from plasmatocytes through a step-wise process. In addition, we found that the presence of "mutant" embryo-derived blood cells induced non-autonomously the differentiation of lamellocytes in the lymph gland, indicating that circulating hemocytes signal to this hematopoietic organ. Mutations in the EBF transcription factor Collier (which is expressed in the posterior signaling centre) or in the JAK/STAT signaling pathway (which is active in the medullary zone) were shown to induce precocious differentiation of the lymph gland progenitors and to suppress lamellocyte fate, strongly suggesting that lamellocyte differentiate solely in the lymph gland from a pool of progenitors [8,22]. Alternatively, we propose that the posterior signaling centre may orchestrate differentiation into lamellocytes of both circulating and lymph gland blood cells. Thereby, full blown lamellocyte differentiation and melanotic nodule formation would result from a cross talk between the patrolling larval blood cells and the lymph gland.

Finally our result shed new light on the function of the Friend of GATA transcription cofactor Ush, which had already been implicated in several steps of blood cell development [41,69-72]. Consistent with our results, it was shown that hypomorphic *ush* zygotic mutations or the ectopic expression of a dominant negative form of Ush under the control of *cg-Gal4* induced lamellocyte differentiation [41]. Moreover, it was proposed that Ush was required in the lymph gland to prevent lamellocyte

differentiation in a putative plasmatocyte/lamellocyte common progenitor [41,69]. Yet the fate of the *ush* mutant cells had not been tracked. Remarkably, we demonstrate here that *ush* function is not restricted to the lymph gland. Indeed *ush* loss in circulating plasmatocytes during embryogenesis is sufficient to cause the cell-autonomous transformation of these cells into lamellocytes and to promote lamellocyte development in the lymph gland. Thus down-regulation of *ush* function in the circulating larval blood cells could be an initiating event in the immune response that leads to melanotic mass formation. Our results also identify *ush* as the first gene controlling the fate of the circulating larval blood cells and lay the basis for the analysis of the gene networks controlling this hematopoietic compartment.

## Conclusions

In this study, we show that lamellocyte differentiation and melanotic tumor formation can be elicited specifically by defects in different immune compartments (embryo-derived blood cells, larval hematopoietic organ or fat body). These results shed new lights on the coordination of the cellular immune response and on blood cell lineage relationships in *Drosophila*. Notably, we demonstrate that embryo-derived plasmatocytes are plastic cells that can differentiate into lamellocytes and that *ush* is a key regulator of this process. Finally, this work pinpoints several new genes and pathways controlling *Drosophila* blood cell homeostasis. Their identification paves the way for future experiments aiming at dissecting their mechanism of action and their interplay with other known key regulators of *Drosophila* hematopoiesis. It is anticipated that deciphering the function of these genes in the different blood cell types will shed new light on the mechanisms controlling blood cell homeostasis and cellular immune response in *Drosophila* and, by homology, in mammals.

## Methods

### Fly strains and genetic crosses

Flies were raised at 25° on standard cornmeal and agar media. The following strains were used: *srp-Gal4* [73]; *hmlΔ-Gal4* [37]; *cg-Gal4* [36]; *gcm-Gal4* [35]; *sn-Gal4* (Zanet et al., in preparation); *fb-Gal4* (from M. Meister); *cad-Gal4*, *tepIV-gal4* (from Kyoto DGRC); *MS1096*, *en-Gal4*, *repo-Gal4*, *elav-Gal4*, *Act5C > FRT > CD2 > FRT > Gal4*, *UAS-FLP*, *msn-lacZ*, *UAS-EGFP*, *UAS-mCD8GFP* (from Bloomington). *UAS-dsRNA* transgenic lines were obtained from the Japanese National Institute of Genetic (NIG), the Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC) and Bloomington.

A collection of 1941 *UAS-dsRNA* transgenic lines targeting 1341 genes (Additional file 4, Table S1) obtained from NIG was analyzed in our primary screen. For this,

5-7 virgin females carrying either the *hmlΔ-Gal4* or the *srp-Gal4* driver were crossed to 3-4 males carrying the different *UAS-dsRNA* transgenes. Vials were changed every two days and presence of melanotic masses was evaluated in the progeny by examining under the dissection microscope an average of 20 wandering larvae. Candidate *UAS-dsRNA* lines inducing melanization with at least one driver were systematically retested with both drivers as well as with *cg-Gal4* and the corresponding "tumor" indices (percentage of larvae harboring at least one melanotic masse) were determined on a minimum of 50 larvae. For validation of the candidate genes, independent secondary *UAS-dsRNA* lines or mutant alleles were obtained from VDRC and Bloomington.

### Hemocyte labeling

To observe the circulating larval hemocytes, third instar larvae were thoroughly washed in PBS and ethanol 75% and bled on polylysine-coated glass slides (Nunc). For immunostaining and/or phalloidin labeling, hemocytes were briefly air-dried and then fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde in PBS. After two washes in PBS, hemocytes were permeabilized for 15 min in PBS, 0.3% Triton (PBST), rinsed twice in PBST-1% BSA, and blocked 15 min in PBST-1% BSA. Hemocytes were incubated 2 h at room temperature or overnight at 4°C with primary antibody. After several 15 min washes, cells were incubated 2 h with secondary antibody and / or with phalloidin SR101 (1:200) (SIGMA) and washed 4 times in PBST. Slides were mounted in Vectashield-DAPI medium. Double fluorescent immuno-staining and *in situ* hybridization on circulating blood cells were performed as described in [74].

For lymph gland analysis, third instar larvae were dissected in ice cold PBS, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde, washed three times 15 min in PBST and pre-incubated for 1 h at 60°C in Hybridization Buffer (HB: 50% formamide, 2 × SSC, 1 mg/ml Torula RNA, 0.05 mg/ml Heparin, 2% Roche blocking reagent, 0.1% CHAPS, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 20). Larvae were then incubated overnight at 60°C with DIG-labeled RNA probe, washed twice for 1 h in 50% HB-50% PBST at 60°C and three times 20 min in PBST-1% BSA at room temperature, before 3 h incubation with sheep anti-DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:2000; Roche). Finally, larvae were extensively washed in PBST and the *in situ* hybridization signal was revealed with FastRed or NBT/BCIP substrates. Lymph glands were mounted in 50% glycerol-PBS or in Vectashield-DAPI.

The following primary antibodies were used: mouse anti-P1/NimC1 (1:30) (kind gifts from I. Ando, [75]), rabbit anti-β galactosidase (1:1000, Cappel), rabbit anti-GFP (1:1000; Torrey). The corresponding secondary antibodies coupled to Alexa fluor 488 or 555 (1:400) (Molecular

Probes). For *in situ* hybridization, we used DIG-UTP labeled  $\alpha$ -*ps4* and *tepIV* anti-sense RNA probes [53,76]. For *in situ* hybridization followed by immunostaining, primary antibodies were used 5 times more concentrated.

### Wasp egg parasitization

To obtain synchronous larval populations, females were left to lay eggs for 4–6 hours. Second instar larvae were submitted to infection by *L. bouvardi* during 2–4 h, and then allowed to develop 24 or 48 h before being analyzed as described above.

### Additional material

**Additional file 1 Figure S1.** Expression pattern of different Gal4 lines in the embryo and in the circulating hemocytes, lymph gland and fat body of third instar larvae. The activity of the indicated Gal4 lines was revealed using either a *UAS-lacZ* or a *UAS-GFP* reporter transgene whose expression was detected respectively by *in situ* hybridization against *lacZ* in embryos or by fluorescent immunostaining against GFP in third instar larvae. Circulating hemocyte actin cytoskeleton was labeled with phalloidin (red). Lymph gland and fat body nuclei were counterstained with DAPI (blue).

**Additional file 4 Table S1.** Results from the primary and secondary screens.

**Additional file 5 Table S2.** Validation of candidates with secondary *UAS-dsRNA* lines.

**Additional file 6 Table S3.** List of confirmed melanotic suppressor genes.

**Additional file 2 Figure S2.** High magnification view of a melanotic mass (induced using *srp-Gal4*, *UAS-GFP*; *UAS-ds-Ush*). GFP and phalloidin staining show that the mass is surrounded by lamellocytes.

**Additional file 3 Figure S3.** Flip-out analysis of the expression pattern of *sn-Gal* and *gcm-Gal4* in circulating larval blood cells. Blood cells smears from third instar larvae of the indicated genotypes were processed to reveal nuclear-GFP (in green) and P1/NimC1 (in red) expression by double fluorescent immuno-labeling. Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

### Authors' contributions

AAR and KB performed most experiments, contributed to acquisition of all data, analyzed and interpreted the data. CP participated in the design of the experiments and interpretation of the results. CP, VG, DO, BA, FR participated in the realization of the screen and provided important genetic tools. JZ provided important genetic tools. MH and LW conceived and coordinated the project. AAR, KB, CP, FR and MH have been involved in drafting the manuscript. LW wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We deeply thank the National Institute of Genetics Fly Stock Center (Japan), the Bloomington *Drosophila* Stock Center, the Vienna *Drosophila* Resource Centre as well as S. Sinenko and I. Ando for fly stocks and reagents. We thank Toulouse RIO imaging platform for assistance with confocal microscopy. This work was supported by the CNRS and by grants from the Agence Nationale pour la Recherche, Association pour la Recherche sur le Cancer and Association for International Cancer Research.

### Author Details

<sup>1</sup>Université de Toulouse, UPS, CBD (Centre de Biologie du Développement), Bât4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France, <sup>2</sup>CNRS, CBD UMR5547, 31062 Toulouse, France and <sup>3</sup>King's College London, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK

Received: 19 February 2010 Accepted: 11 June 2010

Published: 11 June 2010

### References

1. Hartenstein V: **Blood cells and blood cell development in the animal kingdom.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:677-712.

2. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL: **Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application.** *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:759-806.
3. Crozatier M, Meister M: **Drosophila haematopoiesis.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:1117-1126.
4. Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V: **Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila.** *Development* 1994, **120**:1829-1837.
5. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M: **Postembryonic hematopoiesis in Drosophila.** *Dev Biol* 2001, **230**:243-257.
6. Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R: **The two origins of hemocytes in Drosophila.** *Development* 2003, **130**:4955-4962.
7. Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U: **The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis.** *Development* 2005, **132**:2521-2533.
8. Krzemiński J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M: **Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre.** *Nature* 2007, **446**:325-328.
9. Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: **A Hedgehog-and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila hematopoietic precursors.** *Nature* 2007, **446**:320-324.
10. Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K: **Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila.** *Science* 1999, **284**:1991-1994.
11. Sears HC, Kennedy CJ, Garrity PA: **Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal Drosophila CNS morphogenesis.** *Development* 2003, **130**:3557-3565.
12. Brennan CA, Delaney JR, Schneider DS, Anderson KV: **Psidin is required in Drosophila blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body.** *Curr Biol* 2007, **17**:67-72.
13. Bergeret E, Perrin J, Williams M, Grunwald D, Engel E, Thevenon D, Taillebourg E, Bruckert F, Cosson P, Fauvarque MO: **TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis.** *Journal of Cell Science* 2008, **121**:3325-3334.
14. Rizki TM, Rizki RM: **Properties of the larval hemocytes of Drosophila melanogaster.** *Experientia* 1980, **36**:1223-1226.
15. Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS: **Hemolymph coagulation and phenoloxidase in Drosophila larvae.** *Dev Comp Immunol* 2005, **29**:669-679.
16. Cerenius L, Soderhall K: **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** *Immunol Rev* 2004, **198**:116-126.
17. Rizki TM, Rizki RM: **The cellular defense system of Drosophila melanogaster.** In *Insect ultrastructure Volume 2*. Plenum edition. Edited by: King RC, Akai H. New York: Plenum; 1984:579-604. [King RC, Akai H (Series Editor)]
18. Sorrentino RP, Carton Y, Govind S: **Cellular immune response to parasite infection in the Drosophila lymph gland is developmentally regulated.** *Dev Biol* 2002, **243**:65-80.
19. Shrestha R, Gateff E: **Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of Drosophila melanogaster.** *Dev Growth Differ* 1982, **24**:65-82.
20. Rizki TM: **Alterations in the haemocyte population of Drosophila melanogaster.** *J Morphol* 1957, **100**:437-458.
21. Rizki TM: **Experimental analysis of hemocyte morphology in insects.** *Am Zool* 1962, **2**:247-256.
22. Crozatier M, Ubeda JM, Vincent A, Meister M: **Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E196.
23. Sorrentino RP, Melk JP, Govind S: **Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in Drosophila.** *Genetics* 2004, **166**:1343-1356.
24. Markus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Ando I: **Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in Drosophila melanogaster.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:4805-4809.
25. Dearolf CR: **Fruit fly "leukemia".** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1377**:M13-23.
26. Minakhina S, Steward R: **Melanotic mutants in Drosophila: pathways and phenotypes.** *Genetics* 2006, **174**:253-263.

27. Vassalli MKL, Xofressant TK: **Deregulation of the Drosophila immune response is mediated by the IκB kinase signaling information in Drosophila melanogaster.** *Genetics* 2009, **172**:6086-6096.
28. Wenzler G, Ferjoudi S, Batakurtz J: **A novel MCoS2 protein is essential for the Drosophila immune response and for the development of the Drosophila hematopoietic system.** *Genetics* 2009, **172**:2115-2125.
29. Wenzler G, Ferjoudi S, Batakurtz J: **The Drosophila tumorous-lethal protein is essential for the Drosophila hematopoietic system.** *Genetics* 2009, **172**:2126-2135.
30. Wenzler G, Ferjoudi S, Batakurtz J: **The Drosophila tumorous-lethal protein is essential for the Drosophila hematopoietic system.** *Genetics* 2009, **172**:2136-2145.
31. Wenzler G, Ferjoudi S, Batakurtz J: **The Drosophila tumorous-lethal protein is essential for the Drosophila hematopoietic system.** *Genetics* 2009, **172**:2146-2155.
32. Wenzler G, Ferjoudi S, Batakurtz J: **The Drosophila tumorous-lethal protein is essential for the Drosophila hematopoietic system.** *Genetics* 2009, **172**:2156-2165.
33. Gerttula S, Jin YS, Anderson KV: **Zygotic expression and activity of the Drosophila Toll gene are required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation.** *Genetics* 1988, **119**:123-133.
34. Avet-Rochex et al.: **An in vivo RNA interference screen identifies genes involved in Drosophila larval hematopoiesis.** *BMC Developmental Biology* 2010, **10**:65.
35. Bataille L, Auge B, Ferjoudi S, Haenlin M, Waltzer L: **Resolving embryonic blood cell fate choice in Drosophila: interplay of GCM and RUNX factors.** *Development* 2005, **132**:4635-4644.
36. Asha H, Nagy I, Kovacs G, Stetson D, Ando I, Dearolf CR: **Analysis of Ras-induced overproliferation in Drosophila hemocytes.** *Genetics* 2003, **163**:203-215.
37. Sinenko SA, Mathey-Prevot B: **Increased expression of Drosophila tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes.** *Oncogene* 2004, **23**:9120-9128.
38. Charroux B, Royet J: **Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the Drosophila immune response.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:9797-9802.
39. Owusu-Ansah E, Banerjee U: **Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation.** *Nature* 2009, **461**:537-541.
40. Qiu P, Pan PC, Govind S: **A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis.** *Development* 1998, **125**:1909-1920.
41. Sorrentino RP, Tokusumi T, Schulz RA: **The Friend of GATA protein U-shaped functions as a hematopoietic tumor suppressor in Drosophila.** *Dev Biol* 2007, **311**:311-323.
42. Yoshida H, Kwon E, Hirose F, Otsuki K, Yamada M, Yamaguchi M: **DREF is required for EGFR signalling during Drosophila wing vein development.** *Genes Cells* 2004, **9**:935-944.
43. Kulkarni MM, Booker M, Silver SJ, Friedman A, Hong P, Perrimon N, Mathey-Prevot B: **Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in Drosophila melanogaster cell-based assays.** *Nat Methods* 2006, **3**:833-838.
44. Watson KL, Konrad KD, Woods DF, Bryant PJ: **Drosophila homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:11302-11306.
45. Tselykh TV, Roos C, Heino TI: **The mitochondrial ribosome-specific MrpL55 protein is essential in Drosophila and dynamically required during development.** *Exp Cell Res* 2005, **307**:354-366.
46. Harari-Steinberg O, Cantera R, Denti S, Bianchi E, Oron E, Segal D, Chamovitz DA: **COP9 signalosome subunit 5 (CSN5/Jab1) regulates the development of the Drosophila immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis.** *Genes Cells* 2007, **12**:183-195.
47. Oren-Giladi P, Krieger O, Edgar BA, Chamovitz DA, Segal D: **Cop9 signalosome subunit 8 (CSN8) is essential for Drosophila development.** *Genes Cells* 2008, **13**:221-231.
48. Braun A, Lemaitre B, Lanot R, Zachary D, Meister M: **Drosophila immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap.** *Genetics* 1997, **147**:623-634.
49. Tsuchiya A, Inoue YH, Ida H, Kawase Y, Okudaira K, Ohno K, Yoshida H, Yamaguchi M: **Transcriptional regulation of the Drosophila rfc1 gene by the DRE-DREF pathway.** *FEBS J* 2007, **274**:1818-1832.
50. Takata K, Yoshida H, Yamaguchi M, Sakaguchi K: **Drosophila damaged DNA-binding protein 1 is an essential factor for development.** *Genetics* 2004, **168**:855-865.
51. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW: **Two families of chaperonin: physiology and mechanism.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007, **23**:115-145.
52. Rizki TM, Rizki RM: **Lamellocyte differentiation in Drosophila larvae parasitized by Leptopilina.** *Dev Comp Immunol* 1992, **16**:103-110.
53. Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M: **New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis.** *Cell Microbiol* 2005, **7**:335-350.
54. Zanet J, Stramer B, Millard T, Martin P, Payre F, Plaza S: **Fascin is required for blood cell migration during Drosophila embryogenesis.** *Development* 2009, **136**:2557-2565.
55. Stofanko M, Kwon SY, Badenhorst P: **A misexpression screen to identify regulators of Drosophila larval hemocyte development.** *Genetics* 2008, **180**:253-267.
56. Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Ando I, Hultmark D: **A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:14192-14197.
57. Huang L, Ohsako S, Tanda S: **The lesswright mutation activates Related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in Drosophila melanogaster.** *Dev Biol* 2005, **280**:407-420.
58. Korolchuk VI, Schutz MM, Gomez-Llorente C, Rocha J, Lansu NR, Collins SM, Wairkar YP, Robinson IM, O'Kane CJ: **Drosophila Vps35 function is necessary for normal endocytic trafficking and actin cytoskeleton organization.** *Journal of Cell Science* 2007, **120**:4367-4376.
59. Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant PJ: **A role for adenosine deaminase in Drosophila larval development.** *PLoS Biol* 2005, **3**:e201.
60. Sinenko SA, Kim EK, Wynn R, Manfruelli P, Ando I, Wharton KA, Perrimon N, Mathey-Prevot B: **Yantar, a conserved arginine-rich protein is involved in Drosophila hemocyte development.** *Dev Biol* 2004, **273**:48-62.
61. Minakhina S, Druzhinina M, Steward R: **Zfrp8, the Drosophila ortholog of PDCD2, functions in lymph gland development and controls cell proliferation.** *Development* 2007, **134**:2387-2396.
62. Cronin SJ, Nehme NT, Limmer S, Liegeois S, Pospisilik JA, Schramek D, Leibbrandt A, Simoes Rde M, Gruber S, Puc U, et al.: **Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection.** *Science* 2009, **325**:340-343.
63. Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ, Knoblich JA: **Genome-wide analysis of Notch signalling in Drosophila by transgenic RNAi.** *Nature* 2009, **458**:987-992.
64. Jacques C, Soustelle L, Nagy I, Diebold C, Giangrande A: **A novel role of the glial fate determinant glial cells missing in hematopoiesis.** *Int J Dev Biol* 2009, **53**:1013-1022.
65. Bach EA, Vincent S, Zeidler MP, Perrimon N: **A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway.** *Genetics* 2003, **165**:1149-1166.
66. Rizki RM, Rizki TM: **Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of Drosophila.** *Experientia* 1974, **30**:543-546.
67. Shia AK, Glittenberg M, Thompson G, Weber AN, Reichhart JM, Ligoxygakis P: **Toll-dependent antimicrobial responses in Drosophila larval fat body require Spt4a secreted by hemocytes.** *Journal of Cell*

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## II. RÉSULTATS

### A. LE CHOIX DES CAPSULES MELANOTIQUES

Le choix de l'apparition de tumeurs mélanotiques comme paradigme afin de mettre en lumière de nouveaux réseaux géniques impliqués dans l'homéostasie des hémocytes s'est révélée être une bonne stratégie. Premièrement, nous avons dû établir les conditions expérimentales adéquates et les modalités du crible. Bien que la pénétrance de ce phénotype puisse, dans une certaine mesure, dépendre de l'environnement, l'incorporation de contrôles internes nous a permis d'esquiver cette problématique. Dans un souci de préserver la stringence du crible et de limiter le nombre de candidats faux positifs, nous avons fixé un seuil positif à 5%. Dans ces conditions, nous obtenons un taux de points de 7,1% correspondant à 96 candidats, soit dans un ordre de grandeur acceptable pour un tel crible. Ces nouveaux gènes sont autant de nouveaux points d'entrée pour améliorer la compréhension des mécanismes gouvernant la réponse cellulaire immunitaire, au moins, chez la drosophile.

### B. IDENTIFICATION DE GENES SUPPRESSEURS DE CAPSULES MELANOTIQUES

Pour réaliser ce crible, nous avons choisi d'utiliser une stratégie d'interférence à l'ARN (RNAi) *in vivo*. Pour cela nous avons tiré avantage d'une collection de lignées transgéniques UAS-dsRNA ciblant chacun des 14.000 gènes de la drosophile qui venaient d'être développées (NIG, Japon). La production du RNAi est assurée par le système UAS/GAL4 ce qui permet d'inactiver sélectivement un gène de façon inductible et tissu spécifique. Cette approche présente trois avantages : la nature du gène ciblé est connue (même si un effet « off-target » du RNAi doit être considéré), la perte de fonction est induite dans les tissus d'intérêts (cellules hématopoïétiques et/ou autre tissu

larvaire), et même des gènes requis pour la viabilité embryonnaire peuvent être analysés. Nous avons utilisé trois pilotes Gal4 différents qui permettent de cibler soit préférentiellement les deux compartiments hématopoïétiques soit les hémocytes et le corps gras qui est un tissu immun décrit comme une cible de réaction « auto-immune ».

### C. VALIDATION DES GÈNES CANDIDATS

Sur 1500 gènes testés, nous avons obtenu 96 candidats pour lesquels une perte de fonction par UAS-dsRNA induit des tumeurs mélanotiques de façon reproductible et fréquente dans les larves. Afin de valider certains candidats, nous avons utilisé plusieurs approches en fonction des outils disponibles : (1) une analyse génétique « classique » à partir d'allèles mutants existants ou générés au laboratoire ; (2) l'utilisation d'une deuxième lignée ds-RNA indépendante (VDCR, Vienna) et ciblant une autre région du transcrit pour inhiber leur fonction et/ou l'utilisation de ds-RNA dirigés contre des partenaires fonctionnels connus des gènes candidats ; (3) des expériences de sauvetage. Ces approches nous ont permis de valider près de 70% des candidats

### D. ANALYSE FONCTIONNELLE DES CANDIDATS

La majorité des candidats validés se répartissent en 7 groupes fonctionnels (protéines chaperonnes, protéasome, trafic vésiculaire, protéines ribosomales, métabolisme des mitochondries, réparation de l'ADN, transcription). Nous avons ensuite restreint notre analyse à 7 candidats sur la base de leur conservation phylogénétique, leur représentativité au sein d'une famille ou d'un processus biologique et la pénétrance des phénotypes. Grâce à l'utilisation d'un panel de pilotes Gal4 et une analyse phénotypique plus approfondie nous avons caractérisé dans quels compartiments hématopoïétiques (circulation et/ou glande) ou tissu larvaire (corps gras) ils sont requis.

D'autre part, les analyses de lignage que j'ai réalisées montrent que les plasmocytes d'origine embryonnaire peuvent devenir des lamellocytes, que cela soit suite à un parasitisme ou à la perte de fonction restreinte aux hémocytes embryonnaires d'un gène tel que *u-shaped* (*ush*). Ces résultats révèlent une plasticité insoupçonnée de ce type

cellulaire et remettent en cause le modèle selon lequel les lamellocytes sont issus uniquement de progéniteurs présents dans la glande lymphatique.

En conclusion, le crible que nous avons réalisé nous a permis d'identifier de nouveaux points d'entrée pour étudier le contrôle de l'homéostasie du système hématopoïétique de la *Drosophile*. Nous avons mis en évidence que la formation des tumeurs mélanotiques repose sur des communications entre les cellules sanguines circulantes et la glande lymphatique et entre le corps gras et les hémocytes. Nos résultats nous amènent également à reconsidérer le modèle de formation des tumeurs mélanotiques en y intégrant notamment la plasticité des cellules circulantes d'origine embryonnaire.



*-RESULTATS  
SUPPLEMENTAIRES  
ET DISCUSSION-*



La réalisation de ce crible de perte de fonction ciblée nous a permis de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie des hémocytes chez la *Drosophile*. Nous avons montré que seuls les tissus immuns (corps gras et hémocytes) semblent capables d'induire cette réponse (*i.e.* sont « immunogéniques »). Une modification de l'homéostasie de ces tissus comme élément déclencheur sera discutée dans la première partie. Nos résultats pointent sur un degré de complexité supérieur dans le déclenchement de la réponse d'encapsulation et ils seront discutés dans les parties suivantes. D'une part, nous discuterons de la communication entre les acteurs de la réponse avec la mise en évidence de deux nouveaux relais de communication; le corps gras et le PSC. D'autre part, nous aborderons aussi les aspects correspondants à la réalisation du programme hématopoïétique, avec la démonstration de la plasticité des hémocytes.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence de nouveaux réseaux génétiques impliqués dans la formation des tumeurs mélanotiques. Les données recueillies sur certains des gènes candidats, seront intégrées au fil de la discussion et je proposerai des hypothèses quant à leur mode d'action dans le contrôle de l'homéostasie des cellules immunitaires.

## I. LA FORMATION DES TUMEURS MELANOTIQUES : DES TISSUS IMMUNS ET IMMUNOGENIQUES

Historiquement, la séparation entre les deux classes de tumeurs mélanotiques repose sur la nature de l'activation des hémocytes qui peut être causée par un défaut interne ou exogène à ces cellules (*cf.* chapitre 3). D'après nos résultats, la "réponse de type auto-immune", spécifiant la classe 1, ne concernerait en fait que le corps gras. Ce tissu semble présenter une spécificité qui sera discutée plus bas. Dans la classe 2, la "vraie classe de tumeurs sanguines" (Dearolf 1998), les voies de régulation intrinsèques des hémocytes sont affectées. Nos observations indiquent que la formation des tumeurs mélanotiques est systématiquement associée à la production de lamellocytes et à la différenciation précoce des prohémocytes de la glande lymphatique. L'homéostasie du système hématopoïétique est donc toujours mise en cause que ce soit directement ou indirectement. Les réseaux géniques que nous avons mis en évidence suggèrent diverses causes de perturbations, qui pourraient représenter autant de "classes" de tumeurs mélanotiques.

L'analyse de la composition des capsules mélanotiques réalisée par Minakhina et al. confirme que les lamellocytes en sont un élément constitutif (Minakhina and Steward, 2006). Cet examen approfondi a également révélé l'existence d'une classe de capsules comparables à des tumeurs des vertébrés car constituées d'hémocytes et d'agglomérat de tissus « transformés ». Le seul contexte dans lequel elle apparaît est la perte de fonction du gène *cactus*. Cette observation suggère que ces amas puissent être engendrés par une activité incontrôlée de l'activité de la protéine NF- $\kappa$ B Dorsal (*cf.* chapitre II). Ce contexte génétique se distingue également par le fait que certaines des capsules puissent être entourées d'hémocytes non lamellocytes (L1/Atila négatif). Lors de l'analyse approfondie de nos cinq candidats (*cf.* figure 4 de l'article) nous avons toujours observées la présence de lamellocytes. Cette catégorie de capsules se distingue

donc de celles que nous avons observées et ne sera pas prise en compte dans notre analyse.

## A. LE CORPS GRAS DESINTEGRE, UN TISSU ALTERE ET/OU UNE ALTERATION D'UN TISSU ?

En introduction, nous avons évoqué le fait que les tumeurs mélanotiques puissent être déclenchées suite à une altération d'un tissu endogène. Néanmoins, lors de la réalisation du crible, nous avons observé que le seul tissu présentant une désintégration à laquelle pouvaient être associées des tumeurs mélanotiques était le corps gras (figure article). Selon la bibliographie, l'altération du corps gras peut être à l'origine de l'activation des hémocytes et inversement (*cf.* introduction, chapitre 3). Ainsi, l'observation d'un corps gras désintégré peut être due à une altération autonome ou bien à une « attaque » de ce tissu par les hémocytes.

Lors de la formation de tumeurs mélanotiques avec une « encapsulation du corps gras », quel est le type d'altération qui conduit à cette réponse ?

### 1. L' APOPTOSE

Un allèle de *dronc*, un inducteur de l'apoptose, a été identifié comme générant des tumeurs mélanotiques plaçant ainsi la mort cellulaire comme un élément déclencheur potentiel (Daish et al., 2004; Minakhina and Steward, 2006). La formation des tumeurs mélanotiques pourrait correspondre à une réponse générique à l'augmentation de l'apoptose qui serait massive dans le cas du corps gras qui occupe une place très importante dans la cavité larvaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris d'exprimer de manière ectopique un inducteur de la mort cellulaire, Hippo, dans les tissus immuns (Udan et al., 2003). Dans ces conditions, aucune capsule mélanotique n'a été repérée (données personnelles). L'induction de la mort cellulaire programmée dans les différents compartiments éprouvés (corps gras, hémocytes, glande lymphatique) n'est pas en faveur de ce procédé comme élément déclencheur. De plus, la déplétion de la majorité des plasmotocytes larvaires, réalisée grâce à l'expression ectopique de la

protéine pro-apoptotique Hid ou Bax, ne conduit pas, chez ces individus, à la constitution de tumeur mélanotiques (Charroux and Royet, 2009; Defaye et al., 2009). De même l'induction massive de mort cellulaire programmée ne serait pas suffisante pour générer ces pseudotumeurs (Markovic et al., 2009).

## 2. "LA REPONSE AUX TISSUS ENDOMMAGES"

La désintégration du tissu correspond à une perte d'homéostasie tissulaire qui activerait le système de surveillance des tissus endommagés ; à savoir les hémocytes (*cf* chapitre 2). La « réponse aux tissus endommagés » est déclenchée en cas de rupture de la membrane basale et/ou suite à une signalisation systémique (Pastor-Pareja et al., 2008; Babcock et al., 2008; Kelsey et al., 2012). Une réponse de type inflammatoire permet alors le recrutement des hémocytes au niveau des tissus cibles. Lors de la formation des tumeurs mélanotiques avec désintégration du corps gras, une rupture de l'intégrité de la membrane basale est observée au niveau de ce tissu cible (Roman et al., 2000; Paddibhatla et al., 2010) . De plus, des hémocytes activés ont la capacité d'infiltrer les corps gras (Paddibhatla et al., 2010; Shim et al., 2012) . Cependant, la « réponse aux tissus endommagés » dans les tissus épithéliaux induit uniquement la prolifération des plasmotocytes et la phagocytose des tissus altérés mais pas la formation de tumeurs mélanotiques ou la différenciation de lamellocytes (Pastor-Pareja and Xu, 2011; Lolo et al., 2012) . L'ensemble de ces éléments suggère que l'altération du corps gras pourrait initier une activation des hémocytes. En revanche, une stimulation supplémentaire serait nécessaire pour induire la différenciation des lamellocytes et l'encapsulation.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La destruction précoce du corps gras pourrait engendrer un stress pour les plasmotocytes immatures et/ou en nombre insuffisant. En outre, la destruction du corps gras engendrerait une dérégulation de ses fonctions qui seraient en lien avec l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. En effet, le rôle du corps gras dans l'immunité et le métabolisme sont à même d'influer sur l'activité des hémocytes. D'une part, lors de la réponse immunitaire, le corps gras génère une signalisation systémique. Sa désintégration pourrait s'accompagner d'une activation inappropriée des voies Toll et Imd et causer la libération de molécules activatrices comme des cytokines (Paddibhatla et al., 2010). D'autre part, le corps gras est un organe "senseur" des conditions nutritives. Il occupe une place importante dans le stockage et la

répartition des réserves. Récemment un lien direct entre la modification de l'homéostasie des hémocytes et la baisse des ressources a été mis en évidence (Benmimoun et al., 2012; Shim et al., 2012). Une désintégration du corps gras pourrait être synonyme de manque de ressource ce qui serait un stress supplémentaire pour les hémocytes.

## B. LES LAMELLOCYTES : UNE PRODUCTION

### COMPARTIMENTÉE

Lors de la formation des tumeurs mélanotiques, une différenciation massive de lamellocytes a lieu. Notre approche multi-pilotes nous a permis d'établir que les hémocytes d'origine larvaire et embryonnaire contribuent tous deux à la génération de ce type cellulaire.

#### 1. LA GLANDE LYMPHATIQUE

##### a) DE-NICHER LES PROHEMOCYTES DE LA GLANDE LYMPHATIQUE

Au sein de la glande lymphatique, les prohémoocytes ont été décrits comme les cellules compétentes à se différencier en lamellocytes (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007) . Ils se répartissent dans la zone médullaire des lobes primaires et constituent la majorité des cellules des lobes secondaires. Une balance entre divers signaux qui s'échangent dans la glande et/ou provenant d'autres organes/tissus permet le maintien de cette population cellulaire. (*cf.* chapitre 2). L'engagement dans la différenciation est couplé au choix de destin plasmatocytes/cellules à cristaux *versus* lamellocytes. Sur les cinq pertes de fonction testées dont nous avons approfondi le phénotype, deux d'entre elles (*cct2* et *cul4*) sont suffisantes pour induire la différenciation massive des lamellocytes et la formation de tumeurs mélanotiques quand elles dirigées dans les prohémoocytes (le pilote TepIV-Gal) (*cf.* tableau 2 de l'article). Ces résultats suggèrent que ces deux gènes participent au maintien du caractère prohémoocyte et/ou à la restriction de leur potentiel de différenciation. Dans la caractérisation de la fonction de

ces candidats, une première étape serait de suivre l'évolution des populations cellulaires au sein des lobes primaires et secondaires dans ces contextes mutants. La comparaison des lobes nous indiquerait si les pertes de fonction affectent de concert toute la population des prohémyocytes.

### *Le candidat ND75*

Le phénotype du candidat *ND75* n'a pas été approfondi dans notre étude. En revanche, une étude investiguant la fonction de ce gène dans l'hématopoïèse de la glande lymphatique a récemment été publiée (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Au vu de son rôle dans la maturation des hémyocytes, ce candidat mérite notre attention.

*ND75* appartient au complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale. La disruption de sa fonction conduit à élever le niveau de ROS (ou dérivés actifs d'oxygènes) intracellulaire. A de hautes concentrations, les ROS induisent des dommages cellulaires pouvant conduire à l'apoptose. A des doses inférieures, ils sont impliqués dans l'hématopoïèse chez les vertébrés et la drosophile. Ils jouent sur la balance entre prolifération et transition vers la différenciation terminale (Ito et al., 2006; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Chez la drosophile, une élévation anormalement rapide du niveau de ces métabolites promeut la prolifération et la différenciation terminale des progéniteurs dès le stade L2 (cf. chapitre 1). Dans les expériences réalisées par Owusu-Ansah *et al.*; une perte de fonction de *ND75* est réalisée à partir du même outil dsRNAi que celui utilisé dans notre crible mais le pilote est cependant différent. Les prohémyocytes sont ciblés grâce à *DomeGal4*. Dans ces conditions, l'homéostasie de la glande lymphatique est modifiée mais pas sa régionalisation. La variation du niveau de ROS ne semble pas impacter les prohémyocytes *domeless+*, qui restent positifs pour ce marqueur, mais davantage les progéniteurs intermédiaires qui entrent en maturation. De plus, un différentiel de phénotype se crée entre les lobes primaires et secondaires. La pénétrance du phénotype de prolifération est plus importante dans les lobes postérieurs. Concernant la différenciation des types cellulaires, la formation massive de lamellocytes n'est observée que dans les lobes antérieurs. Cette variabilité en terme qualitatif et quantitatif pourrait être imputée à une différence de niveau de ROS entre les paires de lobes primaires et secondaires. En effet, l'hétérochronie développementale qui s'instaure le long de l'axe antéro-postérieur est reproduite par le pilote *dome-Gal4* ce

qui générerait un temps d'exposition variable au RNAi *ND75*. A faible dose, les ROS favoriseraient la prolifération des progéniteurs alors qu'à plus haute dose, la différenciation terminale en lamellocytes serait favorisée.

Néanmoins dans ce contexte de perte de fonction ciblée, les auteurs ne font pas mention de formation de tumeurs mélanotiques. La modification de l'homéostasie observée est-elle suffisante pour induire un relargage des hémocytes et/ou permettre leur agrégation ? Il serait aussi intéressant de comparer les phénotype obtenus avec les pilotes pan-hémocytaires et corps gras pour évaluer l'impact du stress oxydatif sur l'activation des autres compartiments immuns.

## b) LES LOBES SECONDAIRES : LE CAS DE *USH* ET DU PILOTE PColGal4

Nous avons testé la perte de fonction de *ush* avec le pilote PColGal4 (*cf.* paragraphe, III.B.2 p109). Ce contexte induit la formation de tumeurs mélanotiques. Le pilote choisi est exprimé dans le PSC mais aussi dans certains lobes secondaires. Or *ush* est fortement transcrit dans les prohémocytes mais pas dans le PSC (Tokusumi et al., 2010). La formation de capsules est donc probablement liée à la diminution de l'activité de *ush* dans les hémocytes des lobes secondaires qui pourraient être à l'origine des tumeurs mélanotiques. Cette hypothèse est étayée par la description du mutant *Ubc9*, contexte dans lequel les tumeurs mélanotiques émanent des lobes primaires mais aussi secondaires (Kalamarz et al., 2012). Si cette hypothèse se confirme, cette perte de fonction ciblée indiquerait que la modification de l'homéostasie des lobes secondaires puisse être suffisante pour déclencher la réaction. La contribution respective des lobes primaires et des autres compartiments hématopoïétiques à la formation des capsules mériterait d'être analysée dans le détail.

## 2. MOBILISER TOUS LES FRONTS : DU RESIDANT AU CIRCULANT

Les hémocytes d'origine embryonnaire sont impliqués à toutes les étapes de la réponse d'encapsulation. En plus, de contribuer à l'immuno-surveillance et à la communication systémique, ils collaborent à l'"effort de guerre" comme source de lamellocytes. Afin

d'évaluer cette contribution, nous avons réalisé des pertes de fonctions grâce au pilote pan-hémocytaire *srp-Gal4* dans un contexte mutant amorphe pour le gène *latran*. Cette mutation affecte l'immunocompétence de la glande lymphatique (Makki et al., 2010) et empêche la différenciation des lamellocytes dans la glande et ainsi réduit la formation de capsules mélanotiques lors d'une infection par *L. bouvardi*. Bien que la mutation *latran* diminue le taux de formation des capsules mélanotiques, cela n'est pas suffisant pour abroger leur formation, (données personnelles). La persistance de ces capsules témoigne d'une différenciation massive de lamellocytes qui sont donc probablement générés à partir des hémocytes d'origine embryonnaire. Ceci suggère fortement que cette population d'hémocytes est un contributeur majeur de la réponse d'encapsulation en contexte physiologique (infection par *L. bouvardi*, cf (Márkus et al., 2009)) ou de perte de fonction.

- Ilots sessiles versus circulation

Les hémocytes d'origines embryonnaires se retrouvent dans la circulation et les îlots sessiles (Holz et al., 2003). Nos expériences de traçage confirment une répartition bipartite de ces hémocytes ainsi que leur mobilisation lors de la réponse d'encapsulation (observations personnelles). Une concomitance entre la différenciation des lamellocytes et la perte des îlots sessiles est observée dans de nombreux contextes de gain de fonction ciblée aux hémocytes différenciés de la larve (Zettervall et al., 2004; Stofanko et al., 2008). De manière intéressante, Markus et al, ont proposé que les cellules hématopoïétiques composant les îlots postérieurs dorsaux constituait un site d'hématopoïèse indépendant de la glande lymphatique (ou tissu hématopoïétique postérieur: THP) capable de générer des lamellocytes suite à une stimulation immunitaire (Márkus et al., 2009). Nos résultats et deux autres publications reposant sur des expériences de traçage des hémocytes d'origine embryonnaire confirment la contribution commune des hémocytes en circulation et ceux issus des sessiles en contexte immunitaire ou de perte/gain de fonction ciblé (Honti et al., 2010; Stofanko et al., 2010; Avet-Rochex et al., 2010).

Les hémocytes sessiles sont libérés dans la circulation pour se transformer en lamellocytes (Márkus et al., 2009). Cette délocalisation/libération participe-t-elle à leur

transdifférenciation ? La libération « mécanique » (en émettant une légère pression sur la larve) des hémocytes sessiles dans l'hémolymphe conduit à leur relocalisation stéréotypée dans la demi-heure (Makhijani et al., 2011). En revanche, un contexte de surexpression de la tyrosine kinase *src* dans ces cellules sessiles (pochettes musculaires et THP) induit leur mobilisation et la différenciation des lamellocytes (Williams, 2009). Il est toutefois impossible de conclure si cette délocalisation est à l'origine de la différenciation en lamellocytes.

## II. LA PLASTICITÉ DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

L'hématopoïèse est un processus développemental soumis à des stimuli immuns capables d'influer sur son exécution. La modification du choix de destin en fonction du contexte environnemental est rendue possible par la plasticité des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules souches qui sont capables d'adopter différents destins. Dans notre système, cette capacité est aussi partagée par les cellules différenciées. « Ces » plasticités cellulaires, qui diffèrent selon l'état de maturité des cellules, ne sont pas une spécificité de la Drosophile.

### A. PLASTICITÉ HÉMATOPOÏÉTIQUE ET IMMUNOCOMPÉTENCE

En introduction (*cf.* chapitre 2), nous nous sommes référés au terme d'immunocompétence pour décrire la capacité des hémocytes à adopter le destin lamellocyte. La plasticité cellulaire permettrait l'acquisition de cette compétence par des hémocytes de maturité différentes. Dans des cellules indifférenciées, le programme de différenciation n'étant pas encore appliqué, nous parlerons de plasticité « développementale ». Dans les hémocytes différenciées, la fonction initiale de phagocytose étant abandonnée au profit de celle d'encapsulation, nous parlerons de plasticité « fonctionnelle ».

#### 1. LES CELLULES INDIFFERENCIÉES : PLASTICITÉ

##### « DÉVELOPPEMENTALE »

##### a) LES PROHÉMOCYTES DE LA GLANDE LYMPHATIQUE

Dans les prohémostocytes au stade L2, le choix de destin entre plasmatocytes et cellules à cristaux serait scellé (Krzemien et al., 2010). Toutefois, il a été proposé que en parallèle, les prohémostocytes acquièrent également à ce stade la compétence à se développer en

lamellocytes suite à un pic d'ecdysone. Ainsi, le destin lamellocyte serait uniquement révélé en réponse à un stimulus approprié. La notion de plasticité pourrait donc aussi s'appliquer aux prohémyocytes de la glande qui adaptent leur choix en fonction de l'état immunitaire de l'organisme. Un ensemble de travaux récents (*cf.* chapitre 2) pointent sur l'hétérogénéité de ces cellules. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la « plasticité » des prohémyocytes que nous postulons n'est en fait que la sélection contextuelle du développement d'une sous-population spécifique de progéniteurs lamellocytes pas encore décrite.

## b) LES PROGENITEURS D'ORIGINE EMBRYONNAIRE

Des progéniteurs ont été identifiés parmi les hémocytes circulants (*cf.* figure 7). Cette population n'exprime pas ou faiblement *hml* et est négative pour les autres marqueurs de différenciation (*pxn*, *eater* ou encore *lz*). Un gain de fonction de l'oncogène AML1-ETO ciblé aux hémocytes *hml+* induit simultanément une augmentation du nombre de progéniteurs circulants et la formation de tumeurs mélanotiques (Sinenko et al., 2010). Mais aucun lien de causalité n'a pu être établi entre ces deux phénotypes. La compétence de ces progéniteurs n'a donc pas été évaluée. Les lamellocytes pouvant se différencier à partir d'hémocytes matures, quel est « l'utilité » de cette population de prohémyocytes dans ce processus ? Ces progéniteurs peuvent-ils être se différencier directement en lamellocytes ? Sont-ils multipotents ? L'établissement du lignage de ces cellules permettrait de répondre à ces interrogations.

## 2. LES CELLULES DIFFERENCIEES : PLASTICITE

### « FONCTIONNELLE »

#### a) LES PLASMATOCYTES

En 1957, en se basant sur la morphologie cellulaire Rizki et Rizki, ont proposé que les lamellocytes dérivent des plasmatoctes circulants (Rizki, 1957). Nos travaux étayent cette hypothèse. La co-expression des marqueurs de différenciation observée (P1/NimrodC1 et L1/Atilla) indique une transformation directe des plasmatoctes en lamellocytes. La plasticité des plasmatoctes a été confirmée par d'autres études. Dans une première étude réalisée en contexte de parasitisme, Honti *et al.*; ont suivi la

dynamique de transformation des plasmacytes d'origine embryonnaire. L'observation de l'évolution de la morphologie cellulaire a été corrélée à l'expression séquentielle de différents marqueurs de lamellocytes ; L1/Atilla étant l'un des plus précoces (Honti et al., 2010). Dans une seconde étude, le changement de programme génétique de chaque type cellulaire (représenté par l'expression d'un panel de marqueurs) a été mis en évidence pendant la transformation induite par un gain de fonction du gène *charlatan* (Stofanko et al., 2010). Cette transformation peut même avoir lieu à partir de phagocytes fonctionnels. Dans un contexte de parasitisme, environ un quart des plasmacytes se différencient en lamellocytes qui forment une population hétérogène en terme de taille. Dans toutes ces conditions, les lamellocytes engendrés sont fonctionnels et participent à l'encapsulation. La plasticité des plasmacytes est tout à fait remarquable aussi bien au niveau fonctionnel que morphologique. Les mécanismes moléculaires permettant cette transformation ne sont pas encore connus.

De la même manière, les plasmacytes de la glande lymphatique présents dans la zone corticale sont aussi capables de se transformer en lamellocytes : la surexpression du gène *charlatan*, dans les hémocytes *pxn+* de cet organe induit l'expression du marqueur L1/Atilla par ces cellules (Stofanko et al., 2010). Cependant, on peut s'interroger sur l'importance physiologique de cette plasticité car, lors d'un parasitisme, la majorité de la glande lymphatique est composée de pro-hémocytes.

## b) LES CELLULES A CRISTAUX

Dans nos expériences, nous avons focalisé notre attention sur la population principale en terme numérique, les plasmacytes. Pour aucun des gènes candidats que nous avons testé, cibler leur perte de fonction dans le lignage des cellules à cristaux grâce au pilote *lzGal4* n'induit pas de tumeurs mélanotiques (AAR, données personnelles). Cependant, dans la bibliographie, un mutant de tumeur mélanotique répertorié associe la présence de capsules mélanisées et la présence de nombreuses cellules à double identité « lamellocyte/cellule à cristaux » (Sinenko et al., 2004). Les plasmacytes ne seraient pas affectés par cette mutation. Les auteurs privilégient l'hypothèse selon laquelle le gène muté, *yantar*, permet l'expansion d'une population, normalement rarement observée en circulation de cellules doublement marquées *Lz+/L1+*.

Morphologiquement, ces cellules présentent un phénotype « intermédiaire » entre les cellules à cristaux et les lamellocytes. Les cellules doublement marquées pourraient correspondre à des cellules en transition ou bien à une population distincte. Les cellules à cristaux pourraient donc elles aussi être une population plastique.

### 3. UNE RÉGULATION DÉVELOPPEMENTALE

Lors de l'hématopoïèse embryonnaire, un nombre relativement invariant des deux types d'hémocytes est produit. Même si une relative plasticité des précurseurs *Iz+* a été mise en évidence, le programme de différenciation est stéréotypé (*cf.* figure 3). Les hémocytes issus de cette vague qui vont persister dans la larve peuvent adopter un destin lamellocyte. Comme pour les pro-hémocytes de la glande lymphatique, leur « immunocompétence » est-elle régulée pendant le développement ? (*cf.* chapitre 2). Les données du mutant *ecdysone*, montrent que cette hormone est requise pour l'encapsulation des parasites (Sorrentino et al., 2002). Ces résultats suggèrent que tous les compartiments hématopoïétiques susceptibles de produire des lamellocytes sont affectés. Une « fenêtre de compétence » commune régulée pendant le développement est par conséquent concevable.

#### *Le candidat ush*

Le candidat *ush* était déjà connu pour être un gène « suppresseur de tumeur mélanotique » (Sorrentino et al., 2007). Néanmoins, son rôle cellulaire autonome dans le processus de transformation n'avait pas été démontré. Une expérience indépendante confirme notre résultat (Stofanko et al., 2010) avec des outils différents : la fonction de *Ush* est perturbée par l'expression d'un dominant négatif dans les plasmacytes grâce au pilote *pxnGal4*. Une différence notable entre ces deux expériences de lignage réside dans le moment d'induction de la perte de fonction. Les pilotes *snGal4* et *gcmGal4* que nous avons utilisés sont uniquement exprimés pendant la vie embryonnaire. Bien que la perte de fonction soit précoce, le phénotype de tumeur mélanotique ne s'observe qu'à partir du stade L3. Dans ces conditions, plus de la moitié des plasmacytes tracés sont des lamellocytes au stade L3 (observations personnelles). Cette latence suggère que le contrôle développemental de l'acquisition de l'immunocompétence n'est pas affecté par

la perte de *ush*. Même avec le pilote *hmlGal4*, qui permet de maintenir l'expression du dsRNA pendant tous les stades larvaires, nous ne sommes pas en mesure « d'avancer » la formation des tumeurs mélanotiques. Quel que soit le moment d'induction du défaut, celui d'apparition du phénotype reste constant. La différenciation des lamellocytes étant inductible, ces résultats suggèrent que *ush* puisse réguler la « réceptivité » des hémocytes aux stimuli conduisant à l'activation des plasmatoctes. Un mécanisme envisageable pour la modulation de leur plasticité est que *ush* contrôle la compaction de la chromatine. En effet, les modifications épigénétiques qui permettent de moduler la disponibilité des gènes pour la transcription sont des modifications réversibles et transmissibles aux cellules filles.

Ush appartient à la famille, conservée au cours de l'évolution, des cofacteurs FOG (Friend on GATA). Ces molécules modulent l'activité des facteurs de transcription de type GATA dont *Serpent*. *serpent* est un gène clé de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire. Il est exprimé et requis à tous les stades de développement aussi bien pour la spécification des hémocytes que leur différenciation (*cf.* chapitre 1) (et pour revue (Waltzer et al., 2010)). Cette pléiotropie de fonction est notamment rendue possible par la modulation des interactions entre ce facteur et son cofacteur Ush. Moléculairement, deux isoformes de la protéine *Serpent* sont produits, *SrpNC* et *SrpC*, dont un seul (*SrpNC*) est capable d'interagir avec Ush (Waltzer et al., 2002). De manière intéressante, la surexpression de *SrpC* dans les plasmatoctes circulants par le pilote *eaterGal4* peut induire la transformation autonome de ces cellules (ou *hmlGal4*, L.W données personnelles) (Kroeger et al., 2012). Ces résultats suggèrent que le partenaire moléculaire de Ush pour la transformation des cellules puisse être *Serpent*. Moléculairement, les gènes cibles des complexes *SrpC* et *SrpNC/Ush* impliqués dans la « répression » du destin lamellocyte restent à définir.

## B. PLASTICITÉ ET ÉVOLUTION

### 1. CHEZ LES DROSOPHILES

Les espèces du groupe *melanogaster* sont capables de produire des lamellocytes en réponse au parasitisme (Prévost and Eslin, 1998). Mais nous ne savons pas si, comme chez *D.melanogaster*, ce type d'hémocyte peut être la résultante d'une plasticité des plasmatoctes. Par ailleurs, chez les espèces du groupe *subobscura*, les hémocytes

« atypiques », évoqués en introduction (*cf.* chapitre 1), ont été récemment caractérisés chez les larves de *D. affinis* and *D. obscura*. Ils ont été baptisés « pseudopodocytes » en référence aux podocytes décrits chez *melanogaster* par Rizki *et al* ; pour avoir une morphologie intermédiaire entre les lamellocytes et les plasmacytes (Havard *et al.*, 2012). En effet, comme les lamellocytes, ils sont requis pour le processus d'encapsulation, mais ils sont plus proches structurellement des plasmacytes avec qui ils partagent également la capacité de phagocytose. Un lien de filiation peut donc être envisagé entre les plasmacytes et les pseudopodocytes. Le lignage des plasmacytes nous permettrait de comprendre si la transformation directe de ce type cellulaire est une stratégie partagée par ces différents insectes.

## 2. CHEZ LES VERTÉBRÉS

Le modèle de l'hématopoïèse des vertébrés est basé sur un continuum et non une dichotomie stricte entre les lignages (*cf.* figure 1). A toutes les étapes de l'hématopoïèse, de la plasticité est introduite. Les cellules souches hématopoïétiques ont les potentialités les plus grandes. Chez la souris, un ensemble d'étude *in vitro* et *in vivo* tend à montrer que les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ont la capacité de détecter des PAM. En cas d'infection microbienne, ces progéniteurs orientent leur différenciation vers un autre destin cellulaire : les cellules dendritiques (d'origine myéloïde) dont l'organisme a besoin pour assurer la première vague de la réponse immunitaire innée (Nagai *et al.*, 2006). Les progéniteurs des cellules T retiennent le potentiel de devenir des cellules myéloïdes (Kawamoto and Katsura, 2009). Chez l'homme, la plasticité « fonctionnelle » des macrophages et des lymphocytes a été montrée (O'Shea *et al.*, 2008) (Stout *et al.*, 2009). Par exemple, en fonction des stimuli environnementaux, les macrophages acquièrent la capacité de produire des types différents de cytokine (Stout *et al.*, 2009). Comme chez la Drosophile, la plasticité cellulaire impacte la réponse immunitaire.

Mais comment est mise en place cette plasticité ? Chez les vertébrés, grâce à de nombreux travaux réalisés principalement *in vitro*, trois modèles de développement de la plasticité des cellules sanguines ont pu être mis en évidence (Cobaleda and Busslinger, 2008). Ainsi un changement de destin peut être la résultante d'une transdifférenciation directe d'un lignage à un autre ou requiert une étape de dédifférenciation. Une dernière possibilité, est une diversion de lignage d'un précurseur

non engagé. Cette reprogrammation cellulaire est le fait de la combinatoire de facteurs externes correspondant à des stimuli, notamment immuns ou de facteurs internes tels que la modification de la balance de facteurs de transcription (Nagai et al., 2006; Cobaleda et al., 2007). Au vu de la conservation entre les processus hématopoïétiques de la Drosophile et de l'Homme, peut-on imaginer une conservation entre les mécanismes permettant la transformation directe ou la divergence de lignage (Evans et al., 2003) ? La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la plasticité des progéniteurs ou des cellules différenciées chez la Drosophile, pourraient en partie nous éclairer sur ces mécanismes chez l'Homme ; et inversement.

## II. LA COMMUNICATION SYSTÉMIQUE

Nos résultats suggèrent qu'il existe une régulation systémique qui s'instaure entre les tissus immuns comme le corps gras et les compartiments hématopoïétiques comme la glande lymphatique. Initier cette communication serait même suffisante pour générer des tumeurs mélanotiques.

### A. ENTRE LES TISSUS IMMUNS

L'étude des pertes de fonctions ciblées au corps gras positionne cet organe comme un acteur de la réponse d'encapsulation (*cf* tableau 2 article). Cette communication paracrine pourrait être assurée par des cytokines comme Spätzle et Unpaired3. Ces molécules déclenchent respectivement les voies Toll et JAK-STAT dont l'activation constitutive conduit à la formation des tumeurs mélanotiques. La communication intra-tissus immuns pourrait être assurée par une des ces voies de signalisation.

#### 1. LA VOIE TOLL

La voie Toll permet des communications à distance via Spätzle dont la maturation est extracellulaire (*cf* figure 8 ). Ce ligand peut être sécrété par les hémocytes (Paddibhatla et al., 2010). De plus, l'activation constitutive de la voie, aussi bien ubiquitaire que confinée aux hémocytes, est suffisante pour induire des tumeurs mélanotiques (Qiu et al., 1998; Zettervall et al., 2004). Par ailleurs, bien que son activation dans le corps gras soit essentiellement liée à la réponse humorale, il a été démontré qu'elle pouvait également être concomitante à la formation de tumeur mélanotique (Harari-Steinberg et al., 2007; Chiu et al., 2005) .

Nous avons donc testé l'activité de la voie de signalisation Toll lors de la formation des capsules mélanotiques. Comme rapporteur de cette voie nous utilisons le transgène

drosomycine-GFP issu de la fusion de promoteur de la *Drosomycine* et de la séquence codante de la version mutante de la *Green Fluorescent Protein* de la méduse *Aequora victoria*. L'activité du rapporteur réalisé par Ferrandon (1998) est dépendante de la voie Toll dans le corps gras ainsi que dans les hémocytes. Une induction transcriptionnelle de la GFP témoigne d'une activation de la voie de signalisation comme illustré figures 14 et 15. Dans ce contexte, la GFP est détectée dans les tissus exprimant ectopiquement une forme du récepteur constitutivement actif (ici le corps gras et les hémocytes) Toll<sup>10b</sup>. Le nombre de cellules GFP positive ainsi que l'intensité de la fluorescence sont très changeants selon les contextes génétiques. Outre l'aspect technique, cette variabilité peut être le reflet des fluctuations biologiques ou la conséquence de la non-uniformité du gain de fonction.

Nous nous sommes donc demandé si cette voie était activée par la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs mélanotiques *cct2*, *cul4*, *hyx*, *mRpS30* et *ush*. Dans un premier temps, nous avons analysé les contextes de perte de fonction ciblée aux hémocytes et au corps gras grâce au pilote *srp-Gal4*. Comme illustré figure 15 et tableau 2, la formation de tumeur mélanotiques est systématiquement associée à l'induction de l'expression de la GFP dans le corps gras. En revanche, seule la dérégulation du gène *mRpS30* conduit à une induction de la GFP dans les hémocytes circulants ce qui indique qu'il pourrait en être un régulateur négatif direct. A noter que les lamellocytes repérés par leur taille et leur morphologie étalée n'expriment jamais le gène rapporteur. L'activation de la voie Toll dans le corps gras semble être une des étapes de la formation des tumeurs mélanotiques. Les hémocytes pourraient initier cette activation en produisant Spätzle. Dans le cas de la perte de fonction pour *mRpS30*, la communication serait croisée entre les tissus immuns.

Cette activation est peut être comparable à celle observée lors de la réaction d'encapsulation physiologique. Le corps gras pourrait activer cette voie dans le but de produire des peptides antimicrobiens à titre préventif. Une autre possibilité est que le corps gras serve de relais amplificateur de signal de communication entre les compartiments hématopoïétiques circulants et résidants.

Lors de la formation de tumeur mélanotique, en cas de gène ciblée au corps gras, mime-t-on cette signalisation ? Nous avons analysé, dans ces contextes, l'activité du rapporteur d'activité de la voie Toll (figure 15 ; tableau 2). En parallèle à la génération de tumeurs mélanotiques (contextes *cul4* et *mRpS30* uniquement), nous observons une induction de

la GFP non seulement dans ce tissu mais aussi dans les hémocytes. Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation dans le corps gras puisse activer de manière systémique la voie Toll dans les hémocytes circulants.

Fait à noter, dans ces différents contextes de perte de fonction induits avec le pilote *srp-gal4*, la voie IMD, qui transmet la réponse humorale en réponse à une infection par des bactéries Gram-négative, ne semble pas être activée. L'expression du transgène Diptericine-lacZ a été utilisée comme rapporteur d'activité de cette voie (données non présentées). Ces observations sont confirmées par une analyse similaire dans un contexte différent de mutant de tumeur mélanotique (Chiu et al., 2005).

- Le modèle de l'inflammation

Les récents travaux de Paddibhatla *et al.* établissent que la voie Toll permet la communication entre le corps gras et les hémocytes circulants et résidents de la glande lymphatique lors de la réponse aux parasites (Paddibhatla et al., 2010). Cette activation aiguë, qui participe à la régulation de l'homéostasie du système hématopoïétique, est assimilée à une réaction inflammatoire. Une activation constitutive de la voie Toll ou inflammation chronique, causée par la perte de la boucle d'autorégulation négative, conduit à la formation de tumeurs mélanotiques. L'activation de la voie Toll n'a pas à être induite séquentiellement dans un tissu puis un autre pour déclencher l'activation du système immunitaire. Nos résultats de perte de fonction ciblée dans le corps gras (*cf.* ci-dessous) supportent aussi l'idée d'une régulation croisée.

### *Le candidat mRpS30*

Le cas de *mRpS30* est une perte de fonction pour laquelle une induction dans le corps gras, ou les hémocytes, est suffisante à induire la formation de tumeurs mélanotiques. Ce phénotype est associé à un corps gras intègre. Dans le cas de perte de fonction ciblée à ce tissu, c'est donc le fonctionnement de ce tissu qui serait perturbé. De plus, l'activation de la voie Toll, en simultané dans le corps gras et les hémocytes, est indépendante du territoire immunitaire ciblé pour la perte de fonction. Ces données suggèrent qu'une boucle d'auto-amplification se met en place entre les hémocytes et le corps gras. Les récents

travaux de Paddibhatla *et al*; attestent d'une telle communication (Paddibhatla et al., 2010). Une interaction bidirectionnelle entre les tissus immuns s'établit pendant la réaction d'encapsulation via l'activation extracellulaire de Spätzle. Une boucle d'auto-inhibition permet ensuite l'arrêt de la réaction. Le gène *mrpS30* est un régulateur potentiel de cette inhibition dans les deux compartiments.

L'activation constitutive de la voie Toll dans des progéniteurs de type intermédiaire de la glande lymphatique est même suffisante pour initier cette régulation croisée (Paddibhatla et al., 2010). Le pilote 76BGal4, qui a été utilisé dans leurs expériences, n'a pas été testé pour induire la perte de fonction du gène *mRpS30*. Le seul pilote spécifique de la glande lymphatique à notre disposition était TepIVGal4 qui marque une population cellulaire différente, les prohémoctes. L'utilisation de cet outil s'avérerait utile afin de comprendre si le gène *mRpS30* pourrait agir de manière contexte cellulaire dépendante ou générique sur l'inhibition de la voie Toll.

*mRpS30* code pour une protéine appartenant à la machinerie de synthèse des protéines mitochondriales. Dans un contexte de perte de fonction pour ce gène, l'homéostasie des mitochondries pourrait être affectée. Des données de transcriptome de l'épithélium de l'intestin chez l'adulte suggèrent un lien entre les protéines ribosomales mitochondriales et la modulation des gènes de la voie Toll (Davies et al., 2012). Cependant, la mécanistique permettant de lier la signalisation de la voie Toll et le métabolisme des mitochondries reste à découvrir.

## 2. LA VOIE JAK-STAT

Cette voie de signalisation est utilisée lors de la réponse aux tissus endommagés pour la communication entre le corps gras et les hémocytes (*cf* réponse aux tissus endommagés). Les données expérimentales suggèrent que l'activation de la voie dans un tissu immunitaire est suffisante pour induire la formation de tumeurs mélanotiques (Zettervall et al., 2004; Jacques et al., 2009). De plus, les expériences de clones gain de fonction pour la kinase Hop montrent que, dans la glande lymphatique du moins, l'effet sur la différenciation des lamellocytes est non cellulaire autonome (Minakhina et al., 2011). De plus, l'activation constitutive de la voie JAK-STAT (contexte *hop<sup>tum</sup>*) n'induit pas l'activation de la voie Toll dans le corps gras (Chiu et al., 2005). Une relation

épistatique lie les acteurs de ces deux voies : *Toll* étant en amont de *hop* (Remillieux-Leschelle et al., 2002). Il serait par conséquent judicieux d'analyser l'activité de cette voie dans nos contextes de perte de fonctions ciblées afin d'en déceler d'éventuels régulateurs.

## B. LES COMPARTIMENTS HÉMATOPOÏÉTIQUES

### 1. LA COMMUNICATION DU CIRCULANT VERS LE RESIDENT

Nous avons postulé que les hémocytes étaient les émetteurs du signal instructeur à l'origine de la différenciation des lamellocytes. Celle-ci pouvant avoir lieu à partir des précurseurs de la glande lymphatique ou des hémocytes présents dans les sessiles, cela impliquerait que cette communication affecte les deux compartiments. Par manque d'outil adéquat, nous n'avons pas été en mesure d'étudier spécifiquement le compartiment circulant. L'utilisation du pilote croquemort-Gal4, ciblant les cellules d'origine embryonnaire, permettrait de disséquer les signaux entre les cellules selon leur origine développementale (Honti et al., 2010).

### 2. LE PSC : CENTRE COORDINATEUR

Le PSC étant un « centre de signalisation » contrôlant l'homéostasie de la glande lymphatique, nous avons voulu savoir si interférer avec son activité était suffisant pour induire des tumeurs mélanotiques.

Nous avons réalisé une perte de fonction des 5 gènes (*cct2*, *cul4*, *hyx*, *mRpS30* et *ush*) dans le PSC de la glande lymphatique (cf. tableau 1). Nous avons donc utilisé le pilote Pcol85Gal4 (Crozatier, 2002) dont l'expression s'active au stade L1, où il est spécifique du PSC. Durant les stades suivants, l'expression est maintenue dans le PSC et s'étend à certaines cellules des lobes secondaires. Nous avons analysé, en plus de l'index de tumeurs mélanotiques, la glande lymphatique. La présence de lamellocytes et de l'intégrité du PSC (présence et taille) a été évaluée (données personnelles). Les cellules du PSC ont été révélées soit directement, en utilisant le marqueur Collier, soit en détectant le gène rapporteur GFP, sous le contrôle du pilote PCol85-Gal4. Aucun phénotype n'a été décelé dans le contexte *mRpS30*. La dérégulation des gènes suivants *cct2*, *cul4*, et *hyx* est clairement associée à la formation de tumeurs mélanotiques qui

concorde avec la dissociation de l'organe hématopoïétique. Des organes au PSC intact ont pu être disséqués dans les larves ne présentant pas de tumeurs mélanotiques. La perte de fonction du gène *ush* présente un phénotype de formation de tumeurs à la limite du seuil positif. De façon intéressante, bien que le PSC semble toujours sauvage, certaines des glandes lymphatiques prélevées contiennent un nombre anormalement élevé de lamellocytes. Ce dernier phénotype pourrait être relié à l'apparition sporadique de tumeurs mélanotiques dans les cavités abdominales des larves. Ces expériences doivent être confirmées avec un pilote plus restrictif tel que *Serrate-Gal4* ou *Antp-Gal4* (Jung et al., 2005; Mandal et al., 2007) .

Ces résultats, et le phénotype d'immunodéficiences du mutant du gène *collier*, nous amène à proposer que le PSC orchestre la différenciation des lamellocytes dans tous les territoires hématopoïétiques. De récents travaux ont établi ce rôle instructeur du PSC (Sinenko et al., 2012; Tokusumi et al., 2012) . En contexte de parasitisme, une élévation du niveau de ROS s'opère dans le PSC ce qui déclenche l'émission d'un signal instructeur (Sinenko et al., 2012). Les auteurs proposent que la transformation des plasmacytes d'origine embryonnaire soit dépendante de la voie EGFR qui est activée par son ligand Spitz, émis par le PSC. La nature de la communication au sein de la glande lymphatique reste cependant à déterminer. L'information relayée par le PSC serait transmise à l'ensemble de l'organe. En effet, la perte de fonction ciblée au PSC du gène *ND75* conduit à une augmentation modérée du nombre de lamellocytes dans les lobes primaires et secondaires (Sinenko et al., 2012). Les filopodes, qui ne permettent qu'une communication unidirectionnelle, ne semblent pas impliqués dans ce processus. Aucune corrélation n'apparaît entre leur présence ou absence et la formation de ce type cellulaire (Tokusumi et al., 2012).

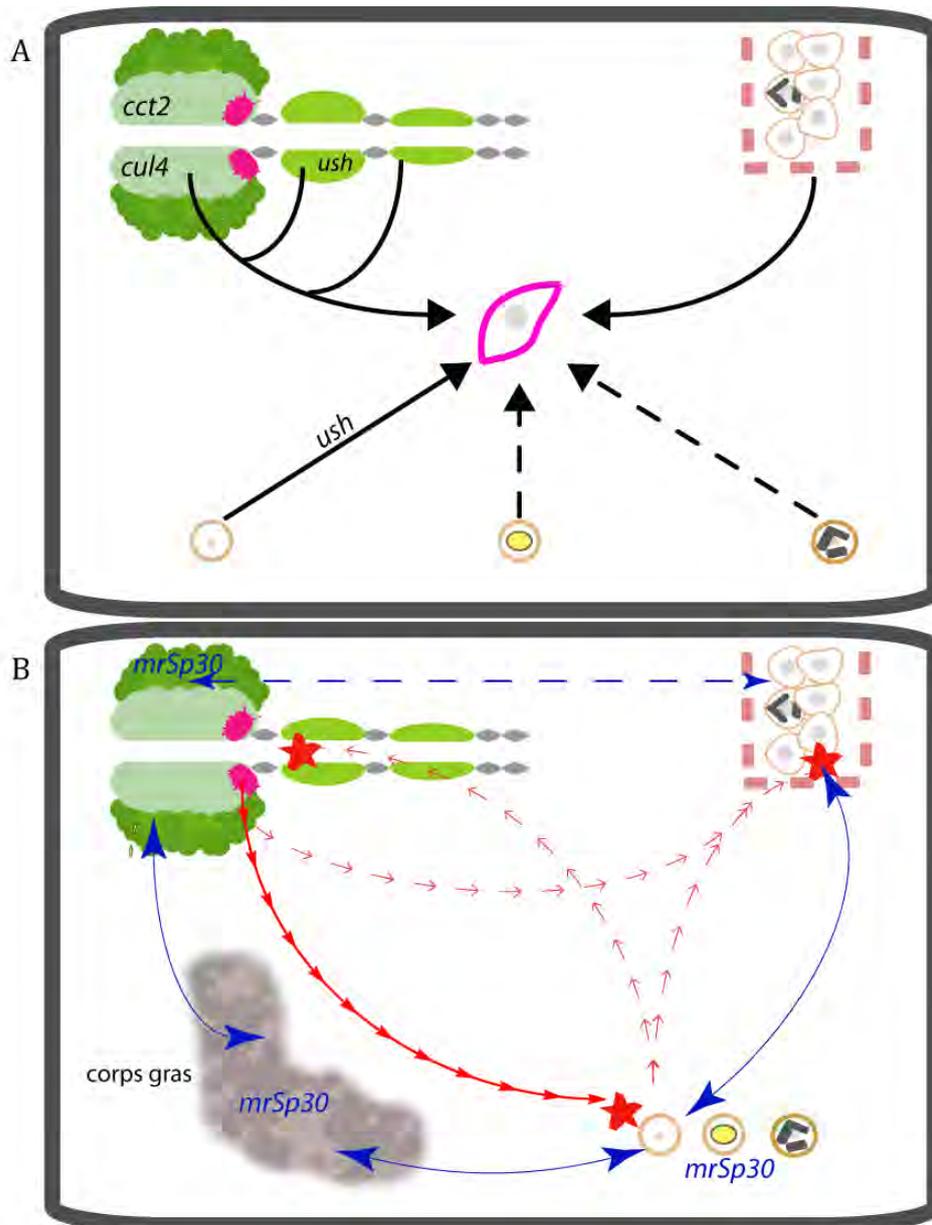
### III. L'HISTORIQUE DES TUMEURS MÉLANOTIQUES

#### A. CHAPITRE « 2012 »

Nos travaux ont montré que les contrôles de la réaction immunitaire de formation de tumeurs mélanotiques sont localisés dans des tissus de type immun. La formation de ces agrégats est associée à une modification drastique de l'homéostasie des hémocytes avec la formation d'un type cellulaire particulier, les lamellocytes, et la mobilisation de tous les compartiments hématopoïétiques (*cf* figure 13). Cette réaction immunitaire implique des réseaux de communications entre les différents tissus immuns et les compartiments hématopoïétiques. Cette activation globale du système immunitaire est, depuis peu, considérée comme une réaction inflammatoire (*cf* figure 13). La réaction d'encapsulation qui à lieu est assimilée à des réactions de défense des vertébrés, le granulome ou la thrombose, impliquant toutes deux une inflammation des tissus (*cf* introduction, chapitre 2).

Ici, déclencher une modification de l'homéostasie des tissus immuns est suffisant à l'activation du système immunitaire. Cependant, cette modification, qui peut être localisée, doit être suffisante pour induire une activation générale du système immunitaire. En effet, nos résultats suggèrent que les deux composantes de la réaction, communication (*cf* tableau 2) et différenciation des lamellocytes, sont toujours à l'œuvre. Par ailleurs, la nature de cette modification est variable selon les contextes répertoriés. Le déclenchement intempestif du système immunitaire est causé par la perte des régulateurs directs du programme hématopoïétique ou de la communication systémique. Une des étapes de la réponse d'encapsulation de parasites serait reproduite mimant un stress « immunitaire » (*i.e.* la présence de non soi). De plus, nos résultats et la bibliographie récente suggèrent que la récapitulation des étapes d'encapsulation (ou d'une partie d'entre elles) peut être causé par un stress interne. La dérégulation de l'homéostasie des tissus immuns pourrait aussi être induite par un stress de type

**FIGURE 13 : HEMATOPOÏÈSE ET COMMUNICATION LORS DE LA FORMATION DES CAPSULES MELANOTIQUES**



Représentation schématique d'une larve (rectangle noir). La glande lymphatique, les îlots sessiles (rectangle pointillé rouge), les cellules circulantes (en orange) et le corps gras (pour figure B) sont représentés. P, plasmatocyte ; Ccx, cellules à cristaux ; Pro, progéniteur.

**A.** Les origines multiples des lamellocytes. Les cellules pouvant se différencier en lamellocytes les flèches Les flèches représentent les relations de lignages établies : les pleines sont établies et les pointillées sont supposées. **B.** La communication systémique. La voie Toll est représentée par des flèches bleues. Les territoires impliqués dans cette communication sont pointés. Les flèches rouges représentent les signaux de nature différente directement impliqués dans la modification du programme hématopoïétique représenté par une étoile rouge. En pointillé sont représenter les *communications hypothétiques*.

Les gènes candidats potentiellement impliqués dans l'hématopoïèse ou la communication sont annotés dans leur territoire d'activité.

« métabolique » ou « oxydatif ». L'étude des candidats impliqués dans le métabolisme des mitochondries et des protéines, dont la fonction ne laissait pas présager de leur implication dans l'immunité, offrent des perspectives intéressantes qui sont discutées ci-après.

## B. PERSPECTIVES

Parmi les gènes candidats sont présents des gènes contrôlant l'homéostasie des fonctions « basiques » comme le métabolisme des mitochondries ou celui des protéines. De manière assez inattendue, la dérégulation de ces fonctions aux seuls tissus immuns ou à un compartiment hématopoïétique est suffisante pour une réponse immunitaire impliquant tous les tissus immuns et nécessitant la mobilisation de tous les compartiments hématopoïétiques. Comment ses fonctions interfèrent elles avec l'homéostasie du système immunitaire au point d'induire une réaction ?

Si l'homéostasie est considérée comme l'état d'un système en fonctionnement dans une situation de déperdition minimale d'énergie, un lien avec le métabolisme énergétique peut être envisagé. Le lien intime qui se tisse entre l'homéostasie du système immunitaire et le métabolisme fait l'objet d'intenses investigations. Le déclenchement de la réponse immunitaire nécessitant une dépense d'énergie accrue, il requiert un détournement ponctuel du métabolisme à son profit (DiAngelo et al., 2009). Par ailleurs, dans la glande lymphatique, le déclenchement de la réponse immunitaire est associé à une répression des gènes du métabolisme général (Jin et al., 2009). De plus, de récents travaux établissent un lien entre l'homéostasie de la glande lymphatique et les voies TOR et Insuline (*cf* chapitre 2). Les acteurs de ces voies permettent d'orchestrer la croissance et la différenciation (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012). Par ailleurs, un parallèle avec les vertébrés a été établi pour une induction métabolique de l'inflammation en manipulant les conditions de nutrition ou les voies de signalisation impliquées dans la détection des nutriments (sucre et acides aminés). La perte de fonction d'un des modulateurs de la voie Insuline induit même la formation de lamellocytes (Benmimoun et al., 2012).

Dans des conditions métaboliques « non optimale », le système favoriserait, par anticipation, la modification de l'homéostasie du système immunitaire, afin que le coût énergétique d'une réaction immunitaire soit moindre pour l'organisme entier. Par ailleurs, ces conditions sont elles mêmes perçues comme stressante pour l'organisme comme en témoigne l'activation d'une inflammation. Une dérégulation de l'homéostasie du système immunitaire pourrait donc être considérée comme dangereuse, à terme, pour l'organisme et causer ainsi son activation. Dans une revue récente, Wang et al proposent que les mécanismes moléculaires permettant de sentir le statut métabolique soient des points de contrôle permettant sa régulation et la connexion à d'autres voies régulant la prolifération, le choix de destin ou encore les fonctions des cellules immunitaires (Wang and Green, 2012).

Au vu des relations entre métabolisme et immunité, un stress « métabolique » pourrait donc être suffisant pour induire la formation de tumeurs mélanotiques. La modification de l'activité mitochondriale ou de l'homéostasie des protéines entreraient dans ce cadre.

- Les ROS, des métabolites de la réactivité ?

Les mitochondries sont considérées comme des « powerhouse » du fait de leur production d'énergie disponible pour la cellule. Cette activité génère des ROS dont la fonction dans l'homéostasie de l'hématopoïèse a récemment été mise en évidence. L'accumulation de ces métabolites au cours du développement des prohémoctes, permet leur maturation. Un effet dose de ces métabolites est observée dans les progéniteurs dans lesquels une forte induction permet « d'accélérer » la différenciation et d'orienter le choix de destin lamellocyte. Ce niveau de ROS est contrôlé par le candidat *ND75*. De plus, pendant la réponse à l'infection, une élévation importante du niveau de ROS, cette fois au niveau du PSC, conduit à l'induction du programme de différenciation lamellocytes de manière non autonome. Ce métabolite semble jouer un rôle développementale qui est mis à profit en cas de danger. La modulation de son niveau permet une réactivité du système immunitaire. Ce métabolite pourrait être apparenté, à une certaine dose, comme un « signal de danger ».

# ***-CONCLUSION-***



L'étude de tumeurs mélanotiques initiée pendant ce travail de thèse est un premier pas vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire. Nous avons pu montrer que le déclenchement de la formation de ces tumeurs pouvait être lié à un défaut d'homéostasie des tissus immuns. Par ailleurs, nous avons révélé un degré de complexité supérieur dans les facettes cellulaire et humorale de la réponse d'encapsulation. Les lamellocytes, qui sont des composants constitutifs des tumeurs mélanotiques, ont une double origine développementale. L'étonnante plasticité des plasmacytes d'origine embryonnaire a été soulignée dans notre étude. Cette plasticité est soumise à une régulation à distance. En effet, notre approche de perte de fonction ciblée s'est avérée utile pour mettre en évidence des réseaux de communication. La communication systémique occupe une place importante lors de la formation de capsules mélanotiques. Le recrutement de tous les compartiments hématopoïétiques est coordonné. De plus, nous suggérons que tous les tissus immuns (hémocytes et corps gras compris) s'alertent mutuellement. Lors du crible, nous n'avons analysé que dix pour cent des gènes du génome mais nous avons pu dégager cinquante-six candidats. Nous espérons que leur étude éclairera les mécanismes contrôlant l'homéostasie des cellules hématopoïétiques et de la réponse immunitaire chez la *Drosophile* et, du fait de leur conservation, chez l'Homme.



# *-BIBLIOGRAPHIE-*

Agaisse, H., and Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 198, 72-82.

Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., and Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5, 441-450.

Aggarwal, K., and Silverman, N. (2008). Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Rep* 41, 267-277.

Alfonso, T.B., and Jones, B.W. (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* 248, 369-383

Avet-Rochex, A., Boyer, K., Polesello, C., Gobert, V., Osman, D., Roch, F., Augé, B., Zanet, J., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2010). An *in vivo* RNA interference screen identifies gene networks controlling *Drosophila melanogaster* blood cell homeostasis. *BMC Dev Biol* 10, 65.

Babcock, D.T., Brock, A.R., Fish, G.S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M.A., and Galko, M.J. (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10017-022.

Bacon, N.C., Wappner, P., O'Rourke, J.F., Bartlett, S.M., Shilo, B., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1998). Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 811-16.

Bataillé, L., Augé, B., Ferjoux, G., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 132, 4635-644.

Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L., and Haenlin, M. (2012). Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development* 139, 1713-17.

Bergeret, E., Perrin, J., Williams, M., Grunwald, D., Engel, E., Thevenon, D., Taillebourg, E., Bruckert, F., Cosson, P., and Fauvarque, M.-O. (2008). TM9SF4 is required for *Drosophila* cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *J Cell Sci* 121, 3325-334.

Bidla, G., Dushay, M.S., and Theopold, U. (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci* 120, 1209-215.

Bras, S., Martin-Lannerée, S., Gobert, V., Augé, B., Breig, O., Sanial, M., Yamaguchi, M., Haenlin, M., Plessis, A., and Waltzer, L. (2012). Myeloid leukemia factor is a conserved regulator of RUNX transcription factor activity involved in hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4986-991.

Braun, A., Lemaitre, B., Lanot, R., Zachary, D., and Meister, M. (1997). *Drosophila* immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap. *Genetics* 147, 623-634.

Brennan, C.A., Delaney, J.R., Schneider, D.S., and Anderson, K.V. (2007). Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr Biol* 17, 67-72.

Brown, S., Hu, N., and Hombría, J.C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* 11, 1700-05.

Brückner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C.M., Rørth, P., and Perrimon, N. (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev Cell* 7, 73-84.

Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., and Skaer, H. (2010). Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 19, 296-306.

Carton, Y., and David, J.R. (1985). Relation between the genetic variability of digging behavior of *Drosophila* larvae and their susceptibility to a parasitic wasp. *Behav Genet* 15, 143-154.

Cerenius, L., Kawabata, S.-I., Lee, B.L., Nonaka, M., and Söderhäll, K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Dev Biol* 35, 575 - 583.

Charroux, B., and Royet, J. (2009). Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9797-9802.

Charroux, B., Rival, T., Narbonne-Reveau, K., and Royet, J. (2009). Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect* 11, 631-36.

Chiu, H., Ring, B.C., Sorrentino, R.P., Kalamarz, M., Garza, D., and Govind, S. (2005). dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev Biol* 288, 60-72.

Cho, N.K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., and Krasnow, M.A. (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* 108, 865-876.

Cobaleda, C., and Busslinger, M. (2008). Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20, 139-148.

Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449, 473-77.

Cordero, J.B., Macagno, J.P., Stefanatos, R.K., Strathdee, K.E., Cagan, R.L., and Vidal, M. (2010). Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell* 18, 999-1011.

Corwin, H.O., and Hanratty, W.P. (1976). Characterization of a unique lethal tumorous mutation in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* 144, 345-47.

Crozatier, M., Ubeda, J.-M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biol* 2, E196.

Daish, T.J., Mills, K., and Kumar, S. (2004). *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* 7, 909-915.

Davidson, C.J., Tirouvanziam, R., Herzenberg, L.A., and Lipsick, J.S. (2005). Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements *Drosophila* Myb in hemocytes. *Genetics* 169, 215-229.

Davies, S.-A., Overend, G., Sebastian, S., Cundall, M., Cabrero, P., Dow, J.A.T., and Terhzaz, S. (2012). Immune and stress response 'cross-talk' in the *Drosophila* Malpighian tubule. *J Insect Physiol* 58, 488-497.

Dearolf, C.R. (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* 1377, M13-M23.

Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., and Leulier, F. (2009). Genetic Ablation of *Drosophila* Phagocytes Reveals Their Contribution to Both Development and Resistance to Bacterial Infection. *J Innate Immun* 1, 322-334.

De Gregorio, E., Han, S.-J., Lee, W.-J., Baek, M.-J., Osaki, T., Kawabata, S.-I., Lee, B.-L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., and Brey, P.T. (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 581-592.

DiAngelo, J.R., Bland, M.L., Bambina, S., Cherry, S., and Birnbaum, M.J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20853-58.

Dimarcq, J.L., Imler, J.L., Lanot, R., Ezekowitz, R.A., Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., and Lagueux, M. (1997). Treatment of *l(2)mbn* *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem Mol Biol* 27, 877-886.

Dolezal, T., Dolezelova, E., Zurovec, M., and Bryant, P.J. (2005). A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol* 3, e201.

Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2012). Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of *Drosophila* blood progenitors. *Development*

Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr Biol* 12, 1923-27.

Eslin, P., and Doury, G. (2006). The fly *Drosophila subobscura*: a natural case of innate immunity deficiency. *Dev Comp Immunol* 30, 977-983.

Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 5, 673-690.

Fauvarque, M.-O., and Williams, M.J. (2011). *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci* 124, 1373-382.

Flaherty, M.S., Salis, P., Evans, C.J., Ekas, L.A., Marouf, A., Zavadil, J., Banerjee, U., and Bach, E.A. (2010). *chinmo* is a functional effector of the JAK/STAT pathway that regulates eye development, tumor formation, and stem cell self-renewal in *Drosophila*. *Dev Cell* 18, 556-568.

Fogerty, F.J., Fessler, L.I., Bunch, T.A., Yaron, Y., Parker, C.G., Nelson, R.E., Brower, D.L., Gullberg, D., and Fessler, J.H. (1994). Tigrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* 120, 1747-758.

Foley, E., and O'Farrell, P.H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* 17, 115-125.

Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4, 431-443.

Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284, 1991-94.

Frandsen, J.L., Gunn, B., Muratoglu, S., Fossett, N., and Newfeld, S.J. (2008). Salmonella pathogenesis reveals that BMP signaling regulates blood cell homeostasis and immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14952-57.

Gao, H., Wu, X., and Fossett, N. (2009). Upregulation of the *Drosophila* Friend of GATA gene *U-shaped* by JAK/STAT signaling maintains lymph gland prohemocyte potency. *Mol Cell Biol* 29, 6086-096.

Gao, H., Wu, X., and Fossett, N. (2011). *Odd-skipped* maintains prohemocyte potency and blocks blood cell development in *Drosophila*. *Genesis* 49, 105-116.

Garen, A., Kauvar, L., and Lepesant, J.A. (1977). Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5099-5103.

Gateff, E. (1977). Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann Parasitol Hum Comp* 52, 81-83.

Gateff, E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 200, 1448-459.

Gateff, E., and Mechler, B.M. (1989). Tumor-suppressor genes of *Drosophila melanogaster*. *Crit Rev Oncog* 1, 221-245.

Gobert, V., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2012). Myeloid Leukemia Factor: A return ticket from human leukemia to fly hematopoiesis. *Transcription* 3, 250-54.

Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.-M., Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* 127, 1425-437.

Grigorian, M., Mandal, L., and Hartenstein, V. (2011). Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev Genes Evol* 221, 121-131.

Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R. (1993). The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* 238, 33-37.

Hanratty, W.P., and Ryerse, J.S. (1981). A genetic melanotic neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 83, 238-249.

Harari-Steinberg, O., Cantera, R., Denti, S., Bianchi, E., Oron, E., Segal, D., and Chamovitz, D.A. (2007). COP9 signalosome subunit 5 (*CSN5/Jab1*) regulates the development of the *Drosophila* immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis. *Genes Cells* 12, 183-195.

Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (*JAK*) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 14, 2857-865.

Harrison, D.A., McCoon, P.E., Binari, R., Gilman, M., and Perrimon, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the *JAK* signaling pathway. *Genes Dev* 12, 3252-263.

Havard, S., Doury, G., Ravallec, M., Brehélin, M., Prévost, G., and Eslin, P. (2012). Structural and functional characterization of pseudopodocyte, a shaggy immune cell produced by two *Drosophila* species of the *obscura* group. *Dev Comp Immunol* 36, 323-331.

Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130, 4955-962.

Hombría, J.C.-G., Brown, S., Häder, S., and Zeidler, M.P. (2005). Characterisation of *Upd2*, a *Drosophila* *JAK/STAT* pathway ligand. *Dev Biol* 288, 420-433.

Honti, V., Csordás, G., Márkus, R., Kurucz, E., Jankovics, F., and Andó, I. (2010). Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol* 47, 1997-2004.

Howell, L., Sampson, C.J., Xavier, M.J., Bolukbasi, E., Heck, M.M.S., and Williams, M.J. (2012). A directed miniscreen for genes involved in the *Drosophila* anti-parasitoid immune response. *Immunogenetics* 64, 155-161.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15119-124.

Irving, P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7, 335-350.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12, 446-451.

Jacques, C., Soustelle, L., Nagy, I., Diebold, C., and Giangrande, A. (2009). A novel role of the glial fate determinant glial cells missing in hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 53, 1013-022.

Jin, L.H., Choi, J.K., Kim, B., Cho, H.S., Kim, J., Kim-Ha, J., and Kim, Y.-J. (2009). Requirement of Split ends for epigenetic regulation of Notch signal-dependent genes during infection-induced hemocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 29, 1515-525.

Jung, S.-H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132, 2521-533.

Kalamarz, M.E., Paddibhatla, I., Nadar, C., and Govind, S. (2012). Sumoylation is tumor-suppressive and confers proliferative quiescence to hematopoietic progenitors in *Drosophila melanogaster* larvae. *Biology Open* 1, 161-172

Kammerer, M., and Giangrande, A. (2001). *Glide2*, a second glial promoting factor in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 20, 4664-673.

Kawamoto, H., and Katsura, Y. (2009). A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* 30, 193-200.

Kelsey, E.M., Luo, X., Brückner, K., and Jasper, H. (2012). *Schnurri* regulates hemocyte function to promote tissue recovery after DNA damage. *J Cell Sci* 125, 1393-1400.

Kemp, C., and Imler, J.-L. (2009). Antiviral immunity in *drosophila*. *Curr Opin Immunol* 21, 3-9.

Kleinhesselink, K., Conway, C., Sholer, D., Huang, I., and Kimbrell, D.A. (2011). Regulation of hemocytes in *Drosophila* requires *dappled cytochrome b5*. *Biochem Genet* 49, 329-351.

Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klöckner, T., Kaufer-Stillger, G., Dreschers, S., Edström, J.-E., and Gateff, E. (1994). Cloning, Structure, Cellular Localization, and Possible Function of the Tumor Suppressor Gene *lethal(3)malignant blood neoplasm-1* of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 163, 98 - 111.

Kroeger, P.T., Tokusumi, T., and Schulz, R.A. (2012). Transcriptional regulation of *eater* gene expression in *Drosophila* blood cells. *Genesis* 50, 41-49.

Krzemien, J. (2009). Control of larval hematopoiesis in *Drosophila*; microenvironment, precursors and cell lineage

Krzemien, J., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *Int J Dev Biol* 54, 1117-125.

Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* 346, 310-19.

Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., and Crozatier, M. (2007). Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446, 325-28.

Kulkarni, V., Khadilkar, R.J., Magadi, S.S., Srivathsa, M.S., and Inamdar, M.S. (2011). Asrij maintains the stem cell niche and controls differentiation during *Drosophila* lymph gland hematopoiesis. *PLoS One* 6, e27667.

Kuraishi, T., Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., et al. (2009). Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO J* 28, 3868-878.

Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., et al. (2007). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol* 17, 649-654.

Kurucz, E., Vácz, B., Márkus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsámboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., and Andó, I. (2007). Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol Hung* 58 Suppl, 95-111.

Kurucz, E., Zettervall, C.-J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Ando, I., and Hultmark, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2622-27.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230, 243-257.

Lavine, M.D., and Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1295-1309.

Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-49.

Lebestky, T., Jung, S.-H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev* 17, 348-353.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 14, 536-545.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.-M. (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* 297, 114-16.

Lindsley, D.L., Grell, E.H., and Bridges, C.B. (1967). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. *Genetic variations of Drosophila melanogaster*

Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., and Brückner, K. (2011). The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development* 138, 5379-391.

Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J.-M., Braun, A., Daburon, V., Krzemień, J., Bourbon, H.-M., Zhou, R., et al. (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol* 8, e1000441.

Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* 279, 48466-476.

Mandal, L., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* 36, 1019-023.

Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 446, 320-24.

Markovic, M.P., Kylsten, P., and Dushay, M.S. (2009). *Drosophila* lamin mutations cause melanotic mass formation and lamellocyte differentiation. *Mol Immunol* 46, 3245-250.

Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K.A., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 21, 3044-060.

Matova, N., and Anderson, K.V. (2006). *Rel/NF-kappaB* double mutants reveal that cellular immunity is central to *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16424-29.

Matova, N., and Anderson, K.V. (2010). *Drosophila Rel* proteins are central regulators of a robust, multi-organ immune network. *J Cell Sci* 123, 627-633.

Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10, 399-415.

Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., and Andó, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4805-09.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.

Meister, M., and Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5, 573-580.

Meister, M., and Richards, G. (1996). Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterin gene in *Drosophila* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 26, 155-160.

Minakhina, S., and Steward, R. (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* 174, 253-263.

Minakhina, S., and Steward, R. (2010). Hematopoietic stem cells in *Drosophila*. *Development* 137, 27-31.

Minakhina, S., Druzhinina, M., and Steward, R. (2007). *Zfrp8*, the *Drosophila* ortholog of *PDCD2*, functions in lymph gland development and controls cell proliferation. *Development* 134, 2387-396.

Minakhina, S., Tan, W., and Steward, R. (2011). *JAK/STAT* and the *GATA* factor *Pannier* control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*. *Dev Biol* 352, 308-316.

Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147, 1589-1600.

Mortimer, N.T., Kacsóh, B.Z., Keebaugh, E.S., and Schlenke, T.A. (2012). *Mgat1*-dependent N-glycosylation of Membrane Components Primes *Drosophila melanogaster* Blood Cells for the Cellular Encapsulation Response. *PLoS Pathog* 8, e1002819.

Mukherjee, T., Kim, W.S., Mandal, L., and Banerjee, U. (2011). Interaction between Notch and Hif- $\alpha$  in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* 332, 1210-13.

Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., and Kincade, P.W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24, 801-812.

Nappi, A., Poirié, M., and Carton, Y. (2009). The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv Parasitol* 70, 99-121.

Nappi, A.J. (1975). Inhibition by parasites of melanotic tumour formation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 255, 402-04.

Narita, R., Yamashita, H., Goto, A., Imai, H., Ichihara, S., Mori, H., and Kitagawa, Y. (2004). Syndecan-dependent binding of *Drosophila* hemocytes to laminin alpha3/5 chain LG4-5 modules: potential role in sessile hemocyte islets formation. *FEBS Lett* 576, 127-132.

O'Shea, J.J., Hunter, C.A., and Germain, R.N. (2008). T cell heterogeneity: firmly fixed, predominantly plastic or merely malleable? *Nat Immunol* 9, 450-53.

Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G., and Fessler, J.H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* 13, 3438-447.

Novakova, M., and Dolezal, T. (2011). Expression of *Drosophila* adenosine deaminase in immune cells during inflammatory response. *PLoS One* 6, e17741.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* 165, 716-726

OFTEDAL, P. (1953). [The histogenesis of a new tumor in *Drosophila melanogaster*, and a comparison with tumors of five other stocks]. *Z Indukt Abstamm Vererbungsl* 85, 408-422.

Olofsson, B., and Page, D.T. (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* 279, 233-243.

Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.

Paddibhatla, I., Lee, M.J., Kalamarz, M.E., Ferrarese, R., and Govind, S. (2010). Role for sumoylation in systemic inflammation and immune homeostasis in *Drosophila* larvae. *PLoS Pathog* 6, e1001234.

Paladi, M., and Tepass, U. (2004). Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J Cell Sci* 117, 6313-326.

Pastor-Pareja, J.C., Wu, M., and Xu, T. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 1, 144-54; discussion 153.

Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., and Crozatier, M. (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3389-394.

Prévost, G., and Eslin, P. (1998). Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J Insect Physiol* 44, 807-816.

Qiu, P., Pan, P.C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125, 1909-920.

Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M., and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 122, 4023-031.

- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P., and Randsholt, N.B. (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics* 162, 1259-274.
- RIZKI, M.T. (1960). Melanotic tumor formation in *Drosophila*. *J Morphol* 106, 147-157.
- RIZKI, M.T., and RIZKI, R.M. (1959). Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J Biophys Biochem Cytol* 5, 235-240.
- Rizki, M.T.M. (1957). Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 100, 437-458.
- Rizki, R.M., and Rizki, T.M. (1980). Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Dev Genes Evol* 189, 207-213.
- Rizki, T.M., and Rizki, R.M. (1983). Blood cell surface changes in *Drosophila* mutants with melanotic tumors. *Science* 220, 73-75.
- Rizki, T.M., and Rizki, R.M. (1994). Parasitoid-induced cellular immune deficiency in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci* 712, 178-194.
- Roman, G., He, J., and Davis, R.L. (2000). *kurtz*, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in *Drosophila*. *Genetics* 155, 1281-295.
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Dev Genes Evol* 203, 266-280.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., and Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 ( Pt 1), 135-142.
- Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 168, 1542-46.
- Sampson, C.J., Valanne, S., Fauvarque, M.-O., Hultmark, D., Rämét, M., and Williams, M.J. (2012). The RhoGEF Zizimin-related acts in the *Drosophila* cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Dev Comp Immunol* 38, 160-68.
- SCHARRER, B., and LOCHHEAD, M.S. (1950). Tumors in the invertebrates: a review. *Cancer Res* 10, 403-419.
- Sears, H.C., Kennedy, C.J., and Garrity, P.A. (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* 130, 3557-565.
- Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V., and Paululat, A. (2006). Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr Patterns* 6, 360-375.
- Senger, K., Harris, K., and Levine, M. (2006). GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15957-962.
- Seong, S.-Y., and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4, 469-478.
- Shim, J., Mukherjee, T., and Banerjee, U. (2012). Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 14, 394-400.

Sinenko, S.A., Hung, T., Moroz, T., Tran, Q.-M., Sidhu, S., Cheney, M.D., Speck, N.A., and Banerjee, U. (2010). Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a *Drosophila* model. *Blood* 116, 4612-620.

Sinenko, S.A., Kim, E.K., Wynn, R., Manfrulli, P., Ando, I., Wharton, K.A., Perrimon, N., and Mathey-Prevot, B. (2004). Yantar, a conserved arginine-rich protein is involved in *Drosophila* hemocyte development. *Dev Biol* 273, 48-62.

Sinenko, S.A., Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2009). Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell* 16, 756-763.

Sinenko, S.A., Shim, J., and Banerjee, U. (2012). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep* 13, 83-89.

Sorrentino, R.P., Carton, Y., and Govind, S. (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* 243, 65-80.

Sorrentino, R.P., Tokusumi, T., and Schulz, R.A. (2007). The Friend of GATA protein U-shaped functions as a hematopoietic tumor suppressor in *Drosophila*. *Dev Biol* 311, 311-323.

Stofanko, M., Kwon, S.Y., and Badenhorst, P. (2008). A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics* 180, 253-267.

Stofanko, M., Kwon, S.Y., and Badenhorst, P. (2010). Lineage tracing of lamellocytes demonstrates *Drosophila* macrophage plasticity. *PLoS One* 5, e14051.

Stout, R.D., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2009). Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol* 86, 1105-09.

Sturtevant, A.H., and Dobzhansky, T. (1936). Geographical Distribution and Cytology of "Sex Ratio" in *Drosophila Pseudoobscura* and Related Species. *Genetics* 21, 473-490.

Tan, K.L., Goh, S.C., and Minakhina, S. (2012). Genetic screen for regulators of lymph gland homeostasis and hemocyte maturation in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* 2, 393-405.

Tao, Y., Wang, J., Tokusumi, T., Gajewski, K., and Schulz, R.A. (2007). Requirement of the LIM homeodomain transcription factor tailup for normal heart and hematopoietic organ formation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 27, 3962-69.

Tennessen, J.M., and Thummel, C.S. (2011). Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Curr Biol* 21, R750-57.

Tokusumi, T., Sorrentino, R.P., Russell, M., Ferrarese, R., Govind, S., and Schulz, R.A. (2009). Characterization of a lamellocyte transcriptional enhancer located within the misshapen gene of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 4, e6429.

Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., Shoue, D.A., Corona, L., and Schulz, R.A. (2011). Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during *Drosophila* hematopoiesis. *Development* 138, 3879-884.

Tokusumi, Y., Bergmann, A., Tokusumi, T., Shoue, D.A., and Schulz, R.A. (2012). Gene Regulatory Networks Controlling Hematopoietic Progenitor Niche Cell Production and Differentiation in the *Drosophila* Lymph Gland. *PLoS One* 7, e41604.

Tokusumi, Y., Tokusumi, T., Stoller-Conrad, J., and Schulz, R.A. (2010). *Serpent, suppressor of hairless and U-shaped are crucial regulators of hedgehog niche expression and prohemocyte maintenance during Drosophila larval hematopoiesis. Development 137, 3561-68.*

Török, T., Tick, G., Alvarado, M., and Kiss, I. (1993). *P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of Drosophila melanogaster: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. Genetics 135, 71-80.*

Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B. (2002). *How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol 5, 102-110.*

Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). *Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. Nat Cell Biol 5, 914-920.*

Vilmos, P., Nagy, I., Kurucz, E., Hultmark, D., Gateff, E., and Andó, I. (2004). *A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of Drosophila melanogaster. Dev Comp Immunol 28, 555-563.*

Volchenkov, R., Sprater, F., Vogelsang, P., and Appel, S. (2012). *The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. Scand J Immunol 75, 1-4.*

Waltzer, L., Bataillé, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). *Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in Drosophila haematopoiesis. EMBO J 21, 5477-486.*

Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataillé, L., and Haenlin, M. (2003). *Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during Drosophila hematopoiesis. EMBO J 22, 6516-525.*

Waltzer, L., Gobert, V., Osman, D., and Haenlin, M. (2010). *Transcription factor interplay during Drosophila haematopoiesis. Int J Dev Biol 54, 1107-115.*

Wang, R., and Green, D.R. (2012). *Metabolic checkpoints in activated T cells. Nat Immunol 13, 907-915.*

Watson, F.L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., and Schmucker, D. (2005). *Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309, 1874-78.*

Watson, K.L., Johnson, T.K., and Denell, R.E. (1991). *Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in Drosophila melanogaster. Dev Genet 12, 173-187.*

Watson, K.L., Konrad, K.D., Woods, D.F., and Bryant, P.J. (1992). *Drosophila homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 11302-06.*

Welman, A., Serrels, A., Brunton, V.G., Ditzel, M., and Frame, M.C. (2010). *Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells. J Biol Chem 285, 11607-616.*

Wertheim, B., Kraaijeveld, A.R., Schuster, E., Blanc, E., Hopkins, M., Pletcher, S.D., Strand, M.R., Partridge, L., and Godfray, H.C.J. (2005). *Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in Drosophila. Genome Biol 6, R94.*

Williams, M.J. (2009). *The c-src homologue Src64B is sufficient to activate the Drosophila cellular immune response. J Innate Immun 1, 335-39.*

Williams, M.J. (2009). *The Drosophila cell adhesion molecule Neuroglian regulates Lissencephaly-1 localisation in circulating immunosurveillance cells. BMC Immunol 10, 17.*

Williams, M.J., Ando, I., and Hultmark, D. (2005). *Drosophila melanogaster Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. Genes Cells 10, 813-823.*

Williams, M.J., Habayeb, M.S., and Hultmark, D. (2007). *Reciprocal regulation of Rac1 and Rho1 in Drosophila circulating immune surveillance cells. J Cell Sci 120, 502-511.*

Williams, M.J., Wiklund, M.-L., Wikman, S., and Hultmark, D. (2006). *Rac1 signalling in the Drosophila larval cellular immune response. J Cell Sci 119, 2015-024.*

Xavier, M.J., and Williams, M.J. (2011). *The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in Drosophila immunosurveillance cells. PLoS One 6, e19504.*

Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C.R., and Darnell, J.E. (1996). *Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. Cell 84, 421-430.*

Zaidman-Rémy, A., Regan, J.C., Brandão, A.S., and Jacinto, A. (2012). *The Drosophila larva as a tool to study gut-associated macrophages: PI3K regulates a discrete hemocyte population at the proventriculus. Dev Comp Immunol 36, 638-647.*

Zettervall, C.-J., Anderl, I., Williams, M.J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I., and Hultmark, D. (2004). *A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14192-97.*



# *-ANNEXES-*

## I. FIGURES ANNEXE

**TABLEAU 1 : PHENOTYPE HEMATOPOÏETIQUE SELON LA PERTE DE FONCTION CIBLEE**

**Phénotype hématopoïétique en fonction du territoire d'expression des pilotes induisant la perte de fonction.** \*, pilotes induisant également une expression dans les lobes secondaires ; + : positif ; - : négatif (+) : positif avec au moins un des deux pilotes ; # : 2 insertions différentes du même transgène (PCol85-Gal4/CyO GFP et PCol85-Gal4 / CyO<sup>Tb</sup>) ; TM : tumeur mélanotique ; L : lamellocytes en saignée.

			w		ds-RNA <i>cct2</i>		ds-RNA <i>cul4</i>		ds-RNA <i>hyrax</i>		ds-RNA <i>mRSP30</i>		ds-RNA <i>ush</i>	
			TM	L	TM	L	TM	L	TM	L	TM	L	TM	L
hemocytes (GL et circulation) et corps gras		SrpGal4* ou CgGal4*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hémocytes	hemocytes larvaires	hmlΔGal4*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	hemocytes embryonnaires	SnGal4 ou GcmGal4	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+	-	+	(+)	+
	GL :ZM	TepIVGal4*	-	-	+	+	+	+	létal		-	-	-	-
	GL : PSC	PCol85Gal4 #*	-	-	(+)	+	+	+	+	+	-	-	(+)	+
corps gras		FatbodyGal4	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

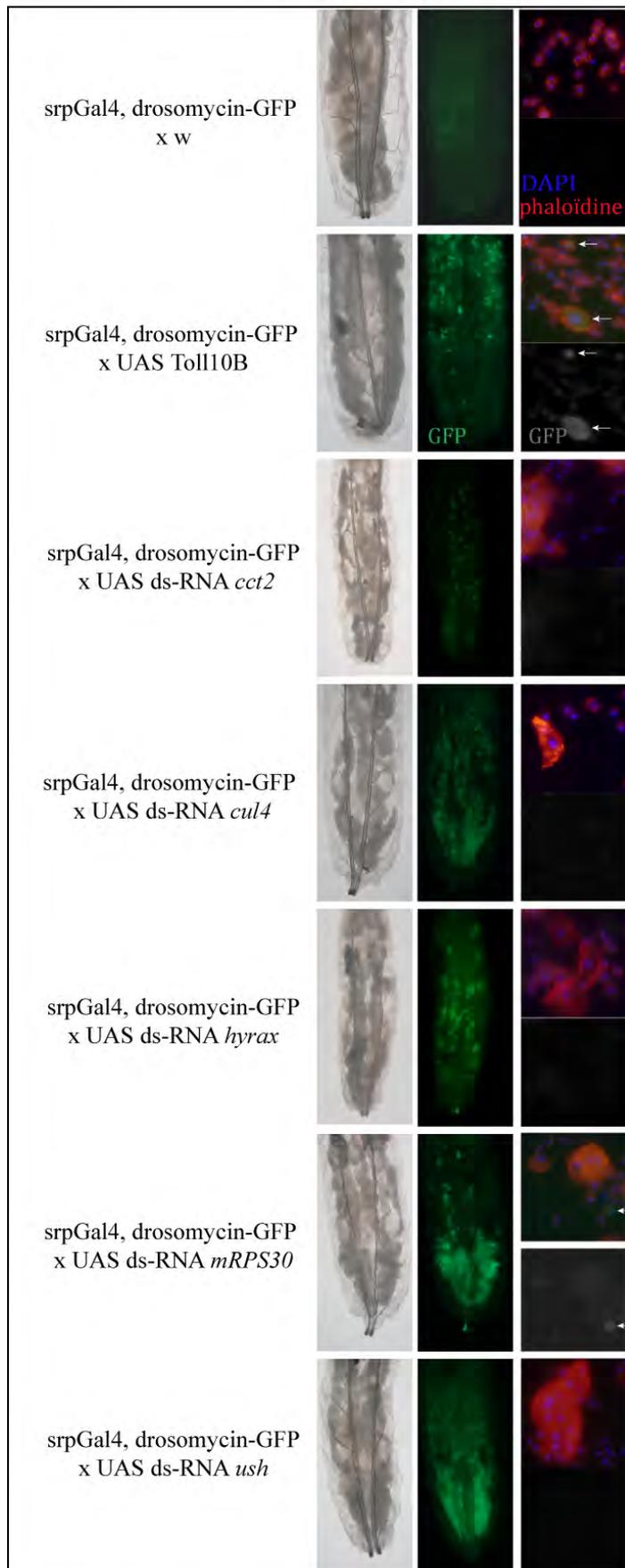
**TABLEAU 1 : L'ACTIVATION DU RAPPORTEUR DROSOMYCINE-GFP DANS LE CORPS GRAS EST ASSOCIEE A LA FORMATION DE TM**

	DD1, srpGal4			DD1 ; FatbodyGal4		
	TM	DD1 GFP corps gras	DD1 GFP Cc	TM	DD1 GFP corps gras	DD1 GFP Cc
w	-	-	-	-	-	-
ds-RNA <i>cct2</i>	+	+	-	-	-	+
ds-RNA <i>cul4</i>	+	+	-	+	+	+
ds-RNA <i>hyrax</i>	+	+	-	-	-	+
ds-RNA <i>mRSP30</i>	+	+	+	+	+	+
ds-RNA <i>ush</i>	+	+	-	-	-	-

**L'activation de la voie toll en fonction des pertes de fonctions ciblées aux tissus immuns ou au corps gras.** TM : tumeurs mélanotiques ; + : activation du rapporteur observée (expression de la GFP) à travers la cuticule pour le corps gras ou suite à une saignée pour les cellules circulantes (Cc). - : pas expression de la GFP détectée.

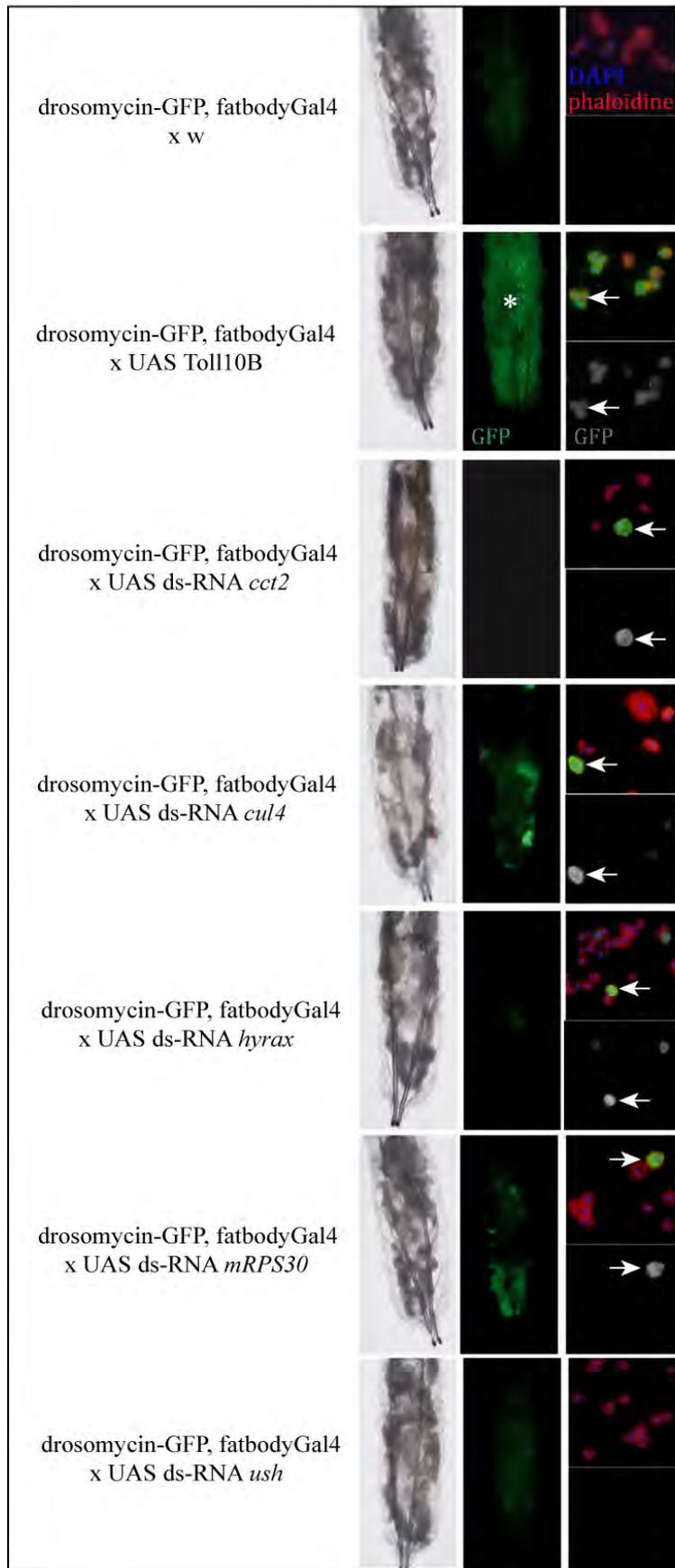


**FIGURE 14 : ACTIVATION DE LA VOIE TOLL SELON LE CONTEXTE DE PERTE DE FONCTION CIBLEE**



**Activation de la voie Toll suite à une perte de fonction ciblée aux tissus immuns.** L'activation du rapporteur Drosomycine-GFP est observée dans le corps gras (deux premières colonnes : en vert) et dans les hémocytes circulants (troisième colonne : en vert ou gris) suite à l'induction d'une perte de fonction ciblée aux hémocytes et au corps gras. Les flèches blanches pointent les hémocytes circulant GFP+.

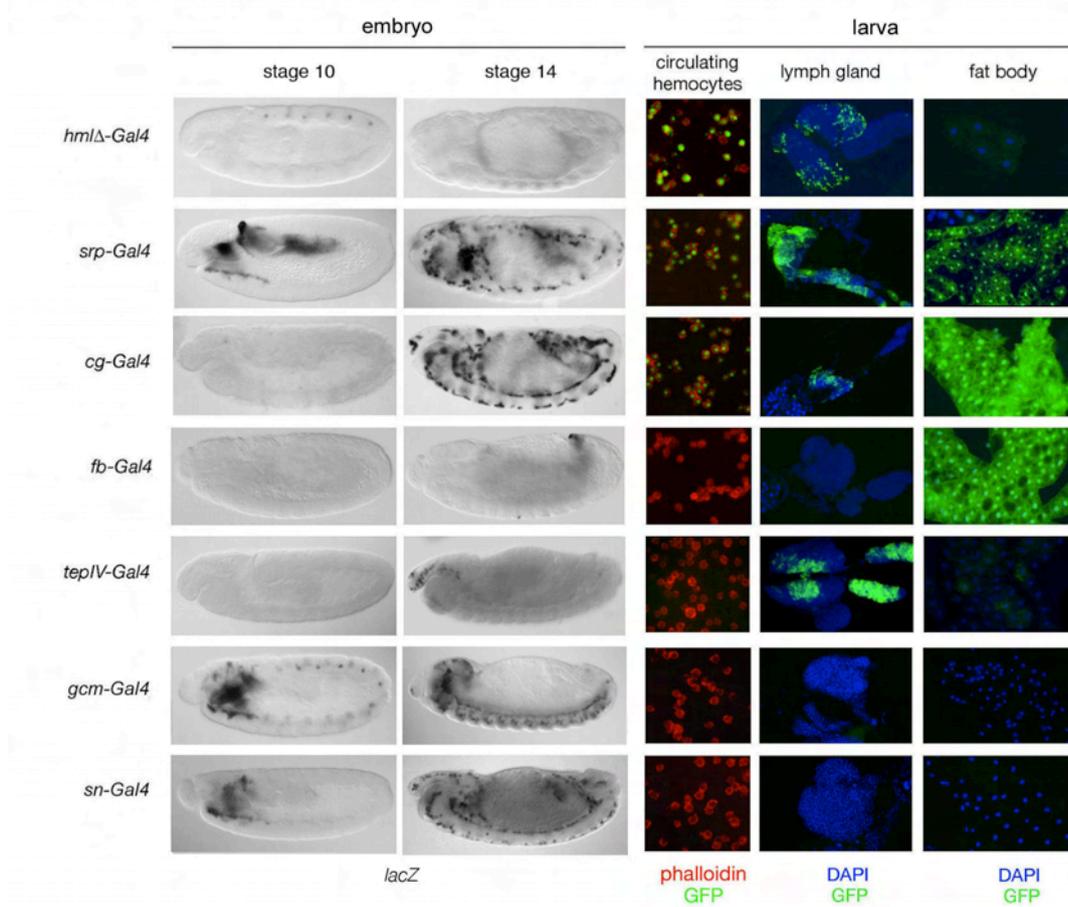
**FIGURE 15 : ACTIVATION DE LA VOIE TOLL SELON LES PERTES DE FONCTION CIBLEES AU CORPS GRAS**



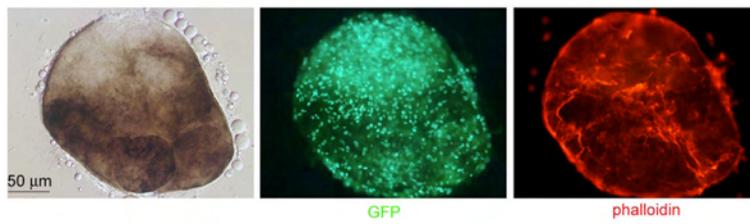
**Activation de la voie Toll suite à une perte de fonction ciblée au corps gras.** L'activation du rapporteur Drosomycine-GFP est observée dans le corps gras (deux premières colonnes : en vert) et dans les hémocytes circulants (troisième colonne : en vert ou gris) suite à l'induction d'une perte de fonction ciblée au corps gras. Les flèches blanches pointent les hémocytes circulants GFP+. L'étoile blanche indique les cellules péricardiales.

## II. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE AVET & BOYER 2010

Additional Figure 1



Additional Figure 2



Additional Table S3

## List of confirmed melanotic suppressor genes

CG	NAME	SYMBOL	inferred function	other information
CG12276	<i>Aos1</i>	<i>Aos1</i>	Ubiquitin activating enzyme; Toll signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>Aos1<sup>c06048</sup></i> )
CG14512	<i>Asparagine-linked glycosylation 13</i>	<i>Alg13</i>	UDP-GlcNAc transferase; protein sorting	
CG8444	<i>ATP6AP2</i>	<i>ATP6AP2</i>	vacuolar H(+)-ATPase, putative receptor; signaling	
CG9305	<i>B double prime 1</i>	<i>Bdp1</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG31256	<i>Brf</i>	<i>Brf</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG5848	<i>cactus</i>	<i>cact</i>	inhibitor of NF-κB transcription factors; Toll signalling, immune response	known as melanotic tumor suppressor [32]
CG7033	<i>Cct2</i>	<i>Cct2</i>	chaperonin-containing T-complex; protein folding	
CG15784	CG15784	CG15784	unknown	
CG31044	CG31044	CG31044	unknown	
CG7845	CG7845	CG7845	putative pre-ribosomal particle constituent; ribosome assembly?	
CG15349	<i>Chorion protein a at 7F</i>	<i>Cp7Fa</i>	unknown	
CG3889	<i>COP9 complex homolog subunit 1 b</i>	<i>CSN1b</i>	COP9 signalosome; protein degradation	partner of known melanotic tumor suppressors ( <i>CSN5</i> [43]; <i>CSN8</i> [44])
CG8711	<i>cullin-4</i>	<i>cul-4</i>	ubiquitin-protein ligase; protein degradation, transcription, DNA repair	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])

A. Avet-Rochex *et al.*

CG11837	<i>Dimethyladenosine transferase 1</i>	<i>Dim1</i>	ribosomal RNA processing	
CG5838	<i>DNA replication-related element factor</i>	<i>Dref</i>	transcription factor; transcription	known as melanotic tumor suppressor [39]
CG11901	<i>Ef1g</i>	<i>Ef1g</i>	translation elongation factor; translation	
CG1873	<i>Elongation factor 1a100E</i>	<i>Ef1a100E</i>	translation elongation factor; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Hsc70-4</i> [45])
CG5605	<i>eukaryotic release factor 1</i>	<i>eRF1</i>	translation termination factor; translation	
CG4407	<i>Flavin adenine dinucleotide synthetase 1</i>	<i>Fad1</i>	mitochondrial respiratory chain; ATP synthesis	
CG10033	<i>foraging</i>	<i>for</i>	cGMP-dependent kinase; signaling	
CG4396	<i>found in neurons</i>	<i>fne</i>	RNA splicing	
CG2522	<i>GTP-binding protein</i>	<i>Gtp-bp</i>	signal recognition particle receptor; protein targeting	
CG6489	<i>Heat-shock-protein-70Bc</i>	<i>Hsp70Bc</i>	chaperon; protein folding	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Hsc70-4</i> [45])
CG11990	<i>hyrax</i>	<i>hyx</i>	Paf1 complex component; elongation of transcription	
CG5222	<i>Ints9</i>	<i>Ints9</i>	integrator complex subunit; transcription, RNA processing	
CG1994	<i>lethal (1) G0020</i>	<i>l(1)G0020</i>	N-acetyltransferase; ribosomal constituent processing	
CG11295	<i>lethal-(2)-denticleless</i>	<i>l(2)dtl</i>	response to DNA damage; DNA replication	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])
CG10603	<i>mitochondrial ribosomal protein L13</i>	<i>mRpL13</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG12954	<i>mitochondrial ribosomal protein L41</i>	<i>mRpL41</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])

A. Avet-Rochex *et al.*

CG1577	<i>mitochondrial ribosomal protein L52</i>	<i>mRpL52</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG8470	<i>mitochondrial ribosomal protein S30</i>	<i>mRpS30</i>	mitochondrial small ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG8025	<i>Mtr3</i>	<i>Mtr3</i>	exosome component; RNA processing	
CG2286	<i>NADH:ubiquinone reductase 75kD subunit precursor</i>	<i>ND75</i>	mitochondrial respiratory chain complex; ATP synthesis	lymph-gland driven dsRNA induces lamellocyte formation [37]
CG1857	<i>necrotic</i>	<i>nec</i>	serine-type endopeptidase inhibitor; Toll signalling, immune response	
CG14230	<i>Nucleolar protein 8</i>	<i>NoI8</i>	ribosomal RNA processing	
CG5786	<i>peter pan</i>	<i>ppan</i>	pre-ribosomal particles constituent; ribosome assembly	
CG4904	<i>Proteasome 35kD subunit</i>	<i>Pros35</i>	proteasome component; protein degradation	
CG17331	<i>Proteasome subunit, beta type, 2</i>	<i>Psmb2</i>	proteasome component; protein degradation	
CG5519	<i>Prp19 (GTP-binding-protein)</i>	<i>Prp19 (Gbp)</i>	RNA splicing	
CG7757	<i>Prp3</i>	<i>Prp3</i>	RNA splicing	
CG6322	<i>Prp4</i>	<i>Prp4</i>	RNA splicing	
CG13194	<i>pyramus</i>	<i>pyr</i>	cytokine; fibroblast growth factor receptor signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>pyr<sup>MB02808</sup></i> )
CG14999	<i>Replication factor C subunit 4</i>	<i>RfC4</i>	replication factor C component; DNA replication	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>RfC1</i> [46]); zygotic mutations associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>RfC4<sup>B6</sup>;RfC4<sup>B6</sup>/RfC4<sup>A118</sup></i> )
CG5371	<i>Ribonucleoside diphosphate reductase large subunit</i>	<i>RnrL</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase complex; DNA replication	

Additional Table S3

## List of confirmed melanotic suppressor genes

CG	NAME	SYMBOL	inferred function	other information
CG12276	<i>Aos1</i>	<i>Aos1</i>	Ubiquitin activating enzyme; Toll signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>Aos1</i> <sup>c06048</sup> )
CG14512	<i>Asparagine-linked glycosylation 13</i>	<i>Alg13</i>	UDP-GlcNAc transferase; protein sorting	
CG8444	<i>ATP6AP2</i>	<i>ATP6AP2</i>	vacuolar H(+)-ATPase, putative receptor; signaling	
CG9305	<i>B double prime 1</i>	<i>Bdp1</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG31256	<i>Brf</i>	<i>Brf</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG5848	<i>cactus</i>	<i>cact</i>	inhibitor of NF-κB transcription factors; Toll signalling, immune response	known as melanotic tumor suppressor [32]
CG7033	<i>Cct2</i>	<i>Cct2</i>	chaperonin-containing T-complex; protein folding	
CG15784	CG15784	CG15784	unknown	
CG31044	CG31044	CG31044	unknown	
CG7845	CG7845	CG7845	putative pre-ribosomal particle constituent; ribosome assembly?	
CG15349	<i>Chorion protein a at 7F</i>	<i>Cp7Fa</i>	unknown	
CG3889	<i>COP9 complex homolog subunit 1 b</i>	<i>CSN1b</i>	COP9 signalosome; protein degradation	partner of known melanotic tumor suppressors ( <i>CSN5</i> [43]; <i>CSN8</i> [44])
CG8711	<i>cullin-4</i>	<i>cul-4</i>	ubiquitin-protein ligase; protein degradation, transcription, DNA repair	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])

**Additional Table S1 Results from the primary and secondary screens**

CG_NO	SYMBOL	Insertions	Primary screen		Secondary screen (% tumors)		
			<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>
CG10001	<i>AR-2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10006	CG10006	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10018	<i>Snm1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10033	<i>for</i>	2	pos.	pos.	0	0	16.5
CG10034	<i>tj</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10041	CG10041	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10079	<i>Egfr</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10086	CG10086	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10089	CG10089	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10093	<i>Cyp313a3</i>	1	pos.	neg.	1.3	0	0
CG10104	CG10104	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10117	<i>ttv</i>	2	neg.	pos.	1.7	0	15.6
CG10118	<i>ple</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10134	<i>beat-Va</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG10137	CG10137	1	pos.	neg.	0	0	0
CG10143	<i>Adgf-E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10149	<i>Rpn6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10174	<i>Ntf-2r</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10176	CG10176	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10186	CG10186	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10194	CG10194	1	neg.	pos.	0	0	0
CG10198	<i>Nup98</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10207	<i>NaPi-T</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10223	<i>Top2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10264	CG10264	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10275	<i>kon</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10278	<i>GATAe</i>	1	pos.	neg.	2.4	2.7	4.3
CG10295	<i>Pak</i>	1	pos.	neg.	24	0	leth
CG10336	CG10336	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10338	CG10338	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10352	CG10352	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10362	CG10362	2	pos.	neg.	6	0	3.7
CG10364	<i>msb1l</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10366	CG10366	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG10371	<i>Plip</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10376	CG10376	2	neg.	pos.	0	0	0
CG10383	CG10383	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10385	<i>msh-1</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG10424	CG10424	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10428	CG10428	2	neg.	pos.	0	0	0
CG10470	CG10470	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10472	CG10472	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10475	<i>Jon65Ai</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10492	CG10492	1	pos.	neg.	1.4	1.8	0
CG10493	<i>Phlpp</i>	1	neg.	pos.	0	1.3	0
CG10522	<i>sti</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10545	<i>Gbeta13F</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1057	<i>MED31</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG10572	<i>Cdk8</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10579	<i>Eip63E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10584	CG10584	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10587	CG10587	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10588	CG10588	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10591	CG10591	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10593	<i>Acer</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG10600	CG10600	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10602	CG10602	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10603	<i>mRpL13</i>	1	pos.	neg.	4	12	36
CG10616	CG10616	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10619	<i>tup</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10637	<i>Nak</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10655	<i>l(2)37Bb</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG10658	<i>Hf</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10663	CG10663	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10671	CG10671	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10695	<i>Pat1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10697	<i>Ddc</i>	2	pos.	pos.	1	0	0
CG10700	CG10700	1	pos.	neg.	0	0	1.7
CG10738	CG10738	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10746	<i>fok</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10814	CG10814	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10823	<i>SIFR</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10846	<i>dyn-p25</i>	1	neg.	pos.	2.8	5	0

CG10855	CG10855	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10863	CG10863	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10881	CG10881	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10898	CG10898	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10908	CG10908	2	pos.	pos.	0	0	0
CG10909	CG10909	2	pos.	pos.	1.2	1.6	0
CG10954	<i>Arc-p34</i>	2	pos.	pos.	0	2	4.8
CG10962	CG10962	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG10984	CG10984	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1100	<i>Rpn5</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1102	<i>MP1</i>	1	neg.	pos.	0	0	1.7
CG11035	CG11035	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11037	CG11037	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11044	CG11044	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11064	<i>Rfabg</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG11076	CG11076	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11081	<i>plexA</i>	3	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11084	<i>pk</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG11093	CG11093	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11095	CG11095	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11100	<i>Mes2</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG11101	<i>pwn</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11123	CG11123	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11124	<i>sPLA2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11125	CG11125	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11144	<i>mGluRA</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11152	CG11152	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11165	CG11165	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11181	<i>cup</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG11190	CG11190	1	pos.	neg.	1.4	0	3.9
CG11202	<i>org-1</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG11210	CG11210	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11212	<i>Ptr</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11295	<i>l(2)dtl</i>	1	neg.	pos.	4	11.3	23.6
CG11303	<i>TM4SF</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11308	<i>sa</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG11318	CG11318	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11326	<i>Tsp</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11331	<i>Spn27A</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG11356	CG11356	2	neg.	pos.	0	0	0
CG11360	CG11360	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11364	<i>Cyp318a1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11371	<i>dbr</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11387	<i>ct</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11396	CG11396	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11405	<i>A3-3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11420	<i>png</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11426	CG11426	2	pos.	neg.	0	1.4	0
CG11437	CG11437	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11440	<i>laza</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11447	CG11447	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11448	CG11448	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11451	<i>Spc105R</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11466	<i>Cyp9f2</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG1147	<i>NPFR1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11495	<i>rasp</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1152	<i>Gld</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11522	<i>RpL6</i>	1	pos.	neg.	4.8	6.7	0
CG11527	<i>Tig</i>	1	pos.	neg.	0	0	12.1
CG11539	CG11539	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11576	CG11576	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11600	CG11600	2	neg.	neg.	0	0	0
CG11608	CG11608	2	neg.	pos.	0	0	0
CG11621	<i>Pi3K68D</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11642	<i>TRAM</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1165	<i>LysS</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11664	CG11664	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11696	CG11696	2	pos.	neg.	0	1.4	0
CG11738	<i>l(1)G0004</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11798	<i>chn</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11802	CG11802	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11804	<i>ced-6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11816	CG11816	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11833	<i>Ssl2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11836	CG11836	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11837	CG11837	1	neg.	pos.	5	0	84.1
CG11841	CG11841	1	neg.	pos.	0	0	0
CG11842	CG11842	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG11843	CG11843	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11856	<i>Nup358</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11861	<i>cul-3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11865	CG11865	1	pos.	neg.	0	0	0
CG11866	CG11866	2	pos.	neg.	0	1.6	2
CG11870	CG11870	1	pos.	neg.	0	0	nd
CG11873	CG11873	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11882	CG11882	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11888	<i>Rpn2</i>	2	pos.	pos.	5	4	leth
CG11897	CG11897	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11898	CG11898	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11900	CG11900	1	pos.	neg.	0	0	0
CG11901	<i>Ef1gamma</i>	2	pos.	neg.	17.2	0	leth
CG11911	CG11911	2	neg.	neg.	0	0	0
CG11912	CG11912	1	pos.	pos.	2	3.3	0
CG11941	<i>skpC</i>	1	pos.	neg.	0	0	10.3
CG11942	<i>skpE</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11981	<i>Prosbeta3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG11990	<i>hyx</i>	1	pos.	neg.	55	8.3	7.7
CG1200	<i>Aplip1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12006	CG12006	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12007	CG12007	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12042	CG12042	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12057	CG12057	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12069	CG12069	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12072	<i>wts</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG12079	CG12079	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12089	<i>beat-VI</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12092	<i>NPC1b</i>	1	pos.	neg.	0	0	nd
CG12093	CG12093	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12116	CG12116	1	pos.	neg.	0	0	0
CG12119	CG12119	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12129	CG12129	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12139	CG42611	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12149	<i>c12.2</i>	2	pos.	neg.	2	0	0
CG12154	<i>oc</i>	2	pos.	pos.	67	9.4	39.4
CG12159	CG12159	2	pos.	neg.	0	0	0
CG12161	<i>Prosbeta2R2</i>	2	pos.	neg.	0	0	1.7
CG12169	<i>Ppm1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG12172	<i>Spn43Aa</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12177	CG12177	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12187	CG12187	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12201	CG12201	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12208	<i>Hr46</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12217	<i>PpV</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG12225	<i>Spt6</i>	1	pos.	neg.	32.1	1.4	41.4
CG12227	<i>skpF</i>	1	pos.	pos.	0	0	0
CG12229	CG12229	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12251	<i>AQP</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12256	CG12256	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12276	<i>Aos1</i>	1	pos.	neg.	0	10	56.4
CG1228	<i>Ptpmeg</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12290	CG12290	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12298	<i>sub</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12301	CG12301	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12301	CG12301	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12306	<i>polo</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12340	CG12340	1	pos.	neg.	0	0	0
CG12345	<i>Cha</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12351	<i>deltaTry</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12352	<i>san</i>	2	pos.	pos.	nd	nd	nd
CG12370	CG12370	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12375	CG12375	2	pos.	pos.	0	2.5	0
CG12384	CG12384	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1241	<i>Atg2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12505	<i>Arc1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12516	CG12516	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12519	CG12519	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12558	CG12558	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12581	CG12581	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12653	<i>btd</i>	2	pos.	pos.	37.3	0	leth
CG12661	CG12661	2	pos.	pos.	2.5	9	54.5
CG12664	<i> fend</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12665	<i>Obp8a</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12680	CG12680	2	neg.	pos.	0	0	0
CG12682	CG12682	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12715	CG12715	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12716	CG12716	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG12717	CG12717	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12720	<i>Ten-a</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12721	CG12721	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12723	CG12723	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12726	CG12726	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12734	CG12734	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12743	<i>otu</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12765	CG12765	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12772	CG12772	2	pos.	neg.	14	0	75
CG12789	<i>santa-maria</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12822	CG12822	2	pos.	neg.	0	0	2
CG12825	CG12825	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12831	CG12831	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12832	<i>Tsp42Eq</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG12833	<i>esn</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12838	<i>Tsp42Eo</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12839	<i>Tsp42En</i>	2	pos.	pos.	0	0	0
CG12841	<i>Tsp42Ek</i>	2	neg.	pos.	0	0.7	0
CG12847	<i>Tsp42Ec</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12857	CG12857	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12866	CG12866	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12870	CG34362	2	pos.	neg.	30	0	65.2
CG12885	CG12885	2	pos.	pos.	0	0	0
CG12908	<i>Ndg</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12909	CG12909	2	pos.	neg.	0	0	0
CG12910	CG12910	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1295	CG1295	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12951	CG12951	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12954	<i>mRpL41</i>	2	neg.	pos.	0	0	83.6
CG12960	<i>lr52a</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12964	CG12964	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12975	CG12975	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12983	CG12983	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG12984	CG12984	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1299	CG1299	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13077	CG13077	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13155	CG13155	1	pos.	neg.	0	0	0
CG13160	CG13160	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13189	CG13189	1	neg.	pos.	0	3	0

CG13194	<i>pyr</i>	1	pos.	neg.	28	0	1.8
CG13243	CG13243	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13247	CG13247	1	pos.	neg.	0	0	1.7
CG13251	CG13251	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13271	<i>Ugt36Bb</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13272	CG13272	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13280	CG13280	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13284	CG13284	1	pos.	neg.	0	0	0
CG13325	CG13325	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13335	CG13335	2	neg.	pos.	0	3	0
CG13337	CG13337	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13338	<i>Cpr50Ca</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13339	CG13339	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13345	<i>tum</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13351	<i>RN-tre</i>	1	pos.	neg.	0	0	1.5
CG13379	<i>Sgf11</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1342	CG1342	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1343	<i>Sp1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13549	<i>yip3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13566	CG13566	2	pos.	neg.	0	0	0
CG13579	CG13579	2	neg.	neg.	0	0	0
CG1358	CG1358	2	pos.	neg.	0	0	0
CG13641	CG13641	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13651	<i>danr</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13698	CG13698	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13733	CG13733	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13758	<i>pdfr</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13766	CG13766	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13894	CG13894	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13942	<i>Shroom</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1395	<i>stg</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13977	<i>Cyp6a18</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13978	CG13978	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1399	CG1399	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG13995	CG13995	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1401	<i>cul-5</i>	2	neg.	neg.	0	0	0
CG14026	<i>tkv</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14029	<i>vri</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1406	<i>U2A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG14077	CG14077	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14082	CG14082	2	neg.	pos.	2	0	0
CG14085	CG14085	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14086	CG14086	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14087	CG14087	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1409	CG1409	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14100	CG14100	2	neg.	pos.	8	2.4	3.6
CG14102	CG14102	1	neg.	pos.	0	4.9	0
CG14187	CG14187	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14207	CG14207	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14211	<i>MKP-4</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14222	CG14222	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14230	CG14230	2	pos.	neg.	5	2.9	70.7
CG14291	CG14291	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1433	<i>Atu</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14355	CG14355	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14375	CG14375	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1438	<i>Cyp4c3</i>	1	neg.	pos.	0	4.1	0.9
CG14381	<i>timeout</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG14384	CG14384	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14387	<i>d-cup</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14390	<i>beat-Vc</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1440	CG1440	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14401	CG14401	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14427	CG14427	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1443	CG1443	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14437	<i>COQ7</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG14439	CG14439	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14441	CG14441	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14446	CG14446	1	pos.	neg.	3.2	0	3.2
CG14509	CG14509	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14512	CG14512	1	pos.	neg.	5.6	0	13.2
CG14513	<i>yemalpha</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14516	CG14516	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14527	CG14527	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1453	<i>Klp10A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14574	CG14574	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1458	CG1458	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14619	CG14619	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG14625	CG14625	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14626	CG14626	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14637	<i>abs</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14642	CG14642	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1469	<i>Fer2LCH</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1471	<i>CDase</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14750	<i>Vps25</i>	2	neg.	pos.	1.8	0	0
CG14760	CG14760	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14762	CG14762	1	pos.	neg.	0	0	0
CG14763	CG14763	1	neg.	pos.	0	0	0
CG1488	<i>Cyp311a1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14884	<i>CSN5</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG14895	<i>Pak3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1492	CG1492	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1495	<i>CaMKI</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1499	CG1499	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1499	CG1499	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14990	CG14990	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14992	<i>Ack</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG14999	<i>RfC4</i>	2	pos.	pos.	25.9	0	23
CG1505	<i>gd</i>	1	neg.	pos.	0	0	0.8
CG15072	CG15072	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1511	<i>Eph</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15118	CG15118	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1512	<i>cul-2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15136	CG15136	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15155	CG15155	2	neg.	pos.	0	3.6	0
CG15160	CG15160	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15161	CG15161	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15173	CG15173	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1520	<i>WASp</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15247	CG15247	1	pos.	neg.	1.4	3.6	13.3
CG15252	CG15252	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15253	CG15253	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15255	CG15255	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15262	CG15262	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1527	<i>RpS14b</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15280	<i>CR15280</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15305	<i>flw</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG15314	CG15314	1	pos.	pos.	12.3	1.9	leth
CG15319	<i>nej</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1532	CG1532	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15343	CG15343	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15347	CG15347	2	pos.	neg.	0	0	11.1
CG15350	<i>Cp7Fb</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15368	CG15368	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15369	CG15369	1	pos.	neg.	0	0	0
CG15370	CG15370	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15412	CG15412	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15436	CG15436	1	pos.	neg.	0	0	0
CG15437	<i>morgue</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15444	<i>ine</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15470	CG42594	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15504	<i>dmrt99B</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1569	<i>rod</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15697	<i>RpS30</i>	1	pos.	pos.	2.9	0	0
CG15698	<i>Oamb</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1571	CG1571	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15717	CG15717	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15717	CG15717	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15721	CG15721	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15727	CG15727	1	pos.	pos.	1.5	0	1
CG15728	CG15728	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15730	CG15730	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15738	CG15738	2	neg.	pos.	0	0	1.8
CG15738	CG15738	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15739	CG15739	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15743	CG15743	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15748	CG15748	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15749	<i>dmrt11E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15754	CG15754	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15764	CG15764	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15766	CG15766	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15768	CG42264	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15768	CG42264	2	pos.	neg.	0	0	0
CG15769	CG42264	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1577	<i>mRpL52</i>	1	pos.	pos.	1	5.2	86.8
CG15771	CG15771	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG15773	CG15773	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15784	CG15784	1	pos.	pos.	7.5	6	0
CG1582	CG1582	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG15927	CG15927	1	pos.	neg.	0	0	1.5
CG15929	<i>lin-52</i>	1	pos.	pos.	0	2.4	3.3
CG1602	CG1602	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1603	CG1603	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1607	CG1607	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1609	<i>Gcn2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1616	<i>dpa</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1624	<i>dpld</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1629	<i>yellow-h</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG1662	CG1662	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16705	<i>SPE</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16718	CG16718	2	pos.	neg.	0	0	nd
CG16724	<i>tra</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1673	CG1673	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1674	CG1674	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16747	<i>Oda</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16766	<i>TyrRII</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16788	<i>RnpS1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16796	<i>Hmgs</i>	2	neg.	neg.	0	0	0
CG16799	CG16799	2	pos.	neg.	0	0	0
CG16820	CG16820	1	pos.	pos.	1.3	1	1.8
CG16827	<i>alphaPS4</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16904	CG16904	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16908	CG16908	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16935	CG16935	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16973	<i>msn</i>	2	pos.	neg.	4	0	31.6
CG16983	<i>skpA</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1699	<i>Tsp66A</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16993	<i>in</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16996	CG16996	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16997	CG16997	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG16998	CG16998	3	neg.	pos.	0	1.6	0
CG17012	CG17012	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17027	CG17027	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17029	CG17029	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17064	<i>mars</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG17084	<i>mthl9</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17100	<i>cwo</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17119	CG17119	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17122	CG17122	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17131	<i>SP71</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG17161	<i>grp</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG17172	<i>ATbp</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17176	<i>ACXA</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17218	CG17218	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17245	<i>plexB</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17293	CG17293	1	pos.	neg.	4.9	0	0.9
CG17327	CG17327	1	pos.	neg.	0	0	0
CG17328	CG17328	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17331	CG17331	1	pos.	neg.	40	4	leth
CG17342	<i>Lk6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17348	<i>drl</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17352	CG17352	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1736	<i>Prosalpha3T</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17437	<i>wds</i>	1	pos.	neg.	0	0	52.4
CG17453	<i>Cyp317a1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17477	CG17477	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17487	<i>tankyrase</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17489	<i>RpL5</i>	2	pos.	pos.	nd	nd	nd
CG17498	<i>mad2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1750	CG1750	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17514	CG17514	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17520	<i>Ckl1alpha</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17540	<i>Spf45</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17559	<i>dnt</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17568	CG17568	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17572	CG17572	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17596	<i>S6kII</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17598	CG17598	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17610	<i>grk</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17611	<i>eIF6</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17617	<i>RhoGAP1A</i>	1	neg.	pos.	0	1.8	1.1
CG1762	<i>betaInt-nu</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1763	<i>nod</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG17646	CG17646	1	pos.	neg.	0	0	53.2

CG1765	<i>EcR</i>	2	pos.	neg.	3.7	0	0
CG17707	CG17707	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1771	<i>mew</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17711	CG31937	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17712	CG17712	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17717	CG17717	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17736	<i>schuy</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17758	CG42265	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17760	CG17760	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17764	CG17764	1	neg.	pos.	0	0	1.4
CG1780	<i>Idgf4</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17806	CG17806	2	neg.	pos.	0	0	0
CG1787	<i>Hexo2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17883	CG17883	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17904	CG17904	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1792	CG1792	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17923	<i>JYalpha</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17960	<i>RhoGAP1A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG17975	<i>sut2</i>	1	neg.	pos.	0	0	2.9
CG17976	<i>sut3</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18039	<i>KaiRIA</i>	2	pos.	neg.	2	8	6.8
CG1804	<i>kek6</i>	2	pos.	pos.	0	0	1.9
CG18063	CG18063	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18104	<i>arg</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18130	CG18130	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18155	CG18155	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18174	<i>Rpn11</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18178	CG18178	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18180	CG18180	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1819	CG34120	2	neg.	pos.	0	4.1	0
CG1821	<i>RpL31</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18223	CG18223	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18265	CG18265	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18279	<i>IM10</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18293	CG15333	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18294	CG18294	3	neg.	pos.	0	0	1.5
CG1832	CG1832	1	neg.	pos.	21	7.7	9.3
CG18330	<i>Cct2</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG18341	<i>Prosbeta2R1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG18372	<i>AttB</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18396	<i>Mst98Cb</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18402	<i>InR</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18412	<i>ph-p</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18472	CG18472	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18478	CG18478	2	pos.	pos.	0	0	0
CG18495	<i>Prosalpha1</i>	2	pos.	pos.	26.7	4.8	leth
CG18507	CG18507	2	neg.	pos.	0	0	0
CG18557	CG18557	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18563	CG18563	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1857	<i>nec</i>	1	pos.	pos.	21.5	17.5	leth
CG1859	<i>Spn43Ad</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18639	<i>NPFR76F</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18657	<i>NetA</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1873	<i>Ef1alpha100E</i>	1	neg.	pos.	9.5	2.5	18.4
CG18741	<i>DopR2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1877	<i>lin19</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG18812	CG18812	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18815	CG18815	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG18858	CG18858	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1891	<i>sax</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1893	<i>scramb2</i>	2	pos.	neg.	0	0	4
CG1896	CG1896	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1901	<i>mav</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1906	<i>alph</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1924	CG1924	1	pos.	neg.	8	0	3.2
CG1941	CG1941	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1950	CG1950	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1951	CG1951	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1954	<i>Pkc98E</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1958	CG1958	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1973	<i>yata</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG1994	<i>l(1)G0020</i>	2	pos.	neg.	12	0	17.5
CG1998	CG1998	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2010	CG2010	1	pos.	neg.	5.6	0	5.9
CG2045	<i>Ser7</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2048	<i>dco</i>	1	pos.	neg.	8.9	0	51.4
CG2052	CG2052	1	pos.	neg.	1.6	0	0
CG2054	<i>Cht2</i>	1	pos.	neg.	0	0	0

CG2056	<i>spirit</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2071	<i>Ser6</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2096	<i>flw</i>	1	pos.	pos.	0	0	1.6
CG2105	<i>Corin</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2114	<i>FR</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2125	<i>ci</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2126	CG2126	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2137	CG2137	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2160	<i>Socs44A</i>	1	neg.	pos.	0	0	1.9
CG2168	<i>RpS3A</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2187	CG2187	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2190	<i>hep</i>	2	pos.	pos.	0	0	0
CG2191	<i>Smyt</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2199	CG2199	2	neg.	pos.	0	0	0
CG2200	CG2200	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2210	<i>awd</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2217	CG2217	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2218	CG2218	2	pos.	neg.	0	0	0
CG2229	<i>Jon99Fii</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2241	<i>Rpt6R</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2275	<i>Jra</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2286	<i>ND75</i>	2	pos.	pos.	8	5.2	92.9
CG2310	CG2310	2	neg.	pos.	0	0	0
CG2316	CG2316	2	pos.	neg.	0	0	0
CG2374	<i>lbn</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG2411	<i>ptc</i>	2	neg.	pos.	1.8	0	4.3
CG2453	CG2453	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2522	<i>Gtp-bp</i>	1	pos.	pos.	18	21.4	leth
CG2560	<i>Cpr11A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2574	CG2574	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2621	<i>sgg</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2655	<i>HLH3B</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2682	<i>d4</i>	1	pos.	pos.	0	0	0
CG2750	CG2750	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2762	<i>ush</i>	2	pos.	pos.	40	17	67.7
CG2767	CG2767	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2788	<i>Dot</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2835	<i>G-salpa60A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2845	<i>phl</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG2848	<i>Trn-SR</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2906	CG2906	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2909	CG2909	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2916	<i>Sep5</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG2943	CG2943	2	pos.	neg.	0	0	3.8
CG2948	<i>rev7</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2969	<i>Atet</i>	1	neg.	pos.	nd	nd	nd
CG2974	CG2974	1	pos.	neg.	0	0	0
CG2976	CG2976	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2984	<i>Pp2C1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2985	<i>Yp1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2993	CG2993	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG2993	CG2993	2	neg.	pos.	0	0	0
CG30022	CG30022	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3003	CG3003	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3004	CG3004	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30043	CG30043	2	pos.	neg.	0	0	0
CG30045	<i>Cpr49Aa</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30049	CG30049	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30051	CG30051	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30054	CG30054	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30060	CG30060	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30062	CG30062	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30072	<i>Obp50c</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG30075	CG30075	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30076	CG30076	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30077	CG30077	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30091	CG30091	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3011	CG3011	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30148	CG30148	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30152	CG30152	2	pos.	neg.	0	4	0
CG30156	CG30156	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30156	CG30156	1	pos.	neg.	3.5	0	57.7
CG30160	CG30160	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30194	CG30194	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3021	CG3021	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30222	CG30222	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3024	<i>torp4a</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30334	CG30334	2	pos.	neg.	0	0	0

CG30371	CG30371	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30379	CG30379	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30382	CG30382	2	pos.	pos.	0	0	0
CG30383	CG30383	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30426	<i>egg</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30464	<i>Ir52d</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30468	<i>Ir52c</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30475	CG30475	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3048	<i>Traf4</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30480	CG30480	2	pos.	neg.	0	0	0
CG30496	CG30496	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3050	<i>Cyp6d5</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG30502	CG30502	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3051	<i>SNF1A</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG3057	<i>colt</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3066	<i>Sp7</i>	1	pos.	neg.	0	0	nd
CG3074	CG3074	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3077	CG3077	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31004	CG31004	1	neg.	pos.	0	0	0
CG31044	CG31044	2	pos.	neg.	13.6	0	1.8
CG31053	CG31053	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31055	CG31055	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31062	<i>side</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31063	CG31063	1	neg.	pos.	0	1.5	0
CG31092	<i>LpR2</i>	1	pos.	pos.	3	0	0
CG31094	<i>LpR1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31150	CG31150	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3117	CG3117	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31256	<i>Brf</i>	1	pos.	pos.	15.6	3.6	50.7
CG31298	<i>beat-Vb</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31347	CG31347	1	pos.	neg.	2	0	0
CG31359	<i>Hsp70Bb</i>	1	pos.	neg.	7.1	7.6	leth
CG31367	CG31367	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31388	CG31388	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31421	<i>Tak1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31426	<i>ligatin</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31449	<i>Hsp70Ba</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31469	CG31469	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31633	CG31633	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG3164	CG3164	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31659	CG31659	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3166	<i>aop</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31689	CG31689	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31694	CG31694	1	pos.	neg.	2.6	0	1.2
CG3171	<i>Tre1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31714	CG31714	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31731	CG31731	1	neg.	pos.	0	0	nd
CG31748	<i>Gr36c</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31782	CG31782	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31800	CG31800	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31803	CG31803	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31805	CG31805	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31806	CG31806	1	neg.	pos.	0	0	4
CG31810	CG31810	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31821	CG31821	2	pos.	neg.	0	0	0
CG31823	CG31823	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31827	CG31827	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31829	<i>cul-3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31836	CG31836	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31918	CG31918	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31954	CG31954	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG31999	CG31999	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3200	<i>Reg-2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32005	<i>pan</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32009	<i>CR32009</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32010	<i>CR32010</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32011	<i>CR32011</i>	1	pos.	pos.	0	0	1.5
CG32018	<i>Zyx102EF</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32019	<i>bt</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32146	<i>dlp</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32176	CG32176	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32177	CG32177	1	neg.	neg.	0	0	0
CG32180	<i>Eip74EF</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32211	<i>Taf6</i>	1	pos.	pos.	34.2	3	10.8
CG32219	CG32219	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32225	CG32225	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3223	CG3223	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3227	CG3227	1	pos.	pos.	4.5	2	0

CG3234	<i>tim</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32356	<i>ImpE1</i>	2	neg.	pos.	0	4.5	1.6
CG32417	<i>Myt1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32443	<i>Pc</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32523	CG32523	2	neg.	pos.	0	0	0
CG3265	<i>Eb1</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG32654	<i>Sec16</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32656	<i>Muc11A</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32659	<i>Ten-a</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32659	<i>Ten-a</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32676	CG32676	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32683	CG32683	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32685	CG32685	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32694	CG32694	2	pos.	neg.	nd	nd	nd
CG32697	<i>l(1)G0232</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32698	CG32698	1	pos.	neg.	0	0	0
CG32700	CG32700	2	pos.	pos.	0	0	0
CG32703	CG32703	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32703	CG32703	2	neg.	pos.	0	0	0
CG32717	<i>sdt</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32721	<i>NELF-B</i>	2	neg.	pos.	0	1.1	0
CG3274	<i>Bap170</i>	2	pos.	neg.	0	0	2
CG32743	<i>Smg1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32767	CG32767	1	pos.	pos.	40	1.8	leth
CG32843	<i>Dh31-R1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32858	<i>sn</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3287	CG3287	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3289	<i>Ptpa</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32918	CG15892	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG32918	CG15891	1	neg.	pos.	0	0	nd
CG3298	<i>Jhl-1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3307	<i>pr-set7</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33070	<i>Sxl</i>	1	pos.	neg.	0	2	1.2
CG3309	CG3309	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3314	<i>RpL7A</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG33156	CG33156	2	pos.	pos.	0	0	4
CG3319	<i>Cdk7</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33196	<i>dp</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33203	CG33203	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG33261	<i>Trl</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG3327	<i>E23</i>	1	pos.	neg.	13.1	11.4	27.6
CG3329	<i>Prosbeta2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33297	<i>CSN8</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33466	<i>Fs</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33517	<i>D2R</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3354	<i>Mst77F</i>	2	neg.	pos.	0	4.7	26.9
CG33714	CG33714	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3373	<i>Hmu</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33934	CG33934	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33950	<i>trol</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG33962	<i>Cp7Fa</i>	2	pos.	pos.	10.3	0	leth
CG33969	CG33969	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG34104	CG34104	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3412	<i>slmb</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3428	<i>pall</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3430	CG3430	1	neg.	pos.	0	0	0
CG34347	CG34347	2	pos.	neg.	0	3.1	0
CG34354	CG34354	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG34354	CG34354	1	pos.	neg.	0	0	0.9
CG34357	CG34357	2	pos.	neg.	1.6	0	0
CG34384	CG34384	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG34411	CG34411	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3466	<i>Cyp4d2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3476	CG3476	1	neg.	pos.	0	0	0
CG3509	CG3509	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3522	<i>Start1</i>	1	neg.	pos.	2.4	0	0
CG3599	<i>Btd</i>	2	pos.	pos.	2	4	1.6
CG3604	CG3604	2	neg.	pos.	2	0	2
CG3613	<i>qkr58E-1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3618	CG3618	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3632	CG3632	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3634	CG3634	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3688	<i>l(2)35Bd</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3700	CG3700	1	pos.	neg.	0	0	1.6
CG3704	CG3704	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3705	<i>aay</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3723	<i>Dhc93AB</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3729	CG3729	2	pos.	neg.	2.8	0	0

CG3739	CG3739	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3759	CG3759	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3763	<i>Fbp2</i>	2	pos.	neg.	0	4	1.2
CG3798	<i>Nmda1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3801	<i>Acp76A</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3803	CG3803	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3809	CG3809	2	pos.	neg.	0	0	0
CG3811	<i>Oatp30B</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3842	CG3842	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3884	CG3884	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3886	<i>Psc</i>	2	pos.	pos.	4.7	0	0
CG3887	CG3887	2	neg.	pos.	0	0	0
CG3889	<i>CSN1b</i>	1	pos.	pos.	10.3	3.6	3.8
CG3897	<i>blot</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3898	CG3898	1	neg.	pos.	0	0	4.9
CG3902	CG3902	1	neg.	pos.	0	3.8	0
CG3906	CG3906	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3915	<i>Drl-2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3921	CG3921	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3937	<i>cher</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3954	<i>csw</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG3969	<i>PR2</i>	1	pos.	neg.	0	0	3.1
CG3975	CG3975	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4001	<i>Pfk</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4006	<i>Akt1</i>	2	pos.	neg.	nd	nd	nd
CG4007	<i>Nrk</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4012	<i>gek</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4032	<i>Abl</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG40398	CG17787	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4041	CG4041	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG40410	<i>Alg-2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG40411	<i>Parp</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4070	<i>Tis11</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4073	CG4073	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4080	CG4080	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4095	CG4095	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4097	<i>Pros26</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4111	<i>RpL35</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4140	CG4140	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG4151	CG4151	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4159	CG4159	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4161	CG4161	2	neg.	pos.	0	0	0
CG4163	<i>Cyp303a1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4164	CG4164	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4167	<i>Hsp67Ba</i>	1	neg.	pos.	2.5	0	nd
CG4181	<i>GstD2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4187	CG34411	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4192	<i>kek3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4200	<i>sl</i>	1	pos.	neg.	4.2	0	0
CG42233	CG42233	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42244	<i>Octbeta3R</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG42271	CG42271	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42273	<i>mnb</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42303	CG42303	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42335	CG42335	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42337	CG42337	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42348	CG42348	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42348	CG42348	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42400	CG42400	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42534	CG42534	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42541	CG42541	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4257	<i>Stat92E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42573	CG42573	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42574	CG42574	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG42613	CG42613	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4262	<i>elav</i>	1	pos.	pos.	0	0	0
CG4267	CG4267	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4289	CG4289	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4299	<i>Set</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4303	<i>Bap60</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4314	<i>st</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4323	CG4323	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4336	<i>rux</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4349	<i>Fer3HCH</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4353	<i>hep</i>	2	pos.	pos.	0	2.8	0
CG4356	<i>mAcR-60C</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4360	CG4360	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4390	CG4390	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG4396	<i>fne</i>	1	pos.	neg.	25	1.5	10.8
CG4404	CG4404	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4407	CG4407	2	pos.	neg.	30	2	19
CG4421	<i>GstD8</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4423	<i>GstD6</i>	1	pos.	neg.	0	2.2	0
CG4424	CG4424	2	neg.	pos.	0	0	0
CG4459	CG4459	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4465	CG4465	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4472	<i>ldgf1</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG4482	<i>mol</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4486	<i>Cyp9b2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4491	<i>noc</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4521	<i>mthl1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4527	<i>slik</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4550	<i>ninaE</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4551	<i>smi35A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4552	CG4552	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4562	CG4562	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4574	<i>Plc21C</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4579	<i>Nup154</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4582	CG4582	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4587	CG4587	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4607	CG4607	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4631	CG4631	1	pos.	neg.	0	0	0
CG4637	<i>hh</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4647	<i>mRpl49</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4659	<i>Srp54k</i>	2	pos.	pos.	31.7	0	leth
CG4661	CG4661	2	pos.	neg.	nd	nd	nd
CG4686	CG4686	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4694	<i>her</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG4697	<i>CSN1a</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG4703	<i>Arc42</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4707	CG4707	2	pos.	pos.	0	1.2	9.7
CG4712	CG4712	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4715	<i>Iris</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4727	<i>bol</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4755	<i>RhoGAP92B</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4757	CG4757	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4784	<i>Cpr72Ec</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG4793	CG4793	2	pos.	pos.	0	2	1.2
CG4812	<i>Ser8</i>	2	pos.	neg.	0	0	4.1
CG4817	<i>Ssrp</i>	1	pos.	pos.	1.5	5.2	1
CG4822	CG4822	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4830	CG4830	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4838	<i>beat-Ic</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4839	CG4839	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4852	<i>Sras</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG4854	CG4854	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4858	CG4858	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4863	<i>RpL3</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4904	<i>Pros35</i>	1	pos.	pos.	2.8	5	leth
CG4914	CG4914	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4919	<i>Gclm</i>	2	neg.	pos.	0	0	0
CG4926	<i>Ror</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4955	CG4955	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4965	<i>twe</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG4995	CG4995	2	neg.	pos.	0	1.2	0
CG5044	CG5044	1	pos.	neg.	0	3.3	3.7
CG5059	CG5059	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5069	<i>croc</i>	1	pos.	neg.	0	4	0
CG5091	CG5091	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5092	<i>Tor</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5094	<i>Sgt</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5118	CG5118	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5147	CG5147	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5171	CG5171	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5178	<i>Act88F</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5180	CG5180	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5181	CG5181	1	neg.	pos.	0	0	0
CG5203	<i>CHIP</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5220	CG5220	1	neg.	pos.	0	0	0
CG5222	CG5222	1	pos.	neg.	3.9	0	18.5
CG5232	<i>Sas</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5315	CG5315	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5325	CG5325	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5358	<i>Art4</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5371	<i>RnrL</i>	1	neg.	pos.	0	0.9	19.8
CG5378	<i>Rpn7</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG5390	CG5390	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5427	<i>Oatp33Ea</i>	2	pos.	neg.	4	0	0
CG5427	<i>Oatp33Ea</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5439	CG5439	2	pos.	neg.	0	0	nd
CG5475	<i>Mpk2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5483	<i>Lrrk</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5494	<i>Cpr92F</i>	1	pos.	pos.	3.4	4.3	nd
CG5519	<i>Prp19</i>	2	pos.	neg.	9.3	0	0
CG5528	<i>Toll-9</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5543	CG5543	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5550	CG5550	1	pos.	pos.	0	0	0
CG5561	CG5561	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5585	CG5585	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5596	<i>Mlc1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5597	CG5597	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5604	CG5604	1	neg.	pos.	0	4.8	0
CG5605	<i>eRF1</i>	2	pos.	neg.	15.9	0	16.7
CG5611	CG5611	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5612	CG5612	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5637	<i>nos</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5640	<i>Utx</i>	2	neg.	neg.	0	0	0
CG5641	CG5641	3	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5643	<i>wdb</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5649	<i>kin17</i>	1	pos.	pos.	30	1.3	1.3
CG5661	<i>Sema-5c</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5671	<i>Pten</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5680	<i>bsk</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5703	CG5703	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5704	CG5704	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5707	CG5707	1	neg.	pos.	0	0	0
CG5720	CG5720	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5737	<i>dmrt93B</i>	1	pos.	neg.	4.8	0	3.3
CG5758	CG5758	2	pos.	neg.	0	0	0
CG5783	CG5783	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5784	<i>Mapmodulin</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5786	<i>ppan</i>	1	pos.	neg.	31.3	16	45.7
CG5789	CG5789	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5790	CG5790	1	pos.	pos.	0	0	0
CG5807	CG5807	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG5818	<i>mRpl4</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5838	<i>Dref</i>	2	pos.	neg.	13.6	2.5	100
CG5847	CG5847	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5848	<i>cact</i>	1	pos.	pos.	12	4.4	25.4
CG5853	CG5853	2	neg.	pos.	0	0	4
CG5854	CG5854	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5855	<i>cni</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5872	CG5872	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5877	CG5877	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5905	<i>Nep1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5910	CG5910	1	pos.	neg.	0	3.4	1.3
CG5925	<i>desat2</i>	2	neg.	pos.	0	0	3.1
CG5938	CG5938	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5939	<i>Prm</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5953	CG5953	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5968	CG5968	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5974	<i>pll</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5991	CG5991	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5993	<i>os</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG5999	CG5999	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6012	CG6012	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6027	<i>cdi</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6036	CG6036	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6048	CG6048	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6054	<i>Su(fu)</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6121	<i>Tip60</i>	1	pos.	neg.	14.3	0	1.8
CG6122	<i>piwi</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6143	<i>Pep</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6151	CG6151	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6182	CG6182	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6188	CG6188	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6189	<i>l(1)1Bi</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6195	CG6195	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6197	CG6197	2	pos.	pos.	45	0	leth
CG6199	CG6199	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6207	<i>GlcAT-P</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6214	<i>MRP</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6220	CG6220	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6225	CG6225	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG6226	<i>FK506-bp1</i>	1	pos.	pos.	2	3.8	1.2
CG6238	<i>ssh</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6251	<i>Nup62</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6255	CG6255	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6273	<i>Eip74EF</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6280	CG6280	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6282	CG6282	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6284	<i>Sirt6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6289	CG6289	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6292	<i>CycT</i>	2	pos.	neg.	33.3	0	10
CG6298	<i>Jon74E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6311	<i>Edc3</i>	2	pos.	neg.	20.5	4	100
CG6322	CG6322	1	pos.	neg.	4.5	5	37.1
CG6333	CG6333	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6337	CG6337	3	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6355	<i>fab1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6380	CG6380	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6386	<i>ball</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6386	<i>ball</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6392	<i>cmet</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6426	CG6426	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6429	CG6429	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6434	CG6434	1	pos.	neg.	0	0	0
CG6451	<i>blue</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6459	CG6459	1	pos.	neg.	0	0	0
CG6470	CG6470	1	neg.	pos.	0	0	0
CG6480	CG6480	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6483	<i>Jon65Aiii</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6489	<i>Hsp70Bc</i>	1	pos.	pos.	26.4	15.5	68.1
CG6495	CG6495	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6495	CG6495	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6498	CG6498	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6501	<i>ns2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6502	<i>E(z)</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6518	<i>inaC</i>	3	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6523	CG6523	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6524	<i>Cp19</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6525	<i>pps</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6540	CG6540	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG6551	<i>fu</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6571	<i>rdgC</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6582	<i>Aac11</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6597	CG6597	1	pos.	neg.	0	0	0
CG6617	CG6617	1	neg.	pos.	0	0	0
CG6637	<i>lsn</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6639	CG6639	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6647	<i>porin</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6672	CG6672	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6673	CG6673	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6704	CG6704	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6715	<i>KP78a</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6739	CG6739	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6745	CG6745	2	neg.	pos.	0	0	2.9
CG6750	CG6750	1	neg.	pos.	4	0	0
CG6789	CG6789	1	neg.	neg.	0	0	0
CG6794	<i>Dif</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6818	<i>MESR6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6819	<i>mbo</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6831	<i>rhea</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6846	<i>RpL26</i>	2	pos.	neg.	14.3	0	leth
CG6854	CG6854	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6870	CG6870	1	neg.	pos.	0	0	0
CG6885	CG6885	1	pos.	pos.	0	2	0
CG6919	<i>oa2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6950	CG6950	2	neg.	neg.	0	0	0
CG6951	CG6951	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6962	CG6962	2	pos.	neg.	0	0	1.8
CG6963	<i>gish</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6964	<i>Gug</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6977	<i>Cad87A</i>	1	pos.	pos.	0	0	0
CG6998	<i>ctp</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG6999	CG6999	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7004	<i>fwd</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7014	<i>RpS5b</i>	1	pos.	pos.	8.2	3.6	0
CG7017	CG7017	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7033	CG7033	2	pos.	pos.	39	1.4	2
CG7049	CG7049	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7091	CG7091	2	pos.	neg.	0	0	0.9

CG7095	CG42450	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7097	<i>hppy</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7099	CG7099	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7100	<i>CadN</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7133	CG7133	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7134	<i>cdc14</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7148	CG7148	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7157	<i>Acp36DE</i>	1	neg.	pos.	0	0	0
CG7168	CG7168	2	neg.	pos.	0	2.2	0
CG7170	<i>Jon66Cii</i>	2	neg.	pos.	0	0	nd
CG7171	<i>Uro</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG7177	CG7177	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7200	CG7200	2	neg.	neg.	0	0	0
CG7219	<i>Spn28D</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7241	<i>Cyp304a1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7252	CG7252	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7257	<i>Rpt4R</i>	2	neg.	pos.	4.9	1	0
CG7275	CG7275	2	pos.	neg.	0	0	0
CG7290	CG7290	1	pos.	neg.	0	0	0
CG7293	<i>Klp68D</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7300	CG7300	1	pos.	neg.	0	0	0
CG7300	CG7300	1	pos.	neg.	1.1	0	0
CG7306	<i>obst-F</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7325	<i>Eig71Ek</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7328	CG7328	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7337	CG7337	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7351	<i>PCID2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7352	CG7352	2	pos.	neg.	0	0	1.3
CG7357	CG7357	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7358	CG7358	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7362	CG7362	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7365	CG7365	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7365	CG7365	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7375	CG7375	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7393	<i>p38b</i>	1	neg.	neg.	0	0	4
CG7407	CG7407	2	pos.	neg.	1.4	0	2.1
CG7411	<i>ort</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7415	<i>DppIII</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7442	CG7442	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG7461	CG7461	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7486	<i>Dredd</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7507	<i>Dhc64C</i>	1	neg.	pos.	nd	nd	nd
CG7524	<i>Src64B</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7542	CG7542	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7555	<i>Nedd4</i>	2	neg.	neg.	0	0	0
CG7569	<i>DopR2</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7582	CG7582	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7602	<i>DNApol-iota</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG7619	<i>Pros54</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7632	CG7632	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7644	<i>beat-lb</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7646	CG7646	1	neg.	pos.	0	0	nd
CG7693	<i>fray</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7717	<i>Mekk1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7725	<i>rogdi</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG7745	CG7745	2	pos.	pos.	0	0	0
CG7756	<i>Hsc70-2</i>	2	neg.	pos.	0	0	2.9
CG7757	CG7757	1	pos.	neg.	50.8	6	leth
CG7758	<i>ppl</i>	2	pos.	pos.	0	0	2
CG7765	<i>Khc</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7770	CG7770	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7777	CG7777	2	pos.	neg.	0	0	2
CG7826	<i>Gmap</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7831	<i>ncd</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7838	<i>BubR1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7843	CG7843	2	neg.	pos.	0	0	0
CG7845	CG7845	1	pos.	neg.	3.6	0	48.6
CG7873	<i>Src42A</i>	2	pos.	neg.	0	0	3.6
CG7885	<i>RpII33</i>	1	neg.	pos.	0	10	95
CG7904	<i>put</i>	2	pos.	neg.	0	0	0
CG7918	CG7918	1	pos.	pos.	0	0	nd
CG7927	CG7927	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7940	<i>Arp5</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7959	<i>Bgb</i>	2	pos.	neg.	4.4	0	0
CG7978	<i>Ac76E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG7996	<i>snk</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8023	<i>eIF4E-3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8025	<i>Mtr3</i>	1	pos.	neg.	12.5	0	21.7

CG8049	<i>Btk29A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8080	CG8080	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8086	CG8086	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8090	CG8090	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8093	CG8093	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8107	<i>CalpB</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8112	CG8112	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8127	<i>Eip75B</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8134	CG8134	2	pos.	neg.	1.2	0	0
CG8142	CG8142	2	pos.	neg.	2.4	0	0
CG8152	CG8152	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8171	<i>dup</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8173	CG8173	1	pos.	neg.	0	0	0
CG8193	CG8193	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8199	CG8199	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8203	<i>Cdk5</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8206	CG8206	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8210	<i>Vha14</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8222	<i>Pvr</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8224	<i>babo</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8257	CG8257	1	neg.	pos.	3.2	0	4.8
CG8271	<i>Sln</i>	2	neg.	pos.	0	0	1.9
CG8274	<i>Mtor</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8309	<i>Tango7</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8319	CG8319	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8329	CG8329	1	pos.	pos.	3.3	3.5	1.2
CG8336	CG8336	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8355	<i>sli</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8386	CG8386	2	pos.	neg.	0	0	0
CG8402	<i>PpD3</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8428	<i>spin</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8428	<i>spin</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG8444	CG8444	1	neg.	pos.	3	0	10
CG8461	CG8461	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8470	<i>mRpS30</i>	1	pos.	pos.	0	7.1	94.3
CG8493	<i>Den1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8507	CG8507	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8511	<i>Cpr49Ag</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8515	<i>Cpr49Ah</i>	1	pos.	neg.	0	0	0

CG8525	CG8525	1	pos.	neg.	0	0	0
CG8550	CG8550	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8561	<i>conv</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8565	CG8565	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8571	<i>smid</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8580	<i>akirin</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8586	CG8586	2	neg.	pos.	0	0	0
CG8590	<i>Klp3A</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8595	<i>Toll-7</i>	2	pos.	pos.	8.3	5	50
CG8599	<i>Su(var)3-7</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8657	<i>Dgkepsilon</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8701	CG8701	1	pos.	neg.	0	0	0
CG8711	<i>cul-4</i>	1	pos.	pos.	46	39.4	77.1
CG8719	<i>Odc2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8722	<i>Nup44A</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG8725	<i>CSN4</i>	2	pos.	neg.	nd	nd	nd
CG8727	<i>cyc</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8729	<i>rnh1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8738	CG8738	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8742	<i>Gyc76C</i>	2	neg.	neg.	0	0	0
CG8756	<i>verm</i>	2	pos.	pos.	nd	nd	nd
CG8767	<i>mos</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8780	<i>tey</i>	2	pos.	neg.	4	0	0
CG8789	<i>wnd</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8805	<i>wun2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8827	<i>Ance</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8867	<i>Jon25Bi</i>	1	neg.	pos.	0	3.9	0
CG8871	<i>Jon25Biii</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8878	CG8878	2	pos.	neg.	12.2	0	3.9
CG8881	<i>skpB</i>	1	neg.	neg.	0	0	0
CG8888	CG8888	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8896	<i>18w</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8905	<i>Sod2</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8909	CG8909	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8913	<i>Irc</i>	1	neg.	pos.	0	3.6	nd
CG8915	CG8915	1	neg.	pos.	0	0	0
CG8952	CG8952	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8954	<i>Smg5</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8967	<i>otk</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd

CG8985	<i>DmsR-1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG8989	<i>His3.3B</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9107	CG9107	1	pos.	pos.	7.3	2.5	8.8
CG9114	CG9114	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9156	<i>Pp1-13C</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9172	CG9172	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9181	<i>Ptp61F</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9186	CG9186	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9196	<i>spz6</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9204	<i>Ate1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9210	<i>Ac13E</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9262	<i>Shal</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9279	CG9279	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9299	<i>Cpr76Bd</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9305	CG9305	1	pos.	pos.	13.9	7.7	leth
CG9311	<i>mop</i>	1	pos.	neg.	1.7	0	2
CG9327	<i>Pros29</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9335	CG9335	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9356	CG9356	1	neg.	pos.	0	1.3	0
CG9381	<i>mura</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9386	CG9386	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9391	CG9391	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9396	CG9396	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9415	<i>Xbp1</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9433	<i>Xpd</i>	2	pos.	neg.	0	0	12.3
CG9441	<i>Pu</i>	2	pos.	neg.	3.2	0	22
CG9471	CG9471	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9484	<i>hyd</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9509	CG9509	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9533	<i>rut</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9564	<i>Try29F</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9565	<i>Nep3</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9568	CG9568	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9579	<i>AnnX</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9588	CG9588	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9589	CG9589	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9602	CG9602	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9611	<i>f-cup</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9640	CG9640	2	neg.	pos.	0	0	0

CG9641	CG9641	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9663	CG9663	2	pos.	pos.	31	0	0.9
CG9664	CG9664	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9672	CG9672	2	pos.	neg.	0	0	1.2
CG9673	CG9673	1	neg.	pos.	0	0	0
CG9675	<i>spheroide</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9676	CG9676	1	pos.	pos.	2.1	0	0
CG9680	<i>Dbp73D</i>	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9722	CG9722	1	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9737	CG9737	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9738	<i>Mkk4</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9745	<i>D1</i>	1	pos.	pos.	0	0	26.5
CG9749	<i>Abi</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9774	<i>Lectin-galC1</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9774	<i>rok</i>	2	neg.	neg.	nd	nd	nd
CG9784	CG9784	1	pos.	neg.	0	0	0
CG9805	<i>eIF3-S10</i>	2	pos.	pos.	4.3	1.7	0
CG9853	CG9853	1	pos.	neg.	8.4	0	23.1
CG9952	<i>ppa</i>	1	pos.	neg.	0	0	0
CG9987	CG9987	1	neg.	neg.	nd	nd	nd

**Additional Table S2****Validation of candidates with secondary UAS-dsRNA lines**

CG	SYMBOL	primary UAS-dsRNA					secondary UAS-dsRNA					primary / secondary
		S19	OTE	<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>	S19	OTE	<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>	
CG6311	<i>Ecd3</i>	0.7	>20	20.5	4	100	0.97	3	0	0	0	NO
CG12276	<i>Aos1</i>	1	0	0	10	56.4	1	0	1.9	21.6	22.9	OV
CG31256	<i>Brf</i>	1	0	15.6	3.6	50.7	1	2	14.7	2	34.5	NO
CG12653	<i>btd</i>	0.34	>20	37.3	0	leth.	0.94	8	2.5	0	0	NO
CG5848	<i>cact</i>	0.98	4	12	4.4	25.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
CG10362	CG10362	1	0	6	0	3.7	1	0	1.2	0	0	NO
CG11837	CG11837	1	0	5	0	84.1	1	0	0	0	11.7	NO
CG12661	CG12661	1	1	2.5	9	54.5	1	1	0	0	0	OV
CG12772	CG12772	0.55	>20	14	0	75	1	1	0	0	0	NO
CG12870	CG34362	0.34	>20	30	0	65.2	1	0	2.7	0	5.5	NO
CG14100	CG14100	1	0	8	2.4	3.6	1	0	0	0	0	OV
CG14230	CG14230	1	0	5	2.9	70.7	0.99	2	4.2	4.7	72	NO
CG14512	CG14512	1	0	5.6	0	13.2	1	0	4	0	22.8	OV
CG15247	CG15247	0.6	>20	1.4	3.6	13.3	0.96	8	0	0	0	OV
CG15314	CG15314	0.84	14	12.3	1.9	leth.	1	0	0	1.6	2	OV

CG15347	CG15347	1	0	0	0	11.1	1	0	0	0	0	OV
CG15784	CG15784	0.93	10	7.5	6	0	0.92	7	15.4	5.5	2.9	OV
CG17331	CG17331	1	0	40	4	leth.	1	0	70.5	9.2	leth.	OV
CG17646	CG17646	0.99	1	0	0	53.2	1	0	0	0	0	NO
CG1832	CG1832	0.84	>20	21	7.7	9.3	1	1	0	0	0	NO
CG1924	CG1924	0.63	2	8	0	3.2	0.95	2	0	0	0	NO
CG2010	CG2010	0.95	>20	5.6	0	5.9	1	0	0	1.9	0	OV
CG30156	CG30156	0.99	2	3.5	0	57.7	1	0	0	1.9	1.7	OV
CG31044	CG31044	0.66	>20	13.6	0	1.8	0.15	465	45.9	0	68.2	OV
CG5086	CG32767	0.42	>20	40	1.8	leth.	0.88	20	2.4	2.6	0	NO
CG4407	CG4407	1	0	30	2	19	1	0	8.6	5	52.3	NO
CG4707	CG4707	1	1	0	1.2	9.7	1	0	0	1.8	0	OV
CG5222	CG5222	1	0	3.9	0	18.5	1	1	11.5	0	0	NO
CG6197	CG6197	1	0	45	0	leth.	1	0	31.3	6	100	NO
CG6322	CG6322	1	0	4.5	5	37.1	1	0	50	3.3	leth.	NO
CG7033	CG7033	1	2	39	1.4	2	0.98	3	60.8	0	84.4	NO
CG7757	CG7757	0.99	1	50.8	6	leth.	1	0	32	5.4	58.8	NO
CG7845	CG7845	1	1	3.6	0	48.6	1	0	11.6	5.4	leth.	NO
CG8444	CG8444	1	2	3	0	10	0.99	1	2	0	13.5	OV

CG8878	CG8878	1	1	12.2	0	3.9	1	0	0	0	0	NO
CG9107	CG9107	1	0	7.3	2.5	8.8	1	0	29.6	3.5	18.3	NO
CG9305	CG9305	0.94	11	13.9	7.7	leth.	0.99	1	18	3.1	5.1	NO
CG9663	CG9663	1	0	31	0	0.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
CG9853	CG9853	1	1	8.4	0	23.1	1	1	1.9	2	2.1	OV
CG15349	<i>Cp7Fa</i>	0.95	13	10.3	0	leth.	0.94	13	17.7	0	25	OV
CG3889	<i>CSN1b</i>	1	0	10.3	3.6	3.8	1	1	6	4.9	3.6	NO
CG8711	<i>cul-4</i>	1	2	46	39.4	77.1	1	0	32.1	0	91.4	NO
CG6292	<i>CycT</i>	1	0	33.3	0	10	1	0	3.4	0	2.1	OV
CG9745	<i>DI</i>	0.99	1	0	0	26.5	1	0	0	3.7	0	NO
CG2048	<i>dco</i>	0.94	4	8.9	0	51.4	0.91	15	0	0	0	NO
CG5838	<i>Dref</i>	1	0	13.6	2.5	100	1	0	17.4	15.4	100	OV
CG10846	<i>dyn-p25</i>	1	1	2.8	5	0	1	1	0	0	0	OV
CG15410	<i>E23</i>	0.3	18	13.1	11.4	27.6	0.99	1	0	0	0	NO
CG11901	<i>Ej1gamma</i>	1	1	17.2	0	leth.	0.99	2	95.2	0	17	NO
CG1873	<i>Ej1alpha100E</i>	0.98	1	9.5	2.5	18.4	0.98	1	5.4	0	10	OV
CG5605	<i>eRF1</i>	1	1	15.9	0	16.7	1	1	32	0	leth.	NO
CG10033	<i>for</i>	0.94	2	0	0	16.5	1	0	20.5	4.3	leth.	NO
CG4396	<i>fine</i>	1	0	25	1.5	10.8	1	0	3.2	2	20	OV

CG2522	<i>Gfp-bp</i>	1	0	18	21.4	leth.	1	0	0	0	85.7	NO
CG31359	<i>Hsp70Bb</i>	0.25	8	7.1	7.6	leth.	0.75	3	0	0	0	NO
CG6489	<i>Hsp70Bc</i>	0.2	9	26.4	15.5	68.1	0.67	5	27.9	7.5	13.9	NO
CG11990	<i>hyx</i>	1	0	55	8.3	7.7	1	0	63.8	18.8	39.1	NO
CG18039	<i>KaiRIA</i>	1	0	2	8	6.8	0.97	2	0	0	0.9	NO
CG5649	<i>kin17</i>	1	1	30	1.3	1.3	1	1	0	2.7	1.8	OV
CG1994	<i>l(1)G0020</i>	1	1	12	0	17.5	0.99	1	0	0	21.8	NO
CG11295	<i>l(2)dil</i>	1	0	4	11.3	23.6	0.98	5	0	5	7.7	NO
CG3354	<i>Mst77F</i>	1	0	0	4.7	26.9	0.72	1	3.4	0	0	OV
CG16973	<i>msn</i>	0.97	8	4	0	31.6	1	0	0	0	0	NO
CG10603	<i>mRpL13</i>	0.79	1	4	12	36	1	0	5.5	32.5	100	OV
CG12954	<i>mRpL41</i>	1	1	0	0	83.6	1	1	5.4	8.4	97.6	OV
CG1577	<i>mRpL52</i>	1	0	1	5.2	86.8	1	0	2.6	0	100	OV
CG8470	<i>mRpS30</i>	1	2	0	7.1	94.3	1	0	5.8	8.2	97.8	NO
CG8025	<i>Mtr3</i>	1	2	12.5	0	21.7	1	0	11.5	3.7	41.7	OV
CG2286	<i>ND75</i>	1	0	8	5.2	92.9	1	0	4.3	16.3	76.7	NO
CG1857	<i>nec</i>	0.76	14	21.5	17.5	leth.	0.37	169	26.6	14.6	leth.	OV
CG12154	<i>oc</i>	0.7	>20	67	9.4	39.4	1	0	0	0	0	NO
CG10295	<i>Pak</i>	1	0	24	0	leth.	1	0	4	0	0	NO

CG5786	<i>ppan</i>	1	1	31.3	16	45.7	1	1	10.9	0	4.4	NO
CG18495	<i>CG18495</i>	1	0	26.7	4.8	leth.	0.98	3	1.6	0	0	OV
CG4904	<i>Pros35</i>	1	0	2.8	5	leth.	1	0	5.1	1.4	leth.	NO
CG5519	<i>Ptp19</i>	1	0	9.3	0	0	0.98	1	35.3	0	22.7	NO
CG9441	<i>Pu</i>	0.98	4	3.2	0	22	0.99	1	0	0	0	OV
CG13194	<i>pyr</i>	0.49	>20	28	0	1.8	0.11	220	22.9	5.2	0	NO
CG14999	<i>RfC4</i>	1	0	25.9	0	23	1	1	0	8.6	0	NO
CG5371	<i>RnrL</i>	1	0	0	0.9	19.8	1	0	3.9	0	5.6	NO
CG6846	<i>RpL26</i>	1	0	14.3	0	leth.	1	0	leth.	7.8	leth.	OV
CG11522	<i>RpL6</i>	1	0	4.8	6.7	0	1	1	leth.	5	leth.	NO
CG7014	<i>RpS5b</i>	1	0	8.2	3.6	0	0.99	1	20	3.9	10	OV
CG7885	<i>RpII33</i>	1	0	0	10	95	1	0	8	13.6	34.5	NO
CG11888	<i>Rpn2</i>	1	0	5	4	leth.	1	0	36.1	1.3	47.6	NO
CG4659	<i>Srp54k</i>	1	0	31.7	0	leth.	1	0	26.4	3.6	leth.	NO
CG11941	<i>shpC</i>	0.71	4	0	0	10.3	0.78	3	7.5	0	14.3	OV
CG12225	<i>Spt6</i>	0.99	2	32.1	1.4	41.4	1	0	92	82.7	leth.	NO
CG32211	<i>Taf6</i>	1	0	34.2	3	10.8	1	0	0	0	22.4	NO
CG11527	<i>Tig</i>	1	1	0	0	12.1	0.99	2	2.9	0	10	NO
CG6121	<i>Tip60</i>	1	0	14.3	0	1.8	1	0	0	0	0	OV

**Additional Table S2****Validation of candidates with secondary UAS-dsRNA lines**

CG	SYMBOL	primary UAS-dsRNA					secondary UAS-dsRNA					primary / secondary
		S19	OTE	<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>	S19	OTE	<i>srp-Gal4</i>	<i>hmlΔ-Gal4</i>	<i>cg-Gal4</i>	
CG6311	<i>Ecd3</i>	0.7	>20	20.5	4	100	0.97	3	0	0	0	NO
CG12276	<i>Aos1</i>	1	0	0	10	56.4	1	0	1.9	21.6	22.9	OV
CG31256	<i>Brf</i>	1	0	15.6	3.6	50.7	1	2	14.7	2	34.5	NO
CG12653	<i>btd</i>	0.34	>20	37.3	0	leth.	0.94	8	2.5	0	0	NO
CG5848	<i>cact</i>	0.98	4	12	4.4	25.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
CG10362	CG10362	1	0	6	0	3.7	1	0	1.2	0	0	NO
CG11837	CG11837	1	0	5	0	84.1	1	0	0	0	11.7	NO
CG12661	CG12661	1	1	2.5	9	54.5	1	1	0	0	0	OV
CG12772	CG12772	0.55	>20	14	0	75	1	1	0	0	0	NO
CG12870	CG34362	0.34	>20	30	0	65.2	1	0	2.7	0	5.5	NO
CG14100	CG14100	1	0	8	2.4	3.6	1	0	0	0	0	OV
CG14230	CG14230	1	0	5	2.9	70.7	0.99	2	4.2	4.7	72	NO
CG14512	CG14512	1	0	5.6	0	13.2	1	0	4	0	22.8	OV
CG15247	CG15247	0.6	>20	1.4	3.6	13.3	0.96	8	0	0	0	OV
CG15314	CG15314	0.84	14	12.3	1.9	leth.	1	0	0	1.6	2	OV

Additional Table S3

## List of confirmed melanotic suppressor genes

CG	NAME	SYMBOL	inferred function	other information
CG12276	<i>Aos1</i>	<i>Aos1</i>	Ubiquitin activating enzyme; Toll signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>Aos1<sup>c06048</sup></i> )
CG14512	<i>Asparagine-linked glycosylation 13</i>	<i>Alg13</i>	UDP-GlcNAc transferase; protein sorting	
CG8444	<i>ATP6AP2</i>	<i>ATP6AP2</i>	vacuolar H(+)-ATPase, putative receptor; signaling	
CG9305	<i>B double prime 1</i>	<i>Bdp1</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG31256	<i>Brf</i>	<i>Brf</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG5848	<i>cactus</i>	<i>cact</i>	inhibitor of NF- $\kappa$ B transcription factors; Toll signalling, immune response	known as melanotic tumor suppressor [32]
CG7033	<i>Cct2</i>	<i>Cct2</i>	chaperonin-containing T-complex; protein folding	
CG15784	CG15784	CG15784	unknown	
CG31044	CG31044	CG31044	unknown	
CG7845	CG7845	CG7845	putative pre-ribosomal particle constituent; ribosome assembly?	
CG15349	<i>Chorion protein a at 7F</i>	<i>Cp7Fa</i>	unknown	
CG3889	<i>COP9 complex homolog subunit 1 b</i>	<i>CSN1b</i>	COP9 signalosome; protein degradation	partner of known melanotic tumor suppressors ( <i>CSN5</i> [43]; <i>CSN8</i> [44])
CG8711	<i>cullin-4</i>	<i>cul-4</i>	ubiquitin-protein ligase; protein degradation, transcription, DNA repair	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])

A. Avet-Rochex *et al.*

CG11837	<i>Dimethyladenosine transferase 1</i>	<i>Dim1</i>	ribosomal RNA processing	
CG5838	<i>DNA replication-related element factor</i>	<i>Dref</i>	transcription factor; transcription	known as melanotic tumor suppressor [39]
CG11901	<i>Ef1g</i>	<i>Ef1g</i>	translation elongation factor; translation	
CG1873	<i>Elongation factor 1a100E</i>	<i>Ef1a100E</i>	translation elongation factor; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Hsc70-4</i> [45])
CG5605	<i>eukaryotic release factor 1</i>	<i>eRF1</i>	translation termination factor; translation	
CG4407	<i>Flavin adenine dinucleotide synthetase 1</i>	<i>Fad1</i>	mitochondrial respiratory chain; ATP synthesis	
CG10033	<i>foraging</i>	<i>for</i>	cGMP-dependent kinase; signaling	
CG4396	<i>found in neurons</i>	<i>fne</i>	RNA splicing	
CG2522	<i>GTP-binding protein</i>	<i>Gtp-bp</i>	signal recognition particle receptor; protein targeting	
CG6489	<i>Heat-shock-protein-70Bc</i>	<i>Hsp70Bc</i>	chaperon; protein folding	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Hsc70-4</i> [45])
CG11990	<i>hyrax</i>	<i>hyx</i>	Paf1 complex component; elongation of transcription	
CG5222	<i>Ints9</i>	<i>Ints9</i>	integrator complex subunit; transcription, RNA processing	
CG1994	<i>lethal (1) G0020</i>	<i>l(1)G0020</i>	N-acetyltransferase; ribosomal constituent processing	
CG11295	<i>lethal-(2)-denticleless</i>	<i>l(2)dtl</i>	response to DNA damage; DNA replication	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])
CG10603	<i>mitochondrial ribosomal protein L13</i>	<i>mRpL13</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG12954	<i>mitochondrial ribosomal protein L41</i>	<i>mRpL41</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])

A. Avet-Rochex *et al.*

CG1577	<i>mitochondrial ribosomal protein L52</i>	<i>mRpL52</i>	mitochondrial large ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG8470	<i>mitochondrial ribosomal protein S30</i>	<i>mRpS30</i>	mitochondrial small ribosomal subunit; translation	partner of a known melanotic tumor suppressor ( <i>mRpL55</i> [42])
CG8025	<i>Mtr3</i>	<i>Mtr3</i>	exosome component; RNA processing	
CG2286	<i>NADH:ubiquinone reductase 75kD subunit precursor</i>	<i>ND75</i>	mitochondrial respiratory chain complex; ATP synthesis	lymph-gland driven dsRNA induces lamellocyte formation [37]
CG1857	<i>necrotic</i>	<i>nec</i>	serine-type endopeptidase inhibitor; Toll signalling, immune response	
CG14230	<i>Nucleolar protein 8</i>	<i>NoI8</i>	ribosomal RNA processing	
CG5786	<i>peter pan</i>	<i>ppan</i>	pre-ribosomal particles constituent; ribosome assembly	
CG4904	<i>Proteasome 35kD subunit</i>	<i>Pros35</i>	proteasome component; protein degradation	
CG17331	<i>Proteasome subunit, beta type, 2</i>	<i>Psmb2</i>	proteasome component; protein degradation	
CG5519	<i>Prp19 (GTP-binding-protein)</i>	<i>Prp19 (Gbp)</i>	RNA splicing	
CG7757	<i>Prp3</i>	<i>Prp3</i>	RNA splicing	
CG6322	<i>Prp4</i>	<i>Prp4</i>	RNA splicing	
CG13194	<i>pyramus</i>	<i>pyr</i>	cytokine; fibroblast growth factor receptor signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>pyr<sup>MB02808</sup></i> )
CG14999	<i>Replication factor C subunit 4</i>	<i>RfC4</i>	replication factor C component; DNA replication	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>RfC1</i> [46]); zygotic mutations associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>RfC4<sup>B6</sup>;RfC4<sup>B6</sup>/RfC4<sup>A118</sup></i> )
CG5371	<i>Ribonucleoside diphosphate reductase large subunit</i>	<i>RnrL</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase complex; DNA replication	

Additional Table S3

## List of confirmed melanotic suppressor genes

CG	NAME	SYMBOL	inferred function	other information
CG12276	<i>Aos1</i>	<i>Aos1</i>	Ubiquitin activating enzyme; Toll signaling	zygotic mutation associated to melanotic masses and lamellocytes ( <i>Aos1<sup>c06048</sup></i> )
CG14512	<i>Asparagine-linked glycosylation 13</i>	<i>Alg13</i>	UDP-GlcNAc transferase; protein sorting	
CG8444	<i>ATP6AP2</i>	<i>ATP6AP2</i>	vacuolar H(+)-ATPase, putative receptor; signaling	
CG9305	<i>B double prime 1</i>	<i>Bdp1</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG31256	<i>Brf</i>	<i>Brf</i>	TFIIIB subunit; transcription	
CG5848	<i>cactus</i>	<i>cact</i>	inhibitor of NF-κB transcription factors; Toll signalling, immune response	known as melanotic tumor suppressor [32]
CG7033	<i>Cct2</i>	<i>Cct2</i>	chaperonin-containing T-complex; protein folding	
CG15784	CG15784	CG15784	unknown	
CG31044	CG31044	CG31044	unknown	
CG7845	CG7845	CG7845	putative pre-ribosomal particle constituent; ribosome assembly?	
CG15349	<i>Chorion protein a at 7F</i>	<i>Cp7Fa</i>	unknown	
CG3889	<i>COP9 complex homolog subunit 1 b</i>	<i>CSN1b</i>	COP9 signalosome; protein degradation	partner of known melanotic tumor suppressors ( <i>CSN5</i> [43]; <i>CSN8</i> [44])
CG8711	<i>cullin-4</i>	<i>cul-4</i>	ubiquitin-protein ligase; protein degradation, transcription, DNA repair	partner of known melanotic tumor suppressor ( <i>Ddb1</i> [47])