

**INSTITUT DE GENETIQUE ET DE BIOLOGIE
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

CNRS-INSERM-ULP

B.P. 10142

67404 ILLKIRCH CEDEX

THESE

Présentée par

Yannick BECK

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis PASTEUR de STRASBOURG

Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Sujet de thèse :

**"Le rôle de *Krüppel-homolog* au cours de l'embryogenèse et de la
métamorphose de *Drosophila melanogaster*"**

Soutenue le 25 novembre 2003

devant la commission d'examen composée de Messieurs :

REICHHART J.M.	(Strasbourg)	Rapporteur
MECHLER B.	(Heidelberg)	Rapporteur
LEPESANT J.A.	(Paris)	Rapporteur
RICHARDS G.	(Strasbourg)	Directeur de thèse

Je tiens à remercier ici Messieurs Chambon et Mandel qui m'ont permis de profiter de l'excellent environnement intellectuel et technique qu'offre l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Je les remercie également de m'avoir permis de terminer cette étude dans les meilleures conditions.

Je voudrais témoigner mon plus grand respect à Geoff Richards qui tout au long de ces années m'a patiemment guidé tout en essayant de me faire partager sa rigueur et son honnêteté dans le travail et qui d'une façon générale a fait beaucoup plus que ce qu'un étudiant est en droit d'attendre de son directeur de thèse.

Je remercie Monsieur Reichhart d'avoir accepté de présider le jury de thèse ainsi que Messieurs Lepesant et Mechler d'avoir accepté de faire partie de ce jury et juger mon travail.

Bien entendu tout ce travail aurait certainement été très différent sans la présence de Claude Dauer qui a partagé avec moi ses excellentes compétences techniques, sa bonne humeur, son humour, ses morceaux de cartons de vieilles boîtes de mouchoirs, ses crayons de papier plus qu'usés, mais qui, lorsqu'on y pense, n'est certainement pas une "beisie frau"!

Je veux aussi rappeler l'excellent travail de mon prédécesseur Frédéric Pécasse qui a largement ouvert la voie.

Je tiens à exprimer ma gratitude à l'Association pour la Recherche contre le Cancer qui a financé une partie de ce travail et permis ainsi qu'il ne se termine pas trop tôt.

Je souhaite également mettre en lumière le travail quotidien des hommes et des femmes qui assurent les services communs de l'IGBMC, parmi lesquelles les services de séquençage et de synthèse d'oligonucléotides, le service informatique, et celui de fabrication du milieu pour les mouches. Je salue également Anne Gansmüller pour son travail en microscopie électronique, Didier Hentsch, Jean-Luc Vonesch et Marcel Boeglin qui m'ont permis d'utiliser au mieux le microscope confocal, Mustapha Oulad-Abdelghani et Gilles Duval pour leur participation active dans l'élaboration des différents anticorps anti KR-H.

Je remercie Angela Giangrande et son équipe pour leurs conseils et le partage de nombreux anticorps. Je remercie également Krzysztof Jagla de m'avoir initié à l'étude de l'embryogenèse chez la drosophile et je n'oublie pas Pascal Heitzler pour ses précieux conseils en génétique.

Et comme tout ne se passe pas au labo ...

Je remercie infiniment Annette et Daniel, mes parents, qui ont permis que tout cela se réalise, qui y ont toujours cru (peut-être même plus que moi parfois!) et qui ont toujours été là pour m'encourager.

Je n'oublie pas Roger, mon grand-père, qui attend avec impatience de pouvoir enfin voir ce que j'ai bien pu faire pendant tout ce temps !

Merci à Ophélie, parce qu'un peu d'animation de temps en temps ça ne fait pas de mal (mais bon, pas trop tout de même !)

Une pensée particulière pour Emrys, qui n'est pas encore arrivé mais qui le sera certainement le jour de la soutenance !

Sandra, comment pourrais-je te remercier, tant au cours de ces années de thèse tu m'as encouragé, motivé, réconforté et supporté (dans tous les sens du terme !). Bref, tu étais là quand j'en avais besoin, comme toujours. Ce travail c'est un peu le tien aussi.

Et enfin, parce qu'il y a une vie après le labo, je salue pêle-mêle: Jérôme, Aurélie et Yannick mais aussi Arnaud, Dom, Emmanuel, Emmanuelle, Gwenn, Isabelle, Marie-Anne, Olivier, Patrice, Rachel, Régis, Roger, Sandrine, Sébastien et tant d'autres... .

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
INTRODUCTION	8
I. Le modèle drosophile	9
A. La place de la drosophile dans l'histoire de la biologie moléculaire.....	9
B. Biologie et cycle de vie.....	13
1. L'embryogenèse.....	15
2. Le développement larvaire.....	18
3. La métamorphose.....	19
C. Les principaux outils génétiques disponibles chez la drosophile.....	21
1. Les chromosomes polytènes.....	21
a. Description.....	21
b. Visualisation de l'activité génique.....	22
c. L'hybridation <i>in situ</i>	24
d. L'immuno-histochimie.....	24
2. L'élément P et ses applications.....	25
a. Description de l'élément P.....	25
b. Mutagenèse.....	26
c. Autres applications de l'élément P.....	26
3. Les chromosomes "balancers".....	27
D. La séquence génomique de la drosophile.....	28
1. Historique du séquençage.....	28
2. Les principales observations.....	31
II. La neurogenèse chez la drosophile	35
A. La formation du més ectoderme.....	37
B. La formation du neuroectoderme.....	37
C. La formation des groupes de cellules proneurales.....	38

D. La formation des neuroblastes.....	39
E. La formation des neurones.....	41
III. La régulation hormonale chez la drosophile.....	42
A. Historique de la mise en évidence du rôle des hormones.....	42
B. Schéma général de la voie de synthèse de l'ecdysone.....	42
C. Le récepteur de l'ecdysone.....	45
D. L'action de l'ecdysone dans la glande salivaire au cours des réponses hormonales de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal.....	46
1. La réponse à l'ecdysone dans la glande salivaire: l'étude des "puffs".....	46
2. Description générale d'une réponse hormonale.....	48
a. Les principaux transcrits précoces.....	48
b. Les principaux transcrits précoces- tardifs.....	51
c. Les principaux transcrits tardifs.....	51
d. Les principaux transcrits d'intermue.....	51
3. Aperçu de la régulation des réponses à l'ecdysone dans la glande salivaire au cours de la métamorphose.....	52
a. La réponse hormonale de fin de troisième larvaire.....	52
b. La réponse hormonale de fin de stade prépupal.....	53
E. La mise en évidence de <i>Krüppel-homolog</i>	55
IV. La mort cellulaire programmée chez la drosophile.....	55
A. Les différents types de mort cellulaire.....	55
1. Généralités.....	55

2. L'apoptose.....	56
3. L'autophagie.....	57
4. La mort cellulaire non lysosomale.....	57
5. La nécrose.....	58
B. La destruction des glandes salivaires.....	58
RESULTATS.....	63
CHAPITRE I.....	64
<i>Krüppel-homolog</i> , a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for <i>Drosophila</i> metamorphosis.....	65
Données complémentaires.....	81
Introduction.....	81
Résultats.....	81
Conclusions et discussion.....	84
Matériels et méthodes	85
CHAPITRE II.....	86
<i>Krüppel-homolog</i> is essential for the co-ordination of regulatory gene hierarchies in early <i>Drosophila</i> development.....	87
Abstract.....	89
Introduction.....	90
Results.....	92
The <i>Kr-h</i> locus: transcripts and mutant alleles.....	92
Genetic and developmental studies of early <i>Kr-h</i> mutants.....	93
Expression of <i>Kr-h</i> transcripts during embryogenesis in relation to known ecdysone-regulated transcripts: an embryonic regulatory hierarchy?.....	96
Transcripts analyses of <i>Kr-h</i> mutant embryos.....	97

Transcripts in first instar wild type and dying <i>Df(2L)Kr-h7.1</i> larvae.....	101
<i>Kr-h</i> transcripts are localised to the nervous system.....	103
KR-H is restricted to neural cells.....	104
Discussion.....	106
Gene regulatory hierarchies are variants on a common theme.....	106
<i>Krüppel-homolog</i> is essential for early development.....	108
<i>Krüppel-homolog</i> is a dose dependant modulator of regulatory hierarchies.....	108
Materials and methods.....	111
Acknowledgements.....	115
References.....	115
Données complémentaires.....	121
Introduction.....	121
Résultats.....	121
Discussion.....	123
Matériels et méthodes.....	125
CHAPITRE III	126
Dynamic localisation of KR-H during an ecdysone response in <i>Drosophila</i>	127
Abstract.....	129
Introduction.....	129
Materials and methods.....	131
Results.....	133
KR-H expression is ubiquitous at the onset of metamorphosis.....	133
Salivary gland KR-H expression is dynamic during the late larval and prepupal ecdysone responses.....	135

KR-H localisation to polytene chromosome bands evolves during the ecdysone response.....	136
Discussion.....	139
Localisation and levels of KR-H in early metamorphosis.....	139
<i>Kr-h</i> distribution is dynamic in salivary glands during the late larval ecdysone response.....	140
Autoregulation and crosstalk in the ecdysone hierarchies.....	142
Acknowledgements.....	142
References.....	143
CHAPITRE IV.....	145
<i>Kr-h</i> au cours du stade pupal de la drosophile.....	146
Introduction.....	146
Résultats.....	147
Expériences de sauvetage: utilisation d'un transgène <i>Kr-hα</i> sous contrôle d'un promoteur thermosensible.....	147
Expression de <i>Kr-h</i> et des principaux transcrits régulés par l'ecdysone au cours du stade pupal.....	150
Discussion.....	153
Matériels et méthodes.....	156
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	159
I. Le mécanisme d'action de <i>Kr-h</i>.....	160
II. La régulation de <i>Kr-h</i>.....	163
III. Le rôle de <i>Kr-h</i>.....	164
IV. Conclusion générale.....	166
REFERENCES.....	168

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le modèle drosophile.

A. La place de la drosophile dans l'histoire de la biologie moléculaire.

C'est en 1910, avec les travaux de Morgan, que la drosophile fait sa grande entrée dans la recherche biologique en tant qu'animal modèle. C'est à cette date que, grâce à la drosophile, pour la première fois, on fait le lien entre caractère et chromosome. En effet, Morgan dans une de ses cultures de drosophiles remarque un mâle aux yeux blancs alors que normalement la drosophile a les yeux rouges. En accomplissant une série de croisements, Morgan parvient alors à démontrer que ce trait est lié au chromosome sexuel X (Morgan, 1910).

Cette découverte arrive 45 ans après que le moine Grégor Mendel formule pour la première fois, en 1865, ses lois sur l'hérédité (Mendel, 1865). Mendel, quant à lui, observait la transmission de différents caractères du pois comme la forme, la coloration de la graine ou la taille des tiges au travers de très nombreux croisements. Grâce à cela, il déduit que des caractères donnés (on ne parle pas encore de gènes) se transmettent selon trois principes ou lois: la loi d'uniformité, celle de disjonction et celle d'indépendance. A cette époque, on ne connaît rien du support de l'hérédité.

C'est en 1869 qu'à partir de noyaux de globules blancs, le suisse Miescher isole une molécule qu'il nomme logiquement nucléine (Miescher, 1871). Miescher montre que la nucléine contient du phosphore, ce qui est quelque chose de nouveau pour une molécule biologique. D'autres analyses montreront que la nucléine contient aussi un sucre, le désoxyribose et que c'est une molécule acide, on la rebaptise alors plus tard: acide désoxyribonucléique ou ADN. Cependant, le rôle et la structure de cette molécule restent inconnus.

Les premiers chromosomes, que l'on nomme ainsi du fait de leur affinité pour les colorants, sont observés en 1873. On ne fait pas le lien avec l'ADN mais leur comportement laisse supposer qu'ils pourraient avoir un rôle dans la division cellulaire. Si certains tissus de la drosophile possèdent des chromosomes géants, c'est cependant dans la larve de chironome qu'ils sont d'abord observés en 1881 par Balbiani (Balbiani, 1881).

Ce n'est qu'au tout début du XX^{ème} siècle que, indépendamment, Boverie et Sutton proposent que ces chromosomes pourraient être le véhicule de l'hérédité. C'est donc un peu

moins de dix ans plus tard que Morgan grâce à ses premiers croisements avec la drosophile prouve qu'effectivement un gène (ou un caractère) est lié à un chromosome. Cette expérience va propulser la drosophile comme modèle de choix pour cette nouvelle discipline qu'est la génétique et qui va susciter un attrait sans cesse grandissant. Morgan se lance alors dans un énorme travail de cartographie de ces chromosomes. En 1915 avec trois de ses étudiants, Sturtevant, Muller et Bridges, il publie dans "The mechanism of mendelian heredity" les premières cartes des chromosomes X, 2, 3 et 4 (Figure 1).

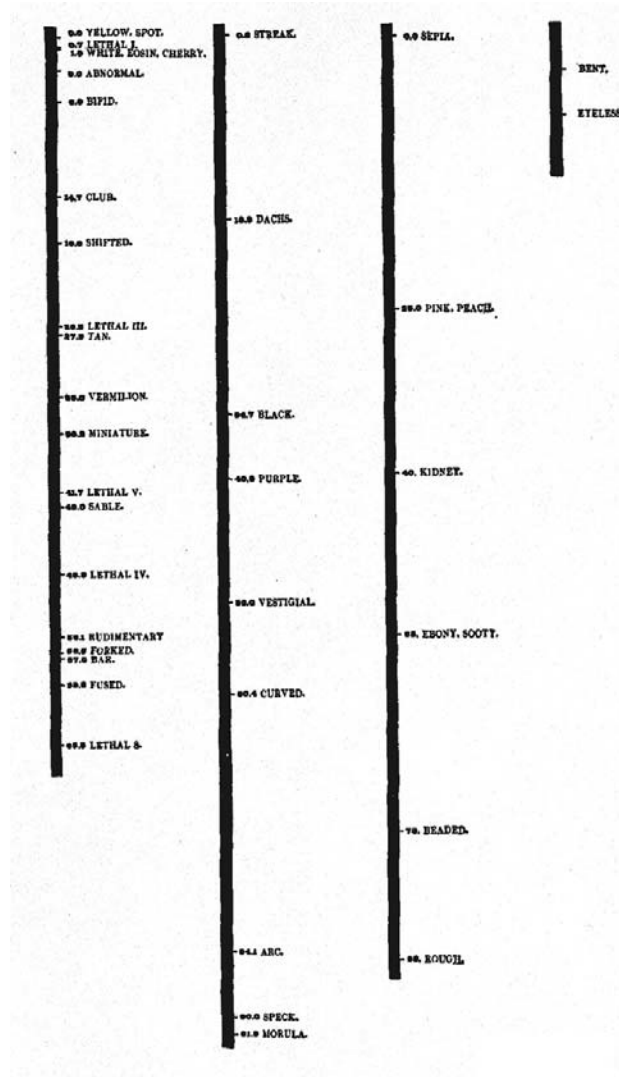


Figure 1. Cartes génomiques originales des chromosomes de la drosophile proposées par Morgan *et al.* en 1915. De gauche à droite, le chromosome X comporte 19 marqueurs génétiques, le chromosome 2 en a 9, le chromosome 3 en a 6 et le petit chromosome 4 comporte 2 marqueurs génétiques. (Morgan *et al.*, 1915)

1924 apporte une pierre importante dans ce qui deviendra la biologie moléculaire. En effet, Feulgen et Rössenbeck réussissent à montrer que les chromosomes comportent de l'ADN (Feulgen and Rössenbeck, 1924). Ce lien se fait plus de 50 ans après l'observation des premiers chromosomes et la découverte de l'ADN!

Le microbiologiste Griffith montre en 1928, dans une célèbre expérience mettant en jeu l'infection de souris par des pneumocoques, que certains caractères (ici la virulence) peuvent être transmis d'un virus mort vers un virus vivant (Griffith, 1928). Mais ce n'est qu'une quinzaine d'années plus tard qu'enfin Avery, Macleod et McCarty identifient la "substance" capable de transmettre ces caractères génétiques: c'est l'ADN (Avery *et al.*, 1944). Cette découverte est une énorme surprise car, jusque-là, on pensait plus ou moins intuitivement que de telles propriétés ne pouvaient être le fait que de protéines. Ainsi perce l'idée que les gènes sont constitués d'ADN.

Si l'on commence peu à peu à mieux connaître la fonction de l'ADN, on tâtonne encore un peu quant à la détermination de sa structure. Dans les années 30, les travaux d'Astbury utilisant la radiocristallographie suggèrent que l'ADN serait une molécule en forme de long filament. Astbury va également montrer que la molécule est une structure constituée d'une suite de bases alignées les unes après les autres avec un espacement de 0,34 nm entre elles. Pour l'étude des propriétés de l'ADN, Astbury utilise alors le terme de biologie moléculaire. En 1949, deux chercheurs Chargaff et Davidson montrent que l'ADN est constitué d'autant de thymines que d'adénines et d'autant de guanines que de cytosines. De nombreux modèles, intégrant les données que l'on obtient peu à peu, sont proposés pour expliquer la structure de la molécule. Et c'est finalement en 1953, que la structure en double hélice de l'ADN est proposée par Watson et Crick (Figure 2; Watson and Crick, 1953).

Ainsi au milieu des années 50, on connaît dans les grandes lignes la structure et la fonction de l'ADN. A cette époque on a donc d'un côté l'ADN, qui est le support de l'information génétique, et de l'autre côté les protéines, qui assurent pour l'essentiel les fonctions de la vie de la cellule. Cependant, il reste à faire le lien entre ses deux dogmes. Un premier pas est franchi en 1957 lorsque Hoagland identifie les ARN de transfert (ARNt).



Figure 2. Schéma original de la structure de l'ADN proposée par Watson et Crick en 1953 dans la revue Nature. Les deux flèches matérialisent le sens opposé des deux brins d'ADN formant une double hélice. (Watson and Crick, 1953)

Un an plus tard, le co-découvreur de la structure en double hélice de l'ADN, Crick, propose l'idée que l'information génétique contenue dans l'ADN serait transmise aux protéines. En 1960, une étape supplémentaire est atteinte lorsque Kornberg isole une enzyme capable de synthétiser de l'ADN à partir d'ADN: l'ADN polymérase (Kornberg, 1960). Grâce à cette découverte, les biologistes moléculaires vont être capables de construire *in vitro* de courtes séquences d'ADN des polynucléotides. A partir des années 60, différents travaux dont ceux de Gros, Jacob et Brenner permettent de mettre en évidence l'existence de l'acide ribonucléique messager (ARNm) qui est proposé pour être un intermédiaire instable entre les gènes et les protéines (Gros *et al.*, 1961; Brenner *et al.*, 1961). Un peu plus tard, Nirenberg parvient à produire *in vitro* des peptides (petites protéines) à partir d'ARN. Cela lui permet de mettre en évidence les séquences spécifiques d'ARN capables de coder spécifiquement la production de chaque acide aminé, montrant ainsi l'existence d'un véritable code génétique (voir Nirenberg, 1963 pour revue). Le lien entre ADN et protéine est fait.

La découverte en 1970 indépendamment par Temin et Baltimore d'une enzyme capable de synthétiser de l'ADN à partir d'ARN, la transcriptase inverse, va apporter un outil très important à toutes les études de biologie moléculaire (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). D'autre part, si l'on connaissait déjà l'existence d'enzymes capables de digérer (c'est à dire de découper) l'ADN, les travaux de Smith et d'Arber au début des années 70 permettent de purifier de nouvelles enzymes capables également de couper l'ADN, mais à des sites spécifiques cette fois (Kelly and Smith, 1970; Smith and Wilcox, 1970; Arber, 1974). Ces enzymes sont les endonucléases de restriction. Au fil des années, différentes équipes vont découvrir de plus en plus de ces enzymes. L'utilisation des enzymes de

restriction va elle aussi grandement faciliter les travaux de recherche sur l'ADN. A la fin des années 70, en 1977, Sanger au Royaume-Uni (Sanger *et al.*, 1977) et Gilbert aux Etats-Unis (Maxam and Gilbert, 1977) mettent au point chacun une technique capable de séquencer l'ADN. L'isolement d'une nouvelle ADN polymérase à partir d'une bactérie, *Thermophilus aquaticus*, fonctionnant à haute température, suivit de l'invention de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par Mullis en 1988, va encore considérablement accélérer les recherches et les perspectives des biologistes moléculaires (Saiki *et al.*, 1988).

C'est grâce à la mise en évidence des enzymes de restriction (permettant notamment le clonage), à la mise au point de la PCR et de méthodes de séquençage, que l'on peut alors envisager le séquençage de génomes entiers d'êtres vivants. Malgré tous ces nouveaux outils, la tâche s'avère immense. Pourtant dès 1995, la séquence complète d'*Haemophilus influenza*, une petite bactérie est publiée (Fleischmann *et al.*, 1995), un an plus tard, la séquence génomique du premier organisme eucaryote est disponible, c'est celle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En 1997, on déchiffre le génome de la bactérie "star" des laboratoires de recherche, *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997). Le premier organisme pluricellulaire à être entièrement séquencé est le petit nématode *Caenorhabditis elegans* en 1998 (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998). La publication en 2000 du génome de la drosophile, l'organisme sans doute le mieux connu du point de vue tant génétique que développemental, ouvre d'énormes perspectives quant à une meilleure compréhension des mécanismes de régulation et de développement des êtres vivants (Adams *et al.*, 2000). Enfin, c'est en 2001 qu'est publié le brouillon de travail du génome humain (International human genome sequencing consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001), près de 130 ans après la découverte de l'ADN par Miescher.

B. Biologie et cycle de vie.

La drosophile est un insecte de l'ordre des diptères, c'est à dire pourvue d'une seule paire d'ailes. C'est un animal holométabole, qui a par conséquent un développement indirect, passant par une phase larvaire de plusieurs jours avant de subir une métamorphose qui lui donnera sa forme adulte fertile. Le nom de drosophile vient du grec *drosos* qui signifie "rosée" et de *phila* "qui aime", la drosophile est donc textuellement la mouche qui aime la rosée. Plus couramment, la drosophile est aussi appelée mouche du vinaigre ou mouche du fruit, ces noms lui viennent du fait qu'elle est attirée par les matières animales ou végétales en voie de putréfaction ou de fermentation dégageant des odeurs d'alcool amylique, d'alcool éthylique, d'acide acétique ou d'acide lactique.

L'espèce *Drosophila melanogaster*, principalement utilisée dans les études de génétique et de biologie du développement, a été décrite la première fois par Meigen en 1830. *Drosophila melanogaster* est une espèce assez largement répandue dans le monde et sa répartition cosmopolite est sans doute liée pour beaucoup aux activités humaines et à l'accroissement du commerce (Lachaise *et al.*, 1988) qui lui ont permis de migrer sur de longues distances. Cependant, cette petite mouche d'environ 3mm de long préfère les régions chaudes du globe et vit principalement en Afrique de l'Ouest (Johnson, 1913). Johnson estime que *Drosophila melanogaster* fait son apparition sur le continent américain au début du XVIII^{ème} siècle et s'y répand largement dans les cents ans qui suivent. Dans les régions au climat plus tempéré, on la rencontre en été mais rarement en hiver. Le cycle de vie de la drosophile ne présentant pas de diapause se pose la question de savoir où elle passe l'hiver. La réponse à cette question n'est pas totalement résolue mais on pense qu'une certaine proportion des animaux pourrait passer l'hiver dans des constructions humaines chauffées comme des boulangeries ou dans des caves vinicoles.

Chez *Drosophila melanogaster*, la femelle pond directement ses œufs sur un milieu qui servira de substrat alimentaire aux larves qui en sortiront. La femelle peut pondre plusieurs centaines d'œufs au cours de sa vie. Suivant la qualité du substrat alimentaire et surtout de la température ambiante, la durée du développement des individus nouvellement pondus sera plus ou moins importante, par exemple à 25°C le développement se fera en environ 10 jours (Figure 3) tandis que si la température n'est que de 12°C, l'intégralité du développement s'étalera sur près de 50 jours (Ashburner and Thompson, 1978).

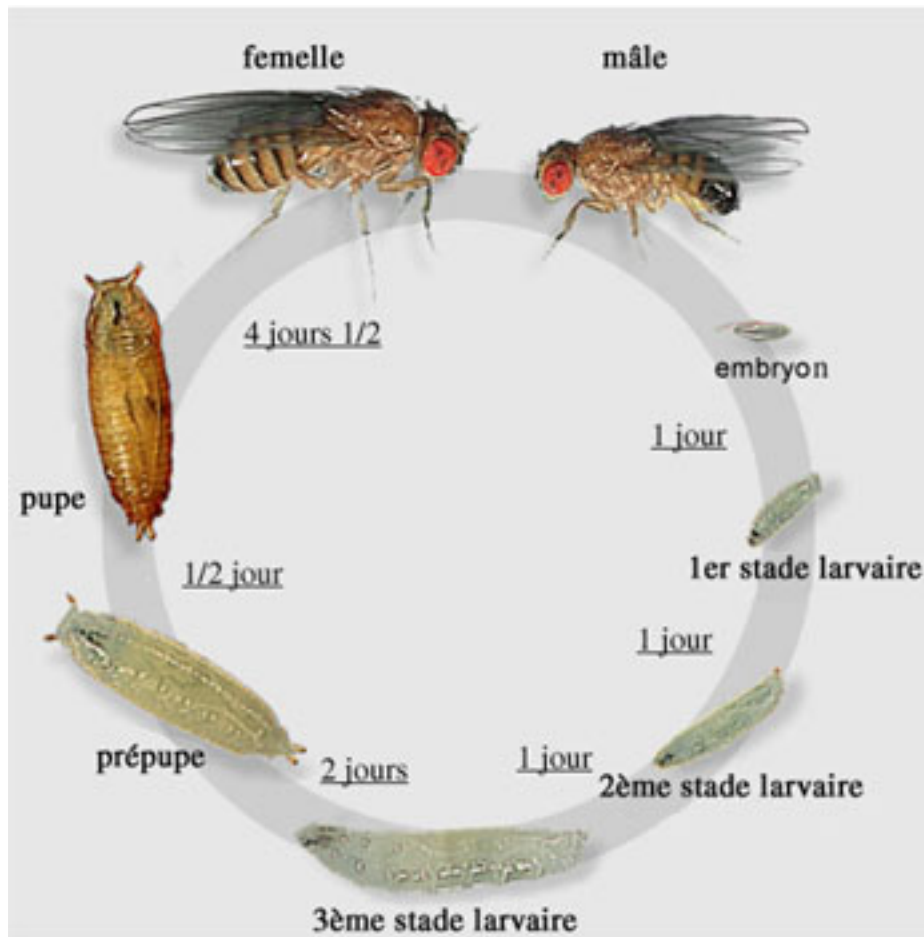


Figure 3. Le développement de la drosophile passe par sept stades, le stade embryonnaire, trois stades larvaires, le stade prépupal et le stade pupal qui précèdent le stade adulte. La durée de chaque stade indiqué est celle observée pour des animaux se développant à 25°C.

1. L'embryogenèse.

L'œuf pondu mesure un demi millimètre, c'est un œuf centrolécyste, c'est à dire que le vitellus qu'il contient (constitué de molécules énergétiques) est stocké en son centre. A 25°C, le développement embryonnaire dure autour de 24 heures. Campos-Ortega et Hartenstein (1985) décrivent très précisément les différents événements morphogénétiques qui se produisent au cours de l'embryogenèse de la drosophile. Les deux chercheurs divisent l'ensemble de ce processus continu en 17 stades.

Le développement embryonnaire débute par une série de dix divisions rapides du noyau issu de la fécondation au centre de l'œuf. On observe la formation du bourgeon polaire, composé des futures cellules germinales, à l'extrémité postérieure de l'œuf. Les noyaux vont ensuite migrer à la périphérie de l'œuf et s'y diviser encore trois fois. Pendant ces 13 divisions, les noyaux se divisent sans qu'il n'y ait formation de membranes cytoplasmiques, ce qui forme

un blastomère syncytial. La cellularisation ne débute que trois heures après la fécondation, on parle alors de blastoderme cellulaire. A ce stade, on compte entre 5 à 6000 noyaux.

On observe que les cellules à l'extrémité postérieure de l'embryon vont former une sorte de plateau sur lequel les cellules polaires, futures cellules germinales, vont adhérer (Figure 4A). Ce plateau va se déplacer peu à peu et se retrouver à l'horizontal. A partir de deux heures après la fécondation, on observe tout un ensemble de mouvements qui vont mettre en place les structures digestives de l'animal, c'est la gastrulation. Il y a tout d'abord invagination des cellules polaires et de la moitié de la partie ventrale (Figure 4B). Ce mouvement de cellules va conduire à la formation de l'ectoderme pour les cellules demeurant à la surface de l'embryon, tandis que les cellules qui se sont invaginées vont donner l'endoderme composant les rudiments antérieur et postérieur de l'intestin moyen, et le mésoderme.

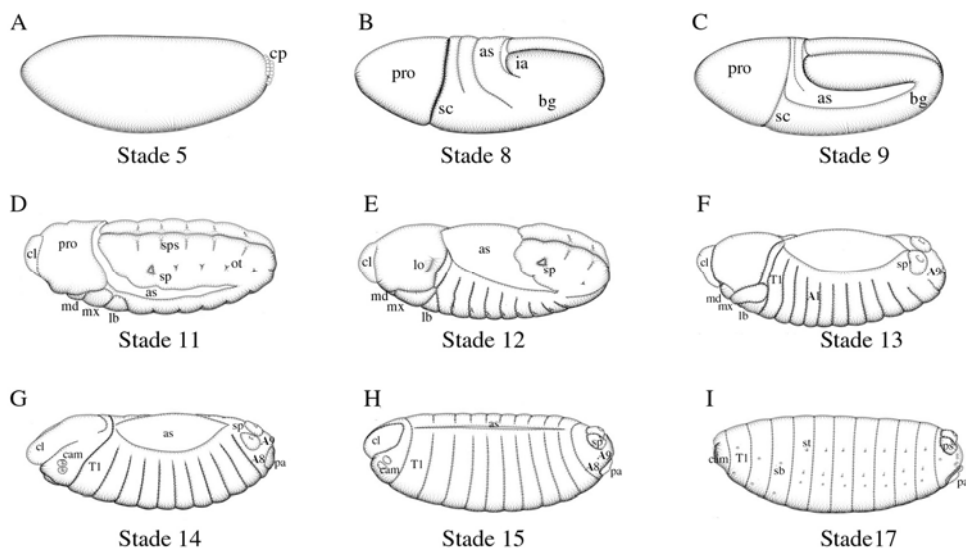


Figure 4. Le développement embryonnaire de la drosophile. Embryons de stade 5 (A), 8 (B), 9 (C), 11 (D), 12 (E), 13 (F), 14 (G), 15 (H) et 17 (I). A1, A8, A9: segments abdominaux 1, 8 et 9, as: amnioséreuse, bg: bande germinale, cam: complexe antenno-maxillaire, cp: cellules polaires, ia: invagination proctodéale, ot: orifices des trachées, pa: plaque anale, pro: procéphale, sb: soies basiconiques, sc: sillon céphalique, st: soies trichoïdes, T1: 1^{er} segment thoracique. Pour chaque figure, le côté antérieur se trouve à gauche et le côté dorsal en haut. (D'après Hartenstein, 1993)

Un phénomène important de l'embryogenèse débute 30 minutes plus tard, la bande germinale localisée ventralement va s'allonger rapidement (Figures 4B-D). Cette bande germinale comprend les tissus présomptifs de trois segments buccaux, de trois segments thoraciques et de neuf segments abdominaux et chaque segment a des constituants épidermiques, neuraux et mésodermiques. La bande germinale est placée à l'origine dans la partie ventrale de l'embryon et elle va s'allonger d'abord dans une direction postéro-dorsale

puis antéro-dorsale. Quarante minutes plus tard, on commence à percevoir que le tissu mésodermique de cette bande germinale présente des segmentations. A ce stade débute aussi la neurogenèse, deux populations de neuroblastes, les cellules progénitrices neurales, migrent à partir de l'ectoderme. Trois vagues successives vont donner trois sous-populations de neuroblastes. Ces cellules demeurent dans les régions neurogéniques de la bande germinale et migrent suivant un profil caractéristique. Ces neuroblastes vont par la suite se diviser pour produire les cellules mères des ganglions à l'origine des neurones et des cellules gliales.

Après l'extension rapide de la bande germinale, succède une phase plus lente de cette extension, qui va s'étaler sur une heure environ. Les deux heures qui vont suivre sont surtout marquées par une période de croissance avec apparition de sillons qui vont marquer la limite des différents segments au niveau de l'épiderme (Figure 4D). On observe également que la bande germinale stoppe son élongation pour au contraire débiter une période de raccourcissement (Figures 4E-F). Ce raccourcissement va aboutir à plusieurs mouvements morphogénétiques qui vont participer à la mise en place fonctionnelle des différentes structures de l'animal. Ainsi, la partie postérieure de l'intestin va se retrouver au pôle postérieur de l'animal. Les tissus primordiaux antérieur et postérieur de l'intestin moyen se déplacent l'un vers l'autre, formant deux bandes de cellules de chaque côté du vitellus qui demeure au centre de l'embryon. Ces deux bandes de tissus vont fusionner de chaque côté du sac vitellin. Entre le début du raccourcissement de la bande germinale et cet événement de fusion environ trois heures sont nécessaires.

La poursuite de la fermeture de l'intestin moyen se poursuit et dans le même temps commence l'involution de la tête, caractérisée par de nombreux et complexes mouvements morphogénétiques permettant la mise en place des différentes structures de la tête et des pièces buccales. Le raccourcissement de la bande germinale a laissé dans la partie dorsale une membrane, l'amnioséreuse, qui va peu à peu être recouverte par l'épiderme situé latéralement sur l'embryon et qui progresse dorsalement de chaque côté pour ensuite fusionner (Figures 4G-H). L'épiderme va ensuite se segmenter. A la fin de ce stade on observe aussi que l'intestin est complètement clos et qu'il englobe le sac vitellin qui va par la suite être digéré.

2. Le développement larvaire.

C'est une larve mobile et capable de se nourrir qui va sortir de l'œuf. L'animal va passer par trois stades larvaires et donc subir deux mues larvaires sous le contrôle de l'ecdysone et, par analogie avec d'autres insectes, de l'hormone juvénile (Ashburner, 1989). Au cours de ces stades, les cellules larvaires ne se divisent pas mais leur taille augmente dans des proportions très importantes (Roberts, 1986). On observe dans le même temps que dans certains tissus, l'ADN continue à se répliquer sans que les différents brins ne se séparent, aboutissant à la formation des chromosomes polytènes particulièrement visibles dans les glandes salivaires.

Si les cellules larvaires ne se divisent pas, par contre les cellules des disques imaginaux, destinés à former les structures adultes au cours de la métamorphose, elles, se divisent. On compte 19 disques imaginaux, il y a trois paires de disques qui vont participer à la mise en place de la tête, trois paires de disques destinés à la formation du thorax (avec notamment les ailes et les altères), trois autres paires qui donneront les pattes et enfin un disque génital (Figure 5).

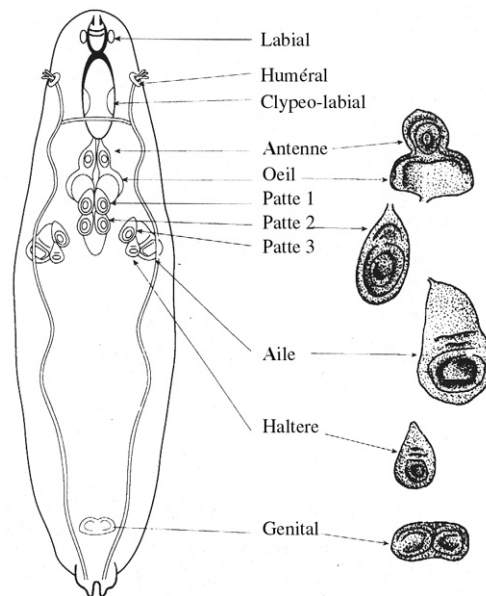


Figure 5. Emplacements approximatifs des disques imaginaux dans une larve de troisième stade larvaire vue du côté ventral et morphologie des principaux disques imaginaux. (D'après Fristrom and Fristrom, 1993)

Le premier stade larvaire à 25°C s'étale sur environ 24 heures. La larve commence à se nourrir dès son éclosion et va exploiter la surface du substrat. Le deuxième stade larvaire dure également 24 heures, la larve commence à creuser le milieu sur lequel elle se trouve. Le troisième et dernier stade larvaire dure quant à lui environ 48 heures, la larve creuse très activement le milieu. Environ 110 heures après la ponte, la larve de troisième stade cesse de

s'alimenter et se met à la recherche d'un site adéquat pour s'empuper et accomplir sa métamorphose.

3. La métamorphose.

Un peu près dix heures après avoir cessé de s'alimenter et s'être mise à la recherche d'un site favorable pour la métamorphose, la larve devient de moins en moins active et l'on observe l'éversion de ses spiracles antérieurs (Robertson, 1936). L'empupement débute (Figure 6). L'animal voit sa taille se réduire d'environ 25% par le jeu de la contraction des muscles longitudinaux et de la cuticule elle-même conduisant à un raccourcissement de la plupart des segments prothoraciques et à l'invagination de la tête (Fraenkel and Bhaskaran, 1973). Dans le même temps, le diamètre de l'animal augmente. Parallèlement à cela, l'animal secrète la glu, sorte de colle, synthétisée dans ses glandes salivaires qui va lui permettre de se fixer solidement au milieu. La cuticule de l'animal se durcit pour former le puparium en forme de tonneau à la surface lisse qui va passer d'une couleur blanche à une coloration brunâtre (Zdarek and Fraenkel, 1972).

La drosophile se trouve alors dans le stade prépupal et va subir de très importantes modifications morphologiques. La plupart des tissus larvaires vont être histolysés ou très profondément modifiés. Les seuls organes larvaires qui ne subissent que peu de modifications sont les gonades, qui continuent à grossir mais à un rythme moins important que lors des stades larvaires. Le cerveau lui aussi continue de croître sans subir de modifications fondamentales au cours de la métamorphose. Les tubules de Malpighi eux non plus ne seront pas profondément remaniés. Par contre, l'hypoderme, les glandes salivaires, le tube digestif, les organes des sens et les muscles vont être complètement histolysés pour être remplacés par de nouvelles structures formées à partir des disques imaginaux (Robertson, 1936).

Environ trois heures après le début du stade prépupal, une bulle de gaz se forme dans la partie postérieure du puparium (Figure 6B). Cette bulle de gaz va pousser l'animal vers la partie antérieure du puparium puis elle va occuper progressivement la partie antérieure de la case pupale, déplaçant l'animal vers la partie postérieure de la case pupale. Ces déplacements de la bulle de gaz, sous l'effet de contractions, musculaires vont faire en sorte que l'épiderme de l'animal se désolidarise du puparium (Bainbridge and Bownes, 1981; Figure 6C). Une dizaine d'heures après l'empupement les pattes, qui commencent à s'éverter à partir des sacs des disques imaginaux, et les ailes deviennent peu à peu visibles tandis que dans le même temps, la bulle de gaz disparaît.

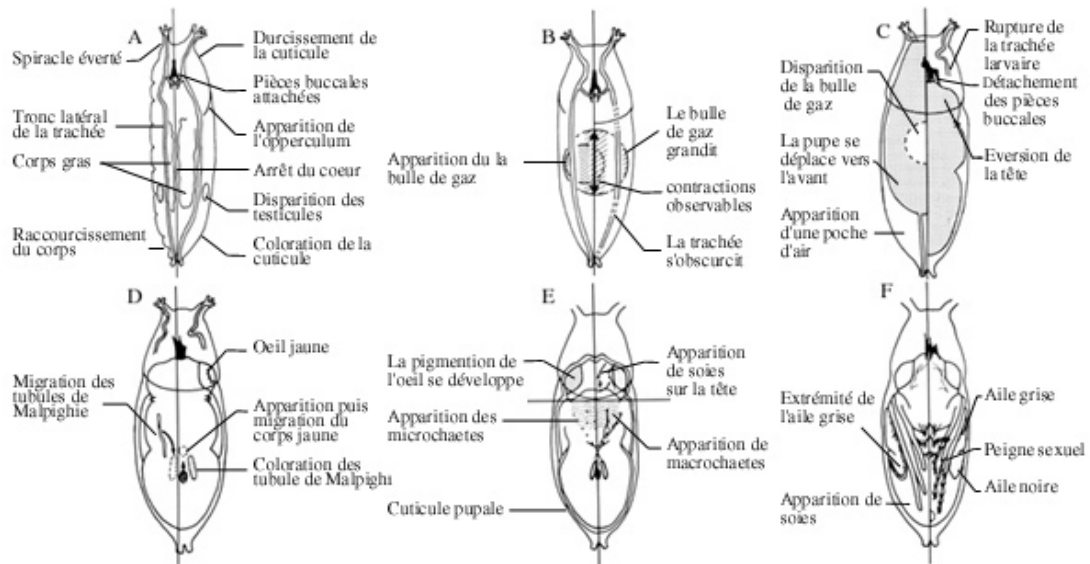


Figure 6. Représentation schématique des principaux événements visibles observés au cours de la métamorphose. (A) Le côté gauche décrit la morphologie d'une larve de stade 3 errante et le côté droit une prépupe de stade P2. (B) Une prépupe de stade P3 à gauche et de stade P4 à droite au cours de la formation de la bulle d'air. (C) Une prépupe en fin de stade P4 avec déplacement de la bulle d'air à gauche et une pupa P5 à droite. (D) Une pupa de stade P5 à gauche et une pupa P7 à droite. (E) Pupa de stade P8 à gauche et à droite pupa au cours du stade P11. (F) Pupa au cours du stade P11 à gauche et P15 à droite. Les stades de prépupe et pupes sont donnés suivant ceux décrits par Bainbridge et Bownes (1981). (D'après Bainbridge and Bownes, 1981)

Autour de 12 heures après l'empupement, le sac imaginal de la tête est éverté tandis que les pièces buccales de la larve sont expulsées (Figure 6C). A ce moment, on passe du stade pré-pupal au stade pupal et plus précisément au stade pupa phanérocéphalique. Les pattes mais aussi les ailes vont terminer leur complète extension tandis que les tubules de Malpighi vont migrer du thorax vers l'abdomen, ils vont par la suite grossir et prendre une couleur verte (Figure 6D). Entre 34 et 50 heures après le début de la métamorphose, la cuticule transparente de la pupa se détache de l'épiderme de l'animal, c'est l'apolyse qui marque la transition entre le stade pupal et l'individu adulte proprement dit, on parle du stade adulte pharate. Durant cette même période, on voit le périmètre des yeux qui jaunissent et qui vont peu à peu se pigmenter pour prendre une teinte de plus en plus rouge. Les soies, les microchaetes et les macrochaetes, vont devenir de plus en plus visibles en prenant une couleur plus foncée (Figure 6E). Dans les heures qui vont précéder l'éclosion, les ailes vont également prendre une couleur de plus en plus foncée (Figure 6F). Quatre jours et demi après l'empupement l'opercule de la case pupale s'ouvre pour laisser sortir l'animal.

L'adulte nouvellement éclos va doucement déplier ses ailes et les laisser durcir à l'air quelques minutes avant de pouvoir les utiliser (Bainbridge and Bownes, 1981). Les mâles ne

débutent leur activité sexuelle que neuf heures après leur éclosion, tandis que les femelles ont à l'éclosion un bouchon vaginal qui interdit toute fécondation avant quatre heures.

C. Les principaux outils génétiques disponibles chez la drosophile.

1. Les chromosomes polytènes.

a. Description.

Si au cours de l'embryogenèse le nombre de cellules augmente de manière très importante, il n'en est pas de même au cours des stades larvaires où le nombre de cellules reste plus ou moins constant. Par contre, durant la vie larvaire, période de croissance importante de l'animal (Church and Robertson, 1966), il y a un besoin de synthétiser de plus en plus de protéines. La dimension de la cellule augmente et pour satisfaire les besoins croissants de son fonctionnement, les chromosomes vont se diviser plusieurs fois sans que ne se séparent les différents brins. Du fait de cette polyténie, les chromosomes vont très facilement être observables avec un modeste microscope optique. Suivant le tissu ou les conditions du milieu dans lequel évolue l'animal, le degré de polyténie, c'est à dire le nombre copies de chaque chromosome, varie. Ainsi dans la glande salivaire, où le degré de polyténie le plus élevé est observé, celui-ci peut atteindre 1024 (Figure 7).

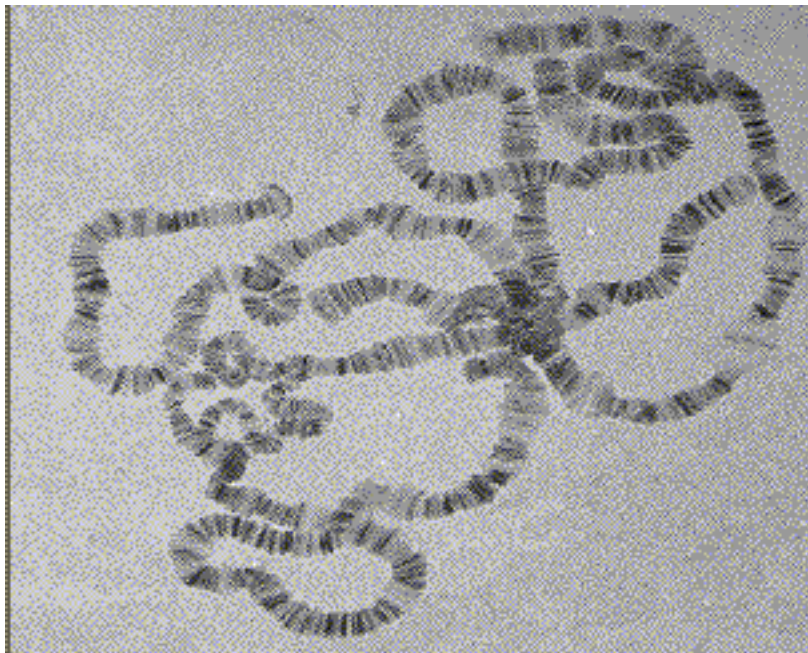


Figure 7. Chromosomes polytènes issus d'une cellule de glande salivaire de drosophile.

Observés au microscope, les chromosomes polytènes présentent une succession stéréotypée de bandes claires et de bandes sombres. On s'est donc lancé dans un travail très poussé de cartographie de ces chromosomes. Ainsi Bridges a divisé l'ensemble du génome en 102 divisions, les divisions 1 à 20 décrivant le chromosome X, 21 à 40 le chromosome 2L, 41 à 60 2R, 61 à 80 3L, 81 à 100 3L et enfin les deux dernières divisions concernent le petit chromosome 4 (Bridges, 1935, 1938). Bridges a divisé chacune de ces divisions en 6 sections, les désignant par des lettres allant de A à F (Figure 8). Enfin, chaque section peut elle même être divisée en jusqu'à 13 sous sections!

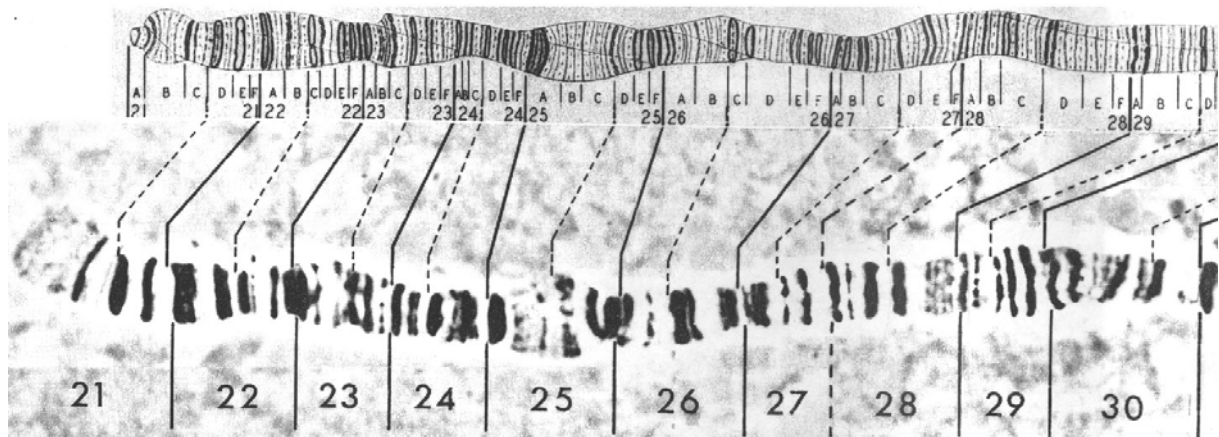


Figure 8. Extrémité du chromosome 2L de la drosophile. La partie supérieure est une carte du début du chromosome 2L où figurent les différentes régions et sous régions observées par Bridges. La partie inférieure est une photographie montrant le fragment de chromosome 2L décrit par la carte de la partie supérieure. (D'après Bridges, 1938 et Lefevre, 1976)

Ce travail de cartographie permet ainsi de déterminer quelle partie d'un chromosome on observe et ce, de façon très précise. La résolution de ces cartes est assez fine, on peut facilement observer des bandes d'environ 20kb d'ADN (Scalenghe, 1981). Cependant, la quantité d'ADN contenue entre deux sections est difficile à déterminer et est sujet à beaucoup de variation (Beermann, 1972).

b. Visualisation de l'activité génique.

Très rapidement, les chercheurs qui étudient les chromosomes polytènes remarquent le long de ceux-ci des sortes de renflements ou de gonflements ("puff" en anglais) qui les gênent dans leurs différents travaux d'observation ou de cartographie (Figure 9). Cependant, en 1952 Beermann ainsi que Pavan et Breuer assurent que ces gonflements sont spécifiques du tissu que l'on observe et que leur distribution évolue au cours du développement.

Suivant cette observation, Becker publie en 1959 une étude décrivant l'évolution de ces "puffs" dans la glande salivaire de *Drosophila melanogaster* et montre que leur apparition et leur disparition se fait toujours dans le même ordre. Becker définit alors ce qu'il appelle des stades de "puffs" où un stade décrit l'ensemble des "puffs" présents au niveau des chromosomes de la glande salivaire à un moment précis de son développement. Ashburner (1967; 1969) et Zhimulev (1972) plus tard compléteront cette première étude.



Figure 9. Extrémité distale du chromosome 3L contenu dans une cellule de glande salivaire de la drosophile au stade de "puff" 1 observée dans une larve âgée de 110h (A) et au stade de "puff" 11 observé dans une prépupe de 0h (B). Les loci 62E et 63E ne présentent pas de "puffs" chez la larve de 110h ce qui n'est pas le cas chez la prépupe. (D'après Ashburner, 1972)

C'est en 1956 que Beermann avance l'idée qu'en fait les "puffs" pourraient être la manifestation visible de l'activité des gènes.

Effectivement, on montre plus tard que ces "puffs" sont constitués de protéines et d'une accumulation d'ARN en cours de synthèse. En observant le déroulement des différents stades de "puffs", Becker émet l'hypothèse que l'ecdysone pourrait intervenir dans ce processus et effectivement, en 1960 Clever et Karlson, qui vient récemment de purifier l'ecdysone, montrent que l'hormone est capable d'induire précocement la formation de certains "puffs" chez la larve de Chironome. Ainsi, grâce à l'observation des "puffs" et à leur description, arrive peu à peu l'idée qu'une hormone est capable de déclencher une véritable réponse génétique en influençant directement l'activité de certains gènes (voir III, la régulation hormonale chez la drosophile.)

c. L'hybridation *in situ*.

L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* sur les chromosomes polytènes a donné d'importants résultats. Le principe en est le suivant: à partir d'un fragment d'ADN ou d'ARN inconnu on va synthétiser une sonde. Cette sonde est une courte séquence d'acide nucléique marqué principalement soit par une source de radioactivité soit avec une molécule pouvant être reconnue par un anticorps couplé avec une enzyme synthétisant un produit coloré en présence des réactifs adéquats. Pour ce faire, on étale sur une lame de verre les chromosomes polytènes et on les dénature avant de les mettre en contact avec la sonde. Cette sonde va reconnaître la séquence génomique qui lui est complémentaire et s'y fixer. Etant donné le grand nombre de copies d'ADN non séparées, de nombreuses sondes vont se fixer dans un espace très réduit, amplifiant ainsi le signal produit par chaque sonde. Non seulement le signal est amplifié mais en plus, disposant d'une cartographie très précise de chaque chromosome, on est ainsi capable de localiser relativement précisément sur le génome la provenance du fragment d'ADN ou d'ARN isolé.

d. L'immuno-histochimie.

L'utilisation d'anticorps contre une protéine de la drosophile sur les chromosomes polytènes profite des mêmes propriétés que l'hybridation *in situ*, à savoir d'un signal amplifié et de la capacité de déterminer la position de ce signal sur le génome. On met cette fois en contact les chromosomes polytènes étalés avec un anticorps dirigé contre une protéine d'intérêt. L'anticorps va alors reconnaître la protéine en question et s'y fixer qu'elle soit liée directement à l'ADN ou éventuellement incluse dans un complexe. On va ensuite observer le signal (radioactivité, fluorescence, ...) émis par l'anticorps lui même ou par un second anticorps capable de reconnaître ce premier anticorps.

Il faut noter que cette technique présente plus de limites dans son application et dans son interprétation que l'hybridation *in situ*. En effet, suivant les traitements que l'on fait subir aux chromosomes, certaines protéines peuvent se détacher ou se dénaturer et donc ne plus pouvoir être reconnues par l'anticorps. Il faut également être conscient du fait que contrairement à l'hybridation *in situ*, qui utilise les chromosomes polytènes comme une sorte de loupe par rapport aux chromosomes des autres cellules, la technique d'immuno-histochimie ne met en évidence que des événements liés au développement et au métabolisme de la glande salivaire de fin de stade larvaire ou de stade prépupal! Cette technique est par conséquent plus particulièrement utilisée pour l'étude des protéines intervenant dans les

processus généraux de transcription, traduction, empaquetage de l'ADN ou dans la réponse hormonale à l'ecdysone.

2. L'élément P et ses applications.

a. Description de l'élément P.

Un élément P est un transposon, c'est à dire une séquence d'ADN capable de se déplacer au sein d'un génome (et même, dans le cas de l'élément P, d'un génome à l'autre). L'élément P de la drosophile a une taille de 2907 paires de bases et il contient quatre exons codant pour une protéine particulière, la transposase. Cette protéine est nécessaire au déplacement de l'élément P dans le génome de la drosophile. A chacune de ses extrémités, l'élément P présente 31 paires de bases, inversées d'une extrémité à l'autre. En se fixant sur ces séquences répétées, la transposase catalyse la transposition de l'élément P, c'est à dire son déplacement à l'intérieur du génome. Sans ces séquences, l'élément P ne peut plus se déplacer.

Si un élément P est théoriquement capable de s'insérer n'importe où dans le génome, il y a tout de même un ensemble de facteurs pouvant favoriser ou non son intégration à un site plutôt qu'à un autre. Tout d'abord, il semble que d'une manière générale, les éléments P transposent avec une fréquence plus importante dans l'euchromatine que dans l'hétérochromatine (Berg and Spradling, 1991). Kelley et ses collègues (Kelley *et al*, 1987) ont également noté que, au sein même de l'euchromatine, les séquences non codantes situées en amont des gènes présentaient une fréquence plus élevée d'insertion. Il a aussi été observé qu'étaient favorisés les petits sauts d'éléments P, c'est à dire à proximité de leur site d'insertion de départ (Golic, 1994). Des sauts d'éléments P à l'intérieur d'autres éléments P sont également observés. Enfin, les éléments P semblent favoriser les sites d'insertion dont la séquence se rapproche de la séquence consensus GGCCAGAC (O'Hare *et al.*, 1992).

Grâce à ses propriétés, l'élément P s'est avéré très rapidement être un outil très précieux de la biologie moléculaire appliquée à la drosophile, outils qui trouvent toujours de nouvelles applications.

b. Mutagenèse.

Les éléments P ont été, et sont toujours, largement utilisés pour perturber l'expression d'un gène. Le principe est simple, il est fait en sorte que le transposon s'insère directement dans un gène à étudier ou au niveau de son promoteur afin que la protéine ne soit plus produite, produite de façon tronquée ou que la transcription du gène d'intérêt soit complètement dérégulée.

Pour parvenir à cela est utilisée une mouche porteuse d'une source de transposase. Cette source est fournie généralement par un élément P dont il manque les séquences répétées aux extrémités et qui ne peut donc plus se transposer. Cette mouche va être croisée avec une autre mouche qui a dans son génome un certain nombre d'éléments P dont le gène de la transposase est muté, mais dont les séquences répétées sont intactes. De tels transposons peuvent se transposer dans le génome à la condition qu'une source de transposase soit fournie, on parle d'éléments P non autonomes. La première génération issue de ce croisement possède donc dans son génome à la fois des éléments P et la transposase nécessaire à leur transposition. La mutagenèse se produit dans la lignée germinale de la descendance F1. Il faut ensuite croiser ces animaux de la génération F1 de telle manière à la fois ôter la source de transposase et à sélectionner les individus mutés présentant un intérêt.

Lorsqu'est obtenue une mutation intéressante, il est possible, pour obtenir différents allèles, de faire d'autres croisements pour introduire à nouveau une source de transposase. L'objectif est de mobiliser l'élément P de manière imprécise, en effet dans un certain nombre de cas, le transposon emporte avec lui une partie plus ou moins importante de la séquence génomique flanquante. On peut ainsi obtenir une délétion partielle, voire totale, du gène étudié.

c. Autres applications de l'élément P.

L'élément P peut également être utilisé pour les expériences de transformation (Rubin and Spradling, 1982). Dans ce cas, un gène d'intérêt est introduit à l'intérieur du transposon sous le contrôle d'un promoteur particulier par exemple celui d'*hsp70*, une protéine de choc thermique. Ainsi, une fois le transposon inséré dans le génome de l'animal, il est possible simplement en augmentant la température du milieu, d'induire plus ou moins fortement l'expression des gènes insérés.

L'insertion aléatoire d'éléments P contenant un gène rapporteur (*lacZ* ou *gfp*) est une technique utilisée pour mettre en évidence certaines régions régulatrices du génome. En effet, lorsqu'une telle construction s'insère à proximité d'une région régulatrice, celle-ci va alors être capable de modifier l'expression du gène rapporteur contenu dans le transposon.

Plus récemment les éléments P ont aussi été utilisés pour déclencher des recombinaisons mitotiques (Golic and Lindquist, 1989). Cette technique fait appel à la recombinase FLP de *S. cerevisiae* et aux séquences FRT (FLP Recombination Target) qu'elle est capable de reconnaître pour induire une recombinaison entre elles.

3. Les chromosomes "balancers".

Les chromosomes "balancers" ont été mis au point par Muller et Altenburg (Muller, 1918; Altenburg and Muller, 1920) dans le but de pouvoir aisément maintenir une mutation récessive létale sous la forme d'un stock de mouches.

Il existe aujourd'hui de nombreux chromosomes "balancers" correspondant à chacun des chromosomes de la drosophile. Un tel chromosome est un chromosome qui porte une (mais souvent plusieurs) mutation au phénotype dominant permettant de visualiser la présence du chromosome à l'état hétérozygote dans un individu. La présence de deux copies d'un chromosome "balancer" est létale du fait de la présence de mutations récessives létales. Par conséquent, si on démarre un stock à partir d'animaux portant une même mutation létale récessive sur un chromosome "normal" avec pour chromosome homologue un chromosome "balancer", la génération suivante ne donnera que des adultes de même génotype que leurs parents. Un atout du chromosome "balancer" est d'éviter le problème des recombinaisons méiotiques qui pourraient se produire durant l'oogenèse. On a en effet introduit dans ce type de chromosomes des inversions chromosomiques rendant ainsi impossible l'apparition d'ovule pourvu d'un chromosome recombiné et donc l'introduction de chromosomes sauvages dans le stock de mouches.

L'emploi des chromosomes "balancers" a permis de grandement faciliter le travail des scientifiques utilisant la drosophile. Il permet de conserver sur de très longues périodes, une mutation récessive létale sous forme de stocks de mouches génétiquement stables. Il permet aussi, grâce à la présence de marqueurs dominants, de déterminer très rapidement le génotype d'une mouche, même si la mutation que l'on étudie n'a pas de phénotype visible et cela, sans utiliser de techniques de biologie moléculaire. Ces dernières années, l'emploi de la "Green Fluorescent Protein" (GFP) comme marqueur dominant s'est développé. Cette protéine a la propriété d'être fluorescente lorsqu'elle est soumise à une source de lumière bleue de 490

nanomètres. L'utilisation du gène *gfp* sous contrôle d'un promoteur permettant une production étendue de cette protéine à la fois du point de vue développemental et tissulaire, permet de déterminer très tôt et très facilement le génotype des animaux observés.

D. La séquence génomique de la drosophile.

1. Historique du séquençage.

Le projet de séquencer entièrement le génome de la drosophile fait partie intégrante du Projet Génome Humain, lancé aux Etats-Unis le 1^{er} octobre 1990. On se propose alors de lancer une grande collaboration internationale avec pour objectif l'obtention, dans un délai de 15 ans, de l'intégralité de la séquence du génome humain. On prévoit de ne pas commencer directement le séquençage génomique chez l'Homme dont la taille, trois milliards de paires de bases, paraît trop conséquente aux vues des techniques disponibles, mais plutôt de passer par une série de génomes intermédiaires qui permettront justement de mettre au point de nouveaux protocoles et d'améliorer l'efficacité des techniques existantes. Ainsi, parmi la liste des génomes modèles qui pourraient être séquencés figurent: *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* dont le génome estimé à environ 180 millions de paires de bases pourrait constituer la dernière étape avant de se lancer pleinement dans la lecture de l'ADN humain.

Concernant le séquençage du génome de la drosophile, deux grands consortium se forment, l'un aux Etats-Unis, le Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) avec Gerald M. Rubin à sa tête qui regroupe le Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL) et le Baylor College of Medicine (BCM), l'autre consortium se situe en Europe : le European Drosophila Genome project (EDGP).

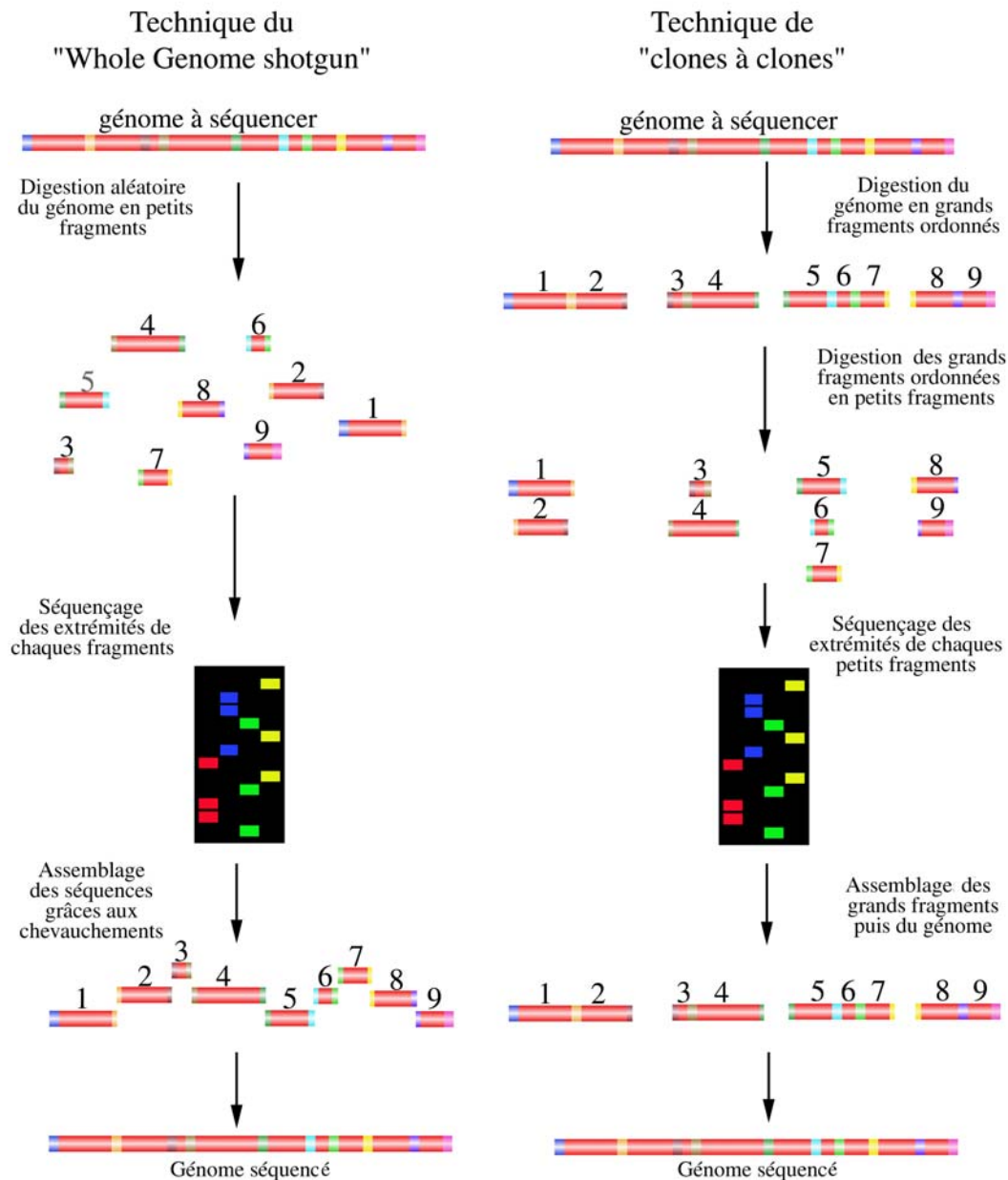


Figure 10. Comparaison des deux différentes approches utilisées pour séquencer le génome de la drosophile, le séquençage "clones à clones" et le "Whole genome shotgun". Les nombres sont utilisés pour marquer l'ordre des différents fragments les uns par rapport aux autres. Les bandes de couleur représentent l'extrémité des segments génomiques. Deux extrémités de même couleur dans des segments ADN différents symbolisent des séquences partiellement chevauchantes appartenant à des fragments consécutifs.

De par la longue histoire de la drosophile en tant qu'animal modèle dans l'étude génétique, la communauté scientifique à travers le monde a déjà isolé et séquencé de nombreux gènes (entre 2000 et 3000), dont on prévoit d'incorporer les séquences aux séquences qu'il reste à déchiffrer.

Pour déterminer la séquence du génome entier de la drosophile, on décide d'appliquer l'approche dite de "clones à clones" (Figure 10). Cette approche se distingue de celle qui avait été employée pour le séquençage d'autres modèles au génome à taille plus modeste: le "Whole

Genome Shotgun" (WGS). Le WGS consiste à découper l'ensemble du génome en fragments de quelques milliers de paires de bases, à les cloner dans des vecteurs pour en séquencer les extrémités, puis à assembler les séquences obtenues en les orientant grâce aux séquences chevauchantes que l'on peut retrouver dans plusieurs clones différents (Figure 10).

Cependant, on estime alors que pour un génome de la taille de celui de la drosophile, l'assemblage des séquences deviendrait une tâche immense et qu'il vaut mieux découper ce génome en quelques très grands fragments que l'on clone pour ensuite seulement digérer ces grands fragments en d'autres plus petits comme dans la technique de WGS. A partir des séquences obtenues, on prévoit de reconstituer la séquence de chaque grand clone puis d'assembler les séquences de ces grands clones entre eux et reconstituer ainsi l'intégralité de la séquence génomique.

Mai 1998 marque un tournant dans l'entreprise du séquençage du génome humain, un des responsables du HGP, Craig Venter, biologiste moléculaire, annonce la création d'une société: Celera Genomics, en partenariat avec une multinationale dans le domaine de l'équipement biotechnologique: Perkin-Elmer.

Se basant sur l'analyse de Weber et Myers (1997), Venter estime quant à lui que séquencer les trois milliards de paires de bases du génome humain par la technique du "Whole Genome Shotgun" est réalisable et il se propose de séquencer le génome de la drosophile pour prouver et valider la fiabilité de cette approche.

Quelle que soit la technique employée pour séquencer un génome, la difficulté ne réside pas tant dans la lecture même de chaque paire de bases mais essentiellement dans la capacité de remettre toutes ces paires de bases dans le bon ordre. Cette difficulté augmente bien sûr avec la taille du génome à déchiffrer. C'est pourquoi, outre la puissance de séquençage que lui fournit sa collaboration avec Perkin-Elmer, Celera se dote d'une énorme capacité informatique capable d'assembler les millions de séquences fournies par les séquenceurs.

Le début du projet démarre en mai 1999 en collaboration avec le BDGP. Les extrémités de chaque fragment sont séquencées sur environ 500bp, ce qui représente la limite technique du séquençage. Ensuite, chaque séquence est envoyée vers les ordinateurs qui vont les comparer et chercher des séquences identiques entre elles pour former des "couples de lecture", c'est à dire des séquences identiques que l'on retrouve dans plusieurs clones, ce qui renseignera sur la position de ces séquences les unes par rapport aux autres.

Une fois le séquençage terminé et un premier assemblage proposé, vient l'étape de validation. Pour cela, Celera a collaboré très étroitement avec le BDGP et dans une moindre

mesure avec le EDGP qui ont fourni leurs données, obtenues notamment par la technique du "clones à clones". Les clones fournis contiennent des insertions de très grandes tailles et l'on peut visualiser facilement leurs positions les uns par rapport aux autres directement sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires de la drosophile. De plus, de nombreuses séquences de gènes, d'ARN codants, d'ARN messagers, d'ADN flanquant des insertions de rétrotransposons et d'ADN génomique étaient déjà disponibles dans les banques informatiques constituées par la communauté scientifique au fil des années. Là résidait l'énorme avantage d'utiliser la drosophile comme tremplin pour la validation de la technique avant d'entreprendre le séquençage du génome humain.

La dernière étape consiste à combler les trous qui peuvent exister dans la séquence obtenue. Pour cela, on s'appuie sur les séquences connues qui entourent ces trous. On synthétise notamment des amorces adéquates pour amplifier par PCR la séquence inconnue, on fait également des digestions enzymatiques que l'on exploite par Southern Blot ou des extensions d'amorces avant de séquencer et combler ainsi les trous.

Le 24 mars 2000, Venter pour Celera, Rubin pour le BDGP et leurs collaborateurs respectifs annoncent dans la revue scientifique Science avoir assemblé l'ensemble du génome de la drosophile, soit moins d'un an après la production de la première séquence par Celera. La lecture du génome de *Drosophila melanogaster* terminée avec succès et l'approche validée, Celera pouvait se consacrer pleinement au séquençage du patrimoine génétique humain. En février 2001, moins d'un an après la publication du génome de la drosophile est publié dans la revue Science par Celera et dans la revue Nature par le Consortium International du Sequencage du Genome Humain si ce n'est l'intégralité du moins une part importante du génome humain. La publication de ces résultats dans deux revues différentes laisse penser que la coopération entre Celera et les organismes publics a été plus houleuse pour ce projet qu'elle ne le fut un an plus tôt avec la communauté scientifique travaillant sur la drosophile.

2. Les principales observations.

La disponibilité de plus en plus de séquences génomiques d'animaux modèles permet de constater à la fois des fonctions biologiques et des processus communs (Tableau 1) mais aussi d'en savoir un peu plus sur les bases génétiques de la variation et de la spéciation. En comparant ces différentes séquences génomiques, on a pu mettre en évidence certaines

caractéristiques communes mais de nombreuses différences sont apparues, différences qu'il est parfois difficile d'interpréter.

Dans un travail de comparaison, Rubin et son équipe (Rubin *et al.*, 2000) ont défini la notion de "protéome de base" qui correspond au nombre de familles de protéines distinctes que l'on peut trouver dans un organisme. Il semble que ce "protéome de base" puisse dans une certaine mesure refléter la complexité d'un organisme, ainsi on note que le "protéome de base" de *H. influenza*, un organisme procaryote, est trois fois moins important que celui de *S. cerevisiae*, un organisme eucaryote. Parmi l'ensemble des gènes de la drosophile, Rubin estime à environ 30% la proportion de gènes possédant un orthologue chez le nématode (c'est à dire deux protéines issues d'un ancêtre commun), et à 20% ayant un orthologue à la fois chez le nématode et chez la levure. Rubin et ses collègues avancent l'hypothèse que ces derniers pourraient être impliqués dans des fonctions communes à toutes les cellules eucaryotes. Dans le même ordre d'idées, le "protéome de base" de la drosophile, organisme multicellulaire, est deux fois plus important que celui de la levure, organisme unicellulaire. En effet, de nombreuses familles de protéines qui existent chez les organismes multicellulaires n'existent pas chez les organismes unicellulaires. On peut citer par exemple toutes les protéines qui interviennent dans la communication intercellulaire, les protéines qui interviennent dans le développement ou la mise en forme des individus comme les protéines à homéodomaine et les protéines d'adhésion.

Grâce à ces comparaisons de génomes, on constate que des protéines orthologues appartiennent très souvent au même "protéome de base" et sont donc impliquées dans les mêmes processus communs aux différents organismes comme le contrôle du cycle cellulaire (Ball and Cherry, 2001). Ces données fournissent également de nouvelles informations quant à la phylogénie qui relie les différents organismes et souvent de nouveaux indices sur la fonction de gènes nouvellement découverts.

Cependant, de nombreuses observations soulèvent de nouvelles interrogations. Par exemple, Rubin relève que 30% des protéines prédites d'un organisme lui sont propres. Ces protéines ne possèdent d'homologues ni dans l'organisme lui même, ni dans un autre.

Processus	Nb de transcrits	Fonction	Nb de transcrits
Croissance cellulaire et maintenance	3894	Fixation aux acides nucléiques	1387
Métabolisme	2274	Fixation à l'ADN	919
Métabolisme des carbohydrates	53	Réparation de l'ADN	65
Voie d'énergie	69	Facteur de réplication de l'ADN	38
Transport d'électrons	8	Facteur de transcription	694
Métabolisme des nucléotides et acides nucléiques	1078	Fixation à l'ARN	259
Métabolisme de l'ADN	64	Protéine ribosomale	128
Réplication de l'ADN	57	Facteur de traduction	69
Réparation de l'ADN	110	Fixation de facteur de transcription	21
Empaquetage de l'ADN	112	Régulateur du cycle cellulaire	52
Transcription	735	Chaperone	159
Métabolisme des acides aminés et dérivés	69	Protéine motrice	98
Métabolisme des protéines	685	Fixation à l'actine	93
Biosynthèse des Protéines	215	Protéine immunitaire ou de défense	47
Repliement des protéines	52	Enzyme	2422
Modifications des protéines	273	Peptidase	468
Protéolyse et peptidolyse	81	Endopeptidase	378
Ciblage des protéines	51	Kinase	236
Métabolisme des lipides	111	Phosphatase	93
Métabolisme des composés monocarbonés	6	Activateur d'enzyme	9
Métabolisme des coenzymes	23	Inhibiteur d'enzyme	68
Transport	336	Inhibiteur d'apoptose	15
Transport ionique	72	Transduction de signal	622
Transport de petites molécules	109	Récepteur	337
Transport mitochondrial	43	Récepteur transmembranaire	261
Homéostasie ionique	8	Récepteur lié aux protéines G	163
Circulation intracellulaire des protéines	116	Récepteur olfactif	48
Mort cellulaire	50	Protéine de stockage	12
Mobilité cellulaire	9	Adhésion cellulaire	216
Réponse au stress	223	Protéine de structure	303
Réponse immunitaire et défense	149	Structure du cytosquelette	106
Biogenèse et organisation des organelles	417	Transporteur	665
Biogenèse et organisation des mitochondries	5	Canal ionique	148
Biogenèse et organisation du cytosquelette	390	Transporteur de neurotransmetteur	33
Biogenèse et organisation du cytoplasme	7	Fixation de ligand ou porteur de ligand	327
Cycle cellulaire	211	Transfert d'électrons	124
Communication cellulaire	530	Cytochrome P450	88
Adhésion cellulaire	228	Ubiquitine	11
Transduction de signal	279	Suppresseur de tumeurs	10
Processus de développement	486	Fonction inconnue/ non classée	7576
Détermination sexuelle	7		
Processus physiologiques	201		
Perception sensorielle	64		
Comportement	54		
Processus inconnu/non classé	8884		

Tableau 1. Répartition des différents transcrits prédits de la drosophile dans les principaux processus (à gauche) et les principales fonctions biologiques (à droite). Chacun des 14113 transcrits prédits a été comparé aux protéines contenues dans une banque de protéines de drosophile, de levure et de souris. La fonction et/ou le processus dans lesquels les protéines contenues dans ces banques de données interviennent avaient été donnés "manuellement". Cette comparaison a permis d'assigner une fonction et/ou un processus dans lequel interviennent les différents transcrits prédits de la drosophile. Les résultats indiquant le nombre (Nb) de transcrits impliqués dans les différents processus abordés sont directement issus de la comparaison des séquences par ordinateur tandis que les résultats indiquant le nombre de transcrits de drosophile assurant une fonction donnée ont été en plus corrigés "manuellement". (Adams *et al.*, 2000)

Cela rappelle des résultats précédemment publiés (Schmid and Tautz, 1997) qui montraient que près d'un tiers des ADN codants (ADNc) de drosophiles de deux groupes différents (*Drosophila melanogaster* et *virilis*) ne s'entre-hybrident pas. Il est difficile d'expliquer cette observation. Peut-on penser que ces gènes seraient le résultat d'une évolution très rapide dans l'organisme? Dans ce cas, quelle en serait la signification du point de vue

évolutif ? Peut-être que si les séquences protéiques ou génomiques sont différentes, les structures tridimensionnelles, elles, sont préservées ? Il faut également noter que cela rend plus difficile la détermination de la fonction de ces protéines, qui représentent tout de même un tiers du génome de la drosophile et qui n'ont pas d'équivalents ailleurs.

La répartition des récepteurs nucléaires entre les organismes peut également laisser perplexe. Les mammifères ont environ une cinquantaine de récepteurs nucléaires, la drosophile en a 21, tandis que *C. elegans* en a près de 270 dont la majorité n'a pas d'homologue chez les autres organismes. D'où vient cette différence importante du nombre de récepteurs nucléaires chez le nématode ? Est-ce la conséquence du fait que le nématode a une proportion importante de cellules nerveuses et que les récepteurs nucléaires seraient impliqués dans la communication entre elles ou encore que ces protéines seraient utilisées par le ver comme des médiateurs des signaux provenant de l'environnement pour lui permettre de mieux adapter sa physiologie aux conditions qui l'entourent ? Enmark et ses collègues laissent la question ouverte (Enmark *et al.*, 2001).

Le décryptage des génomes de la drosophile et de l'Homme permet de confirmer encore plus l'utilité de la drosophile en tant qu'animal modèle pour l'étude d'un certain nombre de pathologies humaines. En effet, Rubin a relevé que sur 289 gènes dans lesquels une mutation pouvait apporter une maladie chez l'Homme, 61% avait un gène orthologue chez la mouche. Ainsi une dizaine de maladies causées par des répétitions poly-glutamiques, comme la chorée de Huntington ou certaines formes d'ataxie, pourraient bénéficier des connaissances et du savoir faire accumulés dans l'étude de la drosophile *in vivo*. Le séquençage du génome de la drosophile a aussi permis de découvrir de nouveaux gènes qui pourraient aider la compréhension du mécanisme de certaines pathologies, comme la forme juvénile de la maladie de Parkinson. La même étude estime à 68% la proportion de gènes humains impliqués dans différents cancers ayant un gène orthologue chez la drosophile, par exemple le gène *p53*, acteur central de la cancérogenèse.

Un autre avantage de l'utilisation de la drosophile comme modèle est que très souvent, les gènes impliqués dans ces maladies sont présents dans la drosophile sous forme de simple copie, or cela est rarement le cas chez l'Homme ou même la souris. Ceci est un énorme atout facilitant les investigations et pouvant favoriser la compréhension générale des mécanismes dans lesquels ces gènes interviennent en évitant tous les problèmes de redondance.

L'obtention de séquences génomiques de plus en plus nombreuses a également bouleversé les habitudes de travail du chercheur. Aujourd'hui, une recherche rapide sur

Internet lui permet obtenir la séquence du gène qu'il étudie ainsi que les séquences de part et d'autre de ce gène, sur des dizaines milliers de paires de bases s'il le souhaite, lui épargnant des mois de travail laborieux. De la même façon, la recherche de gènes ou de motifs homologues dans le même animal ou dans un autre ne prend plus que quelques heures. Très rapidement le chercheur peut localiser ces gènes sur les différentes séquences, savoir si un gène fait partie d'un complexe de gènes et par exemple si ce complexe est conservé au cours de l'évolution.

Cependant, avoir à sa disposition l'ensemble de la séquence d'un génome ne résout pas tous les problèmes de la biologie moléculaire. La séquence d'un gène ne peut donner que des indications dans le meilleur des cas sur sa fonction. Elle ne répond pas non plus à la question de savoir si un gène est réellement actif et, s'il l'est, quand et où il l'est. La séquence génomique, même si elle peut fournir certains indices, ne nous apprend pas non plus si un gène peut être transcrit sous plusieurs isoformes, si ces transcrits sont vraiment traduits, ni la fonction des protéines qui peuvent en résulter. En effet, il ne faut pas perdre de vue que les fonctions biologiques d'un organisme sont au final essentiellement réalisées par des protéines et qu'à partir du gène, il existe de nombreuses étapes susceptibles d'apporter des modifications avant d'obtenir la protéine active.

II. La neurogenèse chez la drosophile.

L'établissement de l'axe dorso-ventral chez l'embryon dépend notamment de la protéine Dorsal qui forme un gradient de concentration. La répartition de Dorsal permet d'établir trois territoires distincts au début de l'embryogenèse (Bier, 1997), caractérisés chacun par l'expression de gènes différents. (Figure 11).

Les neuroblastes, qui sont les cellules précurseurs du système nerveux central, dérivent d'une région neurogénique localisée baso-latéralement au début de l'embryogenèse. Cette région neurogénique se divise en deux sous-régions, la région neurogénique ventrale à l'origine des neuroblastes de la corde nerveuse ventrale et la région où se forment les neuroblastes du cerveau: la région neurogénique procéphalique, plus complexe et moins connue que nous n'aborderons pas ici. La région neurogénique est constituée pour la plus grande part par le neuroectoderme, mais un certain nombre de neuroblastes sont également issus du mésectoderme constitué d'une seule rangée de cellules séparant la région

neurogénique ventrale et le mésoderme (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985; Goodman and Doe, 1993). Les limites du mésectoderme et du neuroectoderme sont étroitement contrôlées par tout un jeu d'expression de gènes et par leur très fine régulation.

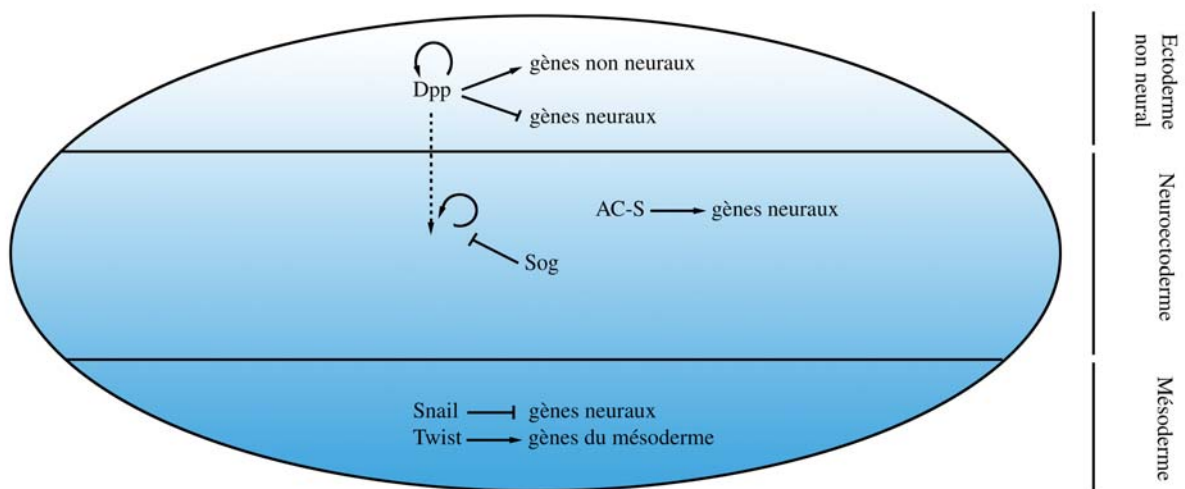


Figure 11. La répartition de la protéine Dorsal permet l'établissement de trois zones distinctes dans l'embryon: le mésoderme, le neuroectoderme et l'ectoderme non neural. Ainsi dans la partie ventrale, la forte concentration de Dorsal permet l'induction de *twist* et *snail*, tandis que dans la partie latérale la faible concentration de Dorsal permet entre autres à *rhomboid* (*rho*), *short gastrulation* (*sog*) et à *lethal of scute* (*l'sc*), un gène proneural du complexe *achaete scute* (*AS-C*) (Garcia-Bellido and Santamaria, 1978; Garcia Bellido, 1979), d'être exprimés. Enfin, dans la partie la plus dorsale de l'embryon, l'absence de Dorsal permet l'expression de *decapentaplegic* (*dpp*) (codant pour une protéine de la famille de *TGF-β* et capable de diffuser. L'intensité de la couleur bleue reflète le gradient de concentration de la protéine Dorsal dans l'embryon. Le côté dorsal est en haut du schéma et le côté ventral en bas. (Adaptée de Bier, 1997)

A partir du stade 9 de l'embryogenèse, des neuroblastes commencent à se détacher de l'ectoderme pour se placer sur deux rangs de cellules de chaque côté de l'embryon, ces neuroblastes sont qualifiés de neuroblastes SI pour les différencier des neuroblastes SII, SIII, ... SV issus des quatre autres vagues de détachements qui vont suivre. A la fin du stade 11 de l'embryogenèse, l'ensemble des neuroblastes est en place, on en compte 30 par hémisegment, disposés sur sept rangs. La formation et la position des neuroblastes étant relativement stéréotypées et constantes entre différents hémisegments, nous décrivons ce processus au sein d'un hémisegment, sachant que cette description peut être généralisée aux autres hémisegments. Le neuroblaste nouvellement formé subit une série de mitoses qui aboutit à la formation des cellules mères des ganglions (abrégées GMC pour "Ganglion Mother Cells") qui en se divisant forment les neurones.

A. La formation du més ectoderme.

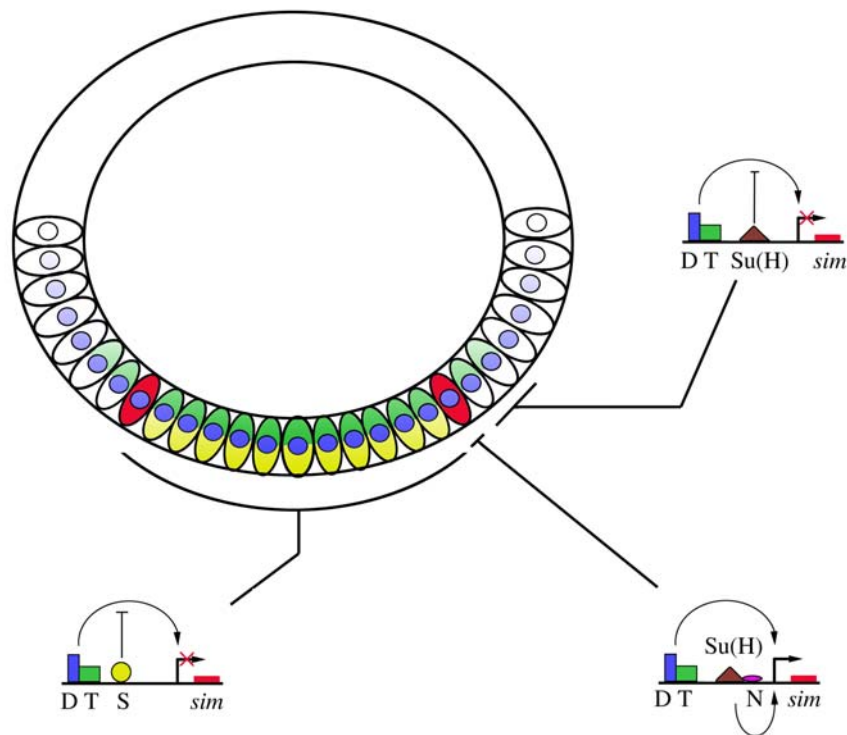


Figure 12. Coupe sagittale d'un embryon schématisant le contrôle génétique de la mise en place du més ectoderme et du maintien de ses limites dorsale et ventrale. L'expression de *sim* est sous le contrôle de deux promoteurs dont le plus précoce possède des séquences consensus de fixation pour Twist, Dorsal et Notch qui permettent l'expression du gène, et pour Snail qui le réprime. L'expression de *sim* nécessite la présence concomitante de Dorsal et Twist, ce qui a pour conséquence la relative étroitesse de sa zone d'expression. La limite d'expression du côté ventral est garantie par l'expression de *snail* dans cette région qui réprime l'expression de *sim*. Il semble également que Notch et Suppressor of Hairless (Su(H)) soient nécessaires pour contrôler la limite d'expression de *sim* du côté dorsal, ainsi Su(H) pourrait empêcher Twist et Dorsal d'induire *sim* du côté le plus dorsal mais que la présence de Notch dans cette seule rangée de cellules interdirait cette action répressive de Su(H) sur Twist et Dorsal, favorisant ainsi l'expression de *sim*. Les cellules rouges désignent la rangée unique de cellules du més ectoderme. La protéine Dorsal, en bleu, forme un gradient de concentration de même que Snail, en jaune, et Twist (en vert). L'intensité des couleurs reflète la concentration relative de chaque protéine par contre leur disposition dans la cellule n'est que schématisée et ne représente pas la réalité. D: Dorsal, T: Twist, S: Snail, N: Notch, Su(H): Suppressor of Hairless, *sim*: *single minded*.

Le més ectoderme représente une unique rangée de cellules localisées juste au dessus du mésoderme. Les cellules de ce tissu sont caractérisées par l'expression de *single minded* (*sim*) (Crews *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1988; Figure 12).

B. La formation du neuroectoderme.

Le neuroectoderme est situé dorsalement par rapport au més ectoderme, il lui fait immédiatement suite et est beaucoup plus large que ce dernier.

Le neuroectoderme se forme dans la zone où le gène proneural *lethal of scute* (*l'sc*) est exprimé. Cependant *l'sc* n'est pas exprimé dans la partie la plus dorsale de l'embryon en raison

de la présence de Decapentaplegic (Dpp) qui inhibe l'expression des gènes proneuraux en faveur de gènes non proneuraux, tout en contrôlant positivement sa propre expression. Dans le neuroectoderme, l'autorégulation de *dpp* ne peut se faire, inhiber par Short gastrulation (Sog) (Figure 11).

C. La formation des groupes de cellules proneurales.

Les neuroblastes sont formés à partir de groupes de cellules initialement toutes équivalentes et qui constituent un groupe de cellules proneurales. La position de chaque neuroblaste dans l'embryon est basée sur la position du groupe dont il est issu au sein de cet embryon.

Le neuroectoderme et le méssectoderme à l'intérieur d'un hémisegment, suivant la combinaison de gènes de polarité segmentaire qui s'y expriment, sont divisés en quatre rangs selon l'axe antéro-postérieur (Figure 13).

De la même façon, l'expression de certains gènes qualifiés de gènes de colonne va diviser la région neurogénique suivant l'axe dorso-ventral en trois colonnes différentes.(Figure 13).

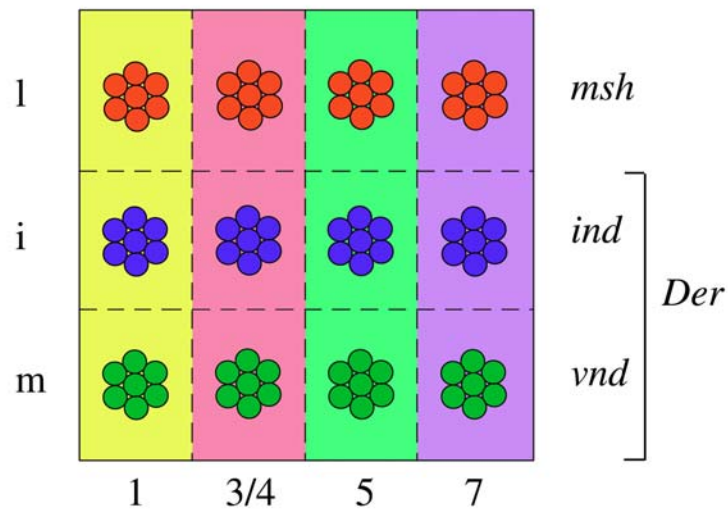


Figure 13. Schéma représentant les groupes de cellules proneurales (groupe de sept cercles) à l'intérieur d'un hémisegment d'embryon. Un hémisegment est divisé en quatre rangs notés 1, 3/4, 5 et 7 exprimant chacun une combinaison de gènes de polarité segmentaire différente (fonds jaune, rose, vert clair, violet) et en trois colonnes notées: l (latérale), i (intermédiaire) et m (médiane) exprimant des combinaisons de gènes de colonne différents: *msh* (*muscle segment homeobox*), *ind* (*intermediate neuroblasts defective*), *vnd* (*ventral nervous system defective*) et *Der* (*Drosophila EGF receptor*) (cellules colorées en rouge, bleu et vert foncé). Cette expression différentielle a pour conséquence que chaque groupe de cellules proneurales d'un hémisegment exprime une combinaison unique de gènes de polarité segmentaire et de gènes de colonne. (D'après Skeath, 1999)

Ainsi l'action combinée des gènes de polarité segmentaire et des gènes de colonne va permettre d'établir un véritable repère cartésien à l'intérieur d'un hémisegment, donnant à chaque groupe de cellules proneurales, et par extension à chaque neuroblaste qui en sera issu, une combinaison spécifique de gènes proneuraux et par conséquent permettre de leur donner un destin différent les uns des autres.

D. La formation des neuroblastes.

A l'intérieur d'un groupe proneural, constitué de 5 à 7 cellules, toutes les cellules sont équivalentes et ont toutes le potentiel pour se différencier en neuroblastes. Cependant à l'intérieur d'un groupe, une seule cellule va se différencier tandis que les autres prendront une identité épidermique.

Avant que n'ait lieu cette différenciation, chaque cellule du groupe proneural exprime des gènes proneuraux nécessaires à l'acquisition de l'identité neuroblastique et des gènes neurogéniques qui limitent l'activité des gènes proneuraux. Le complexe *achaete/scute* comprend trois gènes proneuraux codant pour des facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*) et *lethal of scute* (*l'sc*). Il existe à ce stade un certain équilibre entre l'expression de ces deux types de gènes, ce qui a pour conséquence de maintenir toutes les cellules dans un *statu quo* entre une différenciation épidermique et neuroblastique. Pourtant, de manière aléatoire, une cellule va accumuler plus de produits issus des gènes proneuraux que ses voisines, perturbant ainsi l'équilibre qui existait jusque là entre l'activité des gènes proneuraux et celle des gènes neurogéniques (Figure 14).

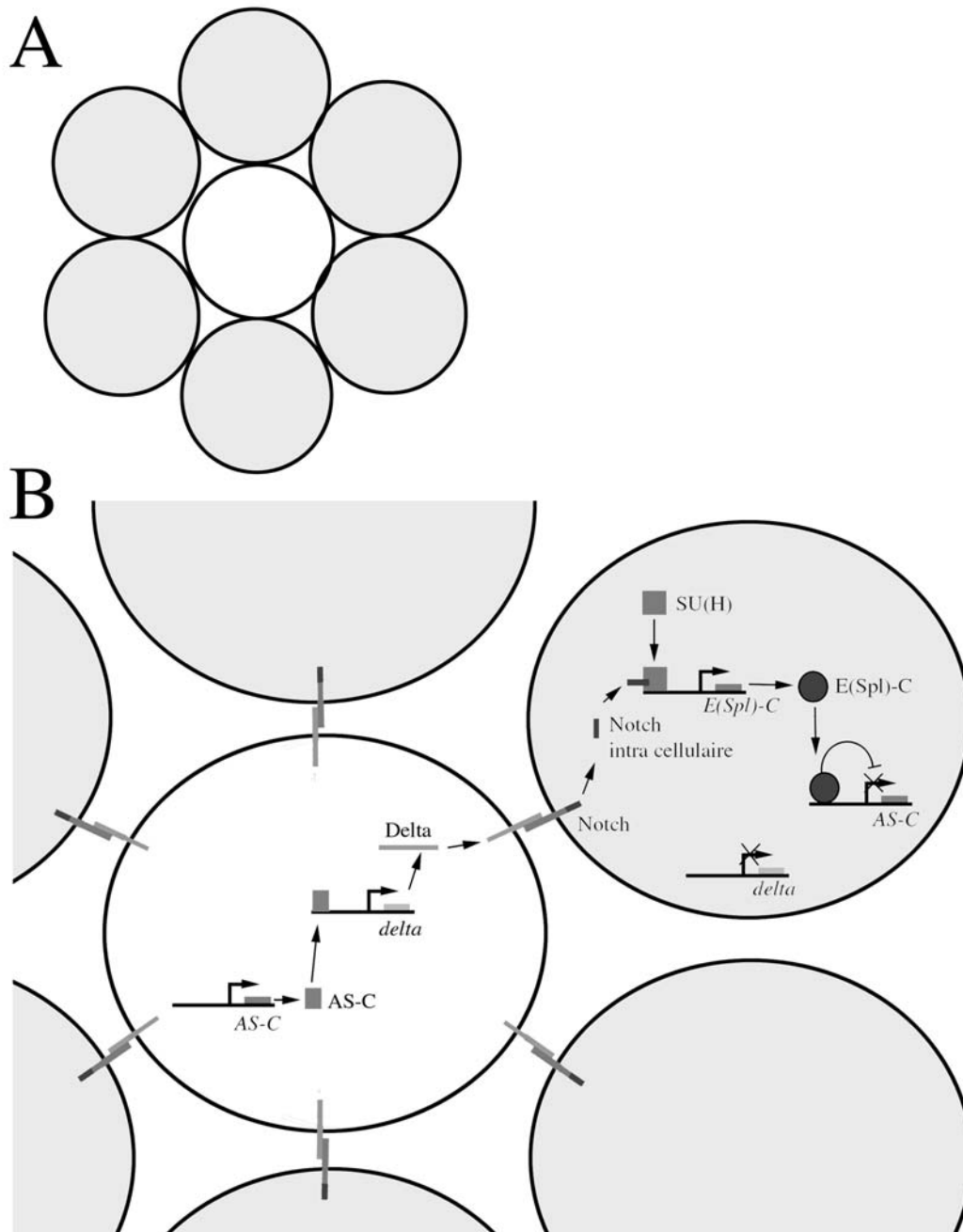


Figure 14. Schéma montrant sept cellules appartenant à un même groupe de cellules proneurales initialement équivalentes (A). De manière aléatoire, une cellule, ici la cellule du centre (B), exprime plus de gènes proneuraux, entraînant l'expression de Delta. Delta associée au récepteur transmembranaire Notch des cellules voisines déclenche dans ces dernières l'inhibition de l'expression des gènes proneuraux. La cellule du centre prend alors un destin neuronal tandis que les cellules voisines suivent un destin épidermique.

L'excès des produits de certains gènes proneuraux dans cette cellule va induire chez celle-ci l'expression du gène *delta*, codant pour une protéine transmembranaire. Ces protéines Delta, localisées à la surface des cellules, vont se lier à une autre protéine transmembranaire, Notch, placée à la surface des cellules voisines. L'association de Notch et Delta va activer Notch, qui va se cliver et transmettre le signal au noyau grâce notamment à des protéines issues de l'expression des gènes *Hairless* et *Suppressor of Hairless*, ce dernier étant capable d'activer les gènes du complexe *Enhancer of split (E(spl)-C)*. On va alors observer l'inhibition

des gènes proneuraux par les gènes de *E(spl-C)*. L'expression des gènes *AS-C* étant réprimée, *delta* n'est plus induit mettant ainsi la cellule dans l'incapacité d'envoyer un signal équivalent (c'est à dire d'inhibition du destin neuroblastique). Ceci à pour conséquence une augmentation du déséquilibre existant entre la cellule pourvue d'un surplus de produits de gènes proneuraux, qui va produire de plus en plus de protéine Delta, et ses voisines qui en produiront de moins en moins. Au final, une seule cellule exprime des gènes proneuraux tandis que les autres expriment des gènes neurogéniques et finiront par prendre une identité épidermique.

E. La formation des neurones.

Une fois formés, les neuroblastes subissent une série de divisions asymétriques dont le nombre peut varier d'un neuroblaste à l'autre. Lorsque qu'il se divise le neuroblaste donne d'une part un autre neuroblaste et d'autre part une seconde cellule à la taille plus modeste, une cellule mère des ganglions (GMC). Cette division asymétrique est assurée par la répartition non homogène de certains facteurs dans le neuroblaste. Ainsi, à la fin de l'interphase, un complexe formé de la protéine Prospero, un facteur de transcription, et de son ARN est localisé du côté apical de la cellule. Lorsque la cellule entre en mitose, Prospero et son ARN sont transportés indépendamment, grâce à la participation entre autres des protéines Miranda et Staufén, vers le côté basal du neuroblaste centré au dessus du centrosome basal (Ikeshima-kataoka *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1997). Lors de la division, une cellule va contenir une grande quantité de Prospero: la GMC. Dans la GMC, Prospero pénètre dans le noyau et participe à l'arrêt du cycle cellulaire, limitant le potentiel de division de la GMC à une seule division. Lorsqu'elle se divise la GMC donne finalement deux neurones. Cependant, suivant la lignée dont elle est issue, une GMC peut aussi donner deux cellules gliales ou une cellule gliale et un neurone.

III. La régulation hormonale chez la drosophile.

A. Historique de la mise en évidence du rôle des hormones.

De nombreuses études préliminaires, débutant avec Kopec en 1917 et s'étalant sur près de 20 ans, ont permis de montrer que la métamorphose était d'une part déclenchée par une hormone et d'autre part que celle-ci était synthétisée au niveau du cerveau des animaux. Cette hormone, l'ecdysone (du grec *ecdysis* signifiant mue), a pour la première fois été isolée, purifiée et cristallisée par Karlson et Butenandt en 1954, ils en obtiennent 25mg à partir de 500 kg de nymphes de vers à soie ce qui permet de déterminer que l'hormone fait partie de la famille des stéroïdes.

Clever et Karlson montrèrent quant à eux en 1960 que l'ecdysone agissait au niveau du noyau des cellules où elle était capable d'induire la formation de "puffs", sortes de boursouflures situées au niveau des chromosomes polytènes.

En 1965, Huber et Hoppe parviennent à déterminer précisément la formule de l'ecdysone: la 2bêta, 3bêta, 14alpha, 22R, 25-pentahydroxy-5bêta-cholest-7-ène-6-one.

En fait chez la drosophile, il est généralement admis que la 20-hydroxy-ecdysone (20-OH-ecdysone), et non pas l'ecdysone, est l'ecdystéroïde le plus actif. Aussi, dans un souci de simplification, nous emploierons ici, sauf mention contraire, le terme d'ecdysone pour désigner la 20-OH-ecdysone.

B. Schéma général de la voie de synthèse de l'ecdysone.

La synthèse de l'ecdysone se fait à partir du cholestérol (Figures 15 et 16), cependant la drosophile dépend entièrement de son alimentation et des stéroïdes qu'elle y trouve pour la fabriquer. Le cholestérol est élaboré au niveau de l'intestin puis est secrété dans l'hémolymph pour enfin être assimilé par la glande prothoracique. Dans cet organe associé au cerveau, se réalisent de nombreuses réactions biologiques catalysées par plusieurs enzymes, dont certaines appartiennent à la famille des cytochromes P450. Au niveau cellulaire, une partie de ces transformations chimiques se produit dans le cytoplasme et une autre dans les mitochondries. Aujourd'hui encore, certains intermédiaires chimiques et de nombreuses enzymes participant à la production de l'ecdysone n'ont pas encore été identifiés.

Les glandes prothoraciques produisent l'ecdysone aussi appelée α -ecdysone, cependant la biosynthèse de la β -ecdysone n'a pas lieu dans les glandes prothoraciques elles mêmes, mais dans certains tissus périphériques, principalement le corps gras (Figure 16).

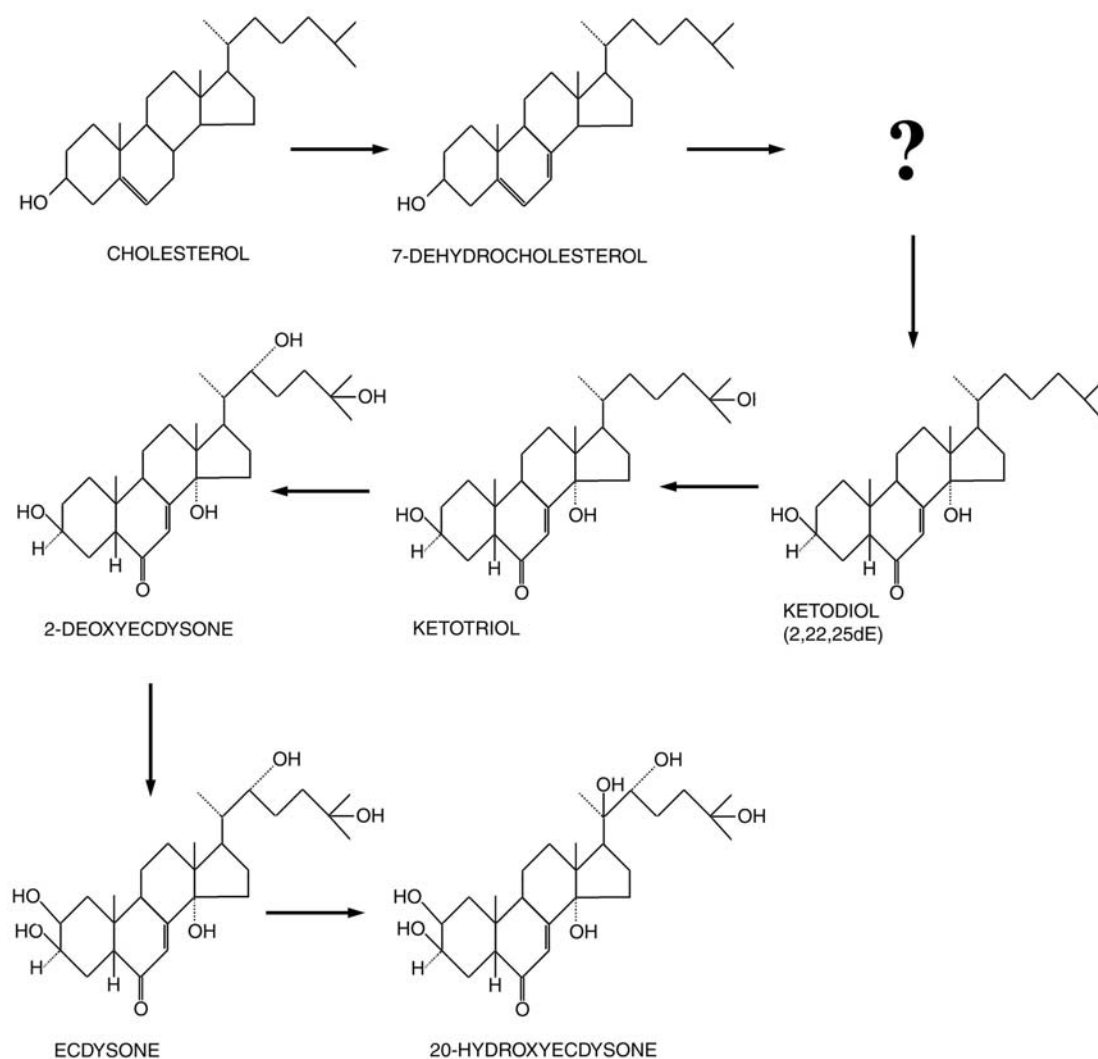


Figure 15. Voie de synthèse de la 20-hydroxy-ecdysone à partir du cholestérol chez la drosophile. Le point d'interrogation symbolise les intermédiaires chimiques encore inconnus. (Adaptée de Warren *et al.*, 2002)

La sécrétion de l' α -ecdysone dans l'hémolymphe est déclenchée par une autre hormone, l'hormone prothoracicotrope ou PTTH. Lorsque la larve atteint une certaine taille, la PTTH est sécrétée par quelques cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis*, au niveau du cerveau, puis est transférée via les axones jusque dans les *corpora cardiaca*, des organes neurohumoraux associés également au cerveau, où elle sera stockée avant d'être sécrétée. Chez la drosophile, les glandes prothoraciques sont incorporées dans un complexe endocrinien, la "ring gland" ou anneau de Weismann, qui, outre les deux glandes prothoraciques fusionnées, comprend la *corpora allata* impliquée dans la sécrétion de l'hormone juvénile et les *corpora cardiaca*.

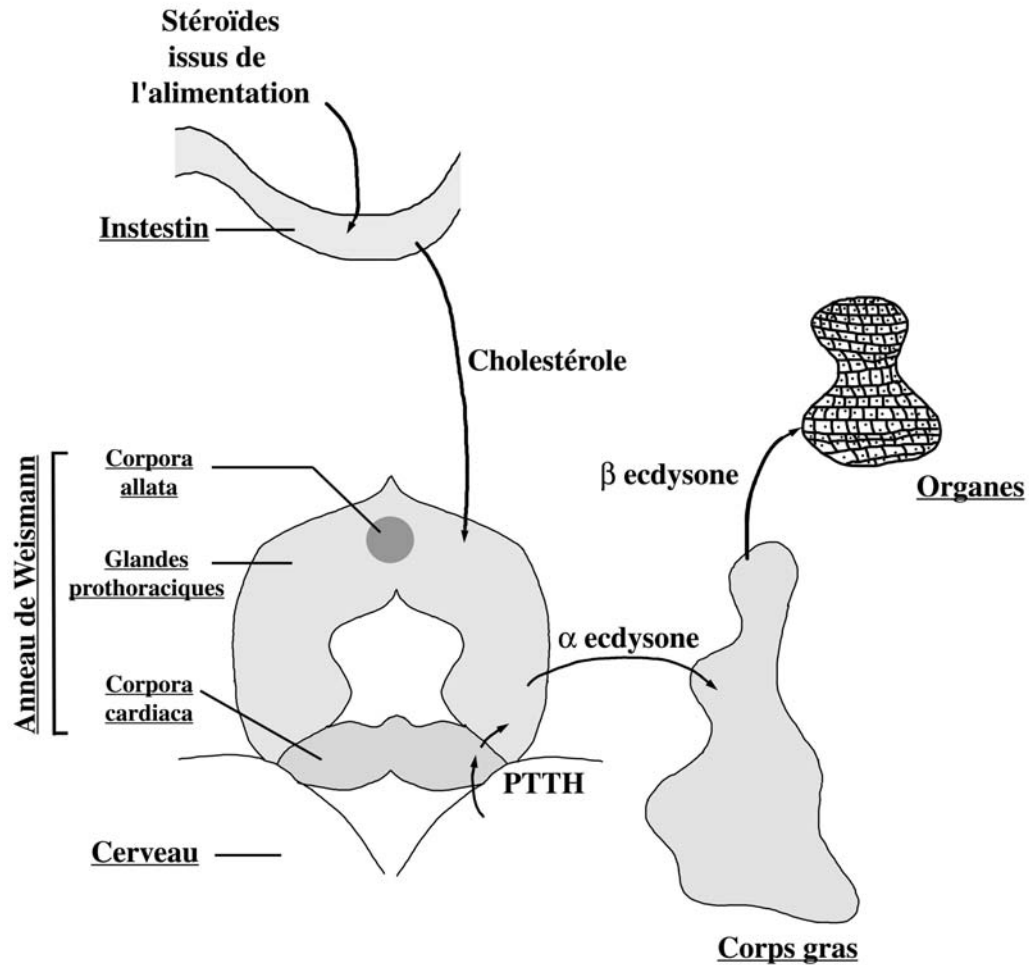


Figure 16. La sécrétion de la 20-hydroxy-ecdysone. Les stéroïdes contenus dans l'alimentation sont assimilés par l'intestin pour y être transformés en cholestérol. Le cholestérol sert de point de départ à la synthèse d' α -ecdysone dans la glande prothoracique. L' α -ecdysone sous l'effet de l'hormone prothoracicotrope est libérée dans l'hémolymphe. L' α -ecdysone pénètre le corps gras pour y être transformée en β -ecdysone, forme active de l'ecdysone à l'origine des réponses hormonales au sein des différents organes.

Une fois dans l'hémolymphe, l' α -ecdysone va être assimilée par le corps gras pour y être convertie en β -ecdysone grâce à la 20-mono-oxygénase.

Chez la drosophile, la glande prothoracique est détruite au cours de la métamorphose, elle n'est donc pas présente chez l'adulte. Cependant, des ecdystéroïdes peuvent tout de même être synthétisés au niveau des ovaires pour y être déposés dans les oocytes sous forme de conjugués qui seront utilisés par l'embryon jusqu'à ce que celui-ci puisse les produire lui-même.

C. Le récepteur de l'ecdysone.

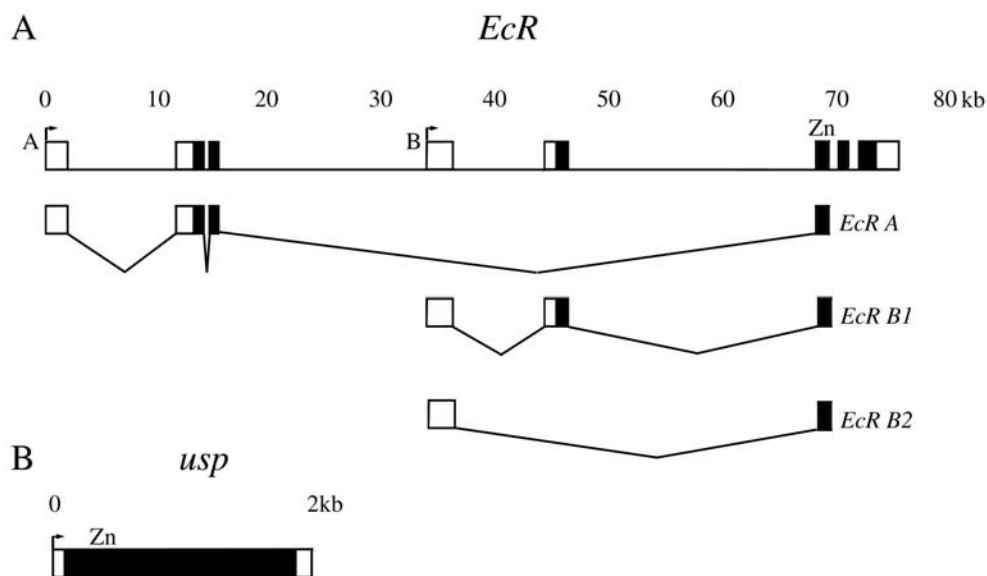
La forme sous laquelle l'ecdysone circule dans l'hémolymphe de la drosophile n'est pas connue. Malgré son caractère lipophile, elle se dissout relativement bien dans les solutions aqueuses et pourrait circuler librement dans l'hémolymphe. Pourtant, il n'est pas exclu qu'elle puisse se fixer de manière non spécifique aux protéines qui circulent avec elle dans l'hémolymphe. De la même manière, la façon dont l'ecdysone pénètre dans les cellules et traverse la membrane cytoplasmique n'est pas élucidée, même s'il est fort probable que l'hormone grâce à son caractère lipophile traverse passivement cette membrane. Une fois dans la cellule, l'ecdysone peut se fixer sur son récepteur: l'hétérodimère Ecdysone Receptor/Ultraspiracle (Yao *et al.*, 1992).

EcR (Ecdysone Receptor) est un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires (Koelle *et al.*, 1991) dont il présente les cinq domaines caractéristiques: le domaine A/B qui contient le domaine d'activation AF1, le domaine C qui est le domaine de fixation à l'ADN et qui présente deux doigts de zinc, le domaine charnière D, le domaine E capable de fixer l'ecdysone et contenant un second domaine d'activation AF2 et enfin le domaine F.

USP (Ultraspiracle) est aussi un récepteur nucléaire (Oro *et al.*, 1990; Henrich *et al.*, 1990; Shea *et al.*, 1990), qui est l'homologue de RXR (Retinoid X Receptor) des vertébrés mais jusqu'à ce jour aucun ligand *bona fide* n'a pu lui être associé bien que des expériences de cristallisation ont mis en évidence la présence d'une molécule phospholipidique dans la poche de fixation réservée au ligand (Billas *et al.*, 2001; Clayton *et al.*, 2001).

Dans le complexe EcR/USP, l'ecdysone se fixe uniquement sur EcR bien que USP soit indispensable à cette fixation. Une fois formé, le complexe ecdysone/EcR/USP est capable de reconnaître et de se fixer sur certaines séquences génomiques consensus: les éléments de réponse à l'ecdysone (EcRE) (Riddihough and Pelham, 1987; Cherbas *et al.*, 1991; Antoniewski *et al.*, 1996) et cette fixation va favoriser la transcription des gènes contenant de tels éléments de réponse dans leurs régions régulatrices. Le gène *EcR* code à partir de deux promoteurs pour trois isoformes différentes (Figure 17A). Le promoteur le plus distal permet la formation de EcRA tandis que le promoteur proximal permet de former EcRB1 et B2. Les trois protéines ne diffèrent que par leur domaine A/B. Contrairement à *EcR*, le gène *usp* ne code que pour un seul transcrit (Figure 17B) mais il semble que celui-ci possède au moins deux sites d'initiation de la traduction (Henrich *et al.*, 1994). Ainsi la possibilité de former différents hétérodimères ouvre la possibilité de former au moins trois complexes EcR/USP distincts, permettant d'apporter une régulation plus spécifique entre différents tissus suivant

les combinaisons de récepteurs qui y sont exprimées à un moment donné (Bender *et al.*, 1997; Talbot *et al.*, 1993).



D. L'action de l'ecdysone dans la glande salivaire au cours des réponses hormonales de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal.

1. La réponse à l'ecdysone dans la glande salivaire: l'étude des "puffs".

L'étude des réponses à l'ecdysone au niveau moléculaire débute par les travaux de Ashburner sur les "puffs". Les "puffs" sont des sortes de gonflements observables au niveau des chromosomes polytènes et qui apparaissent et disparaissent dans un ordre bien précis entre le milieu du troisième stade larvaire et la fin du stade prépupal (Becker, 1959). Les "puffs" ont été étudiés essentiellement dans la glande salivaire et durant cette période car c'est là que les chromosomes polytènes contenus dans le noyau des glandes salivaires ont le plus important degré de polyténie et sont ainsi le plus facilement observables.

Ashburner et ses collaborateurs ont étudié le comportement des "puffs" grâce à des expériences de cultures *in vitro* de glandes salivaires d'âge déterminé, en présence ou non d'ecdysone et avec ou sans inhibiteur de transcription. Ces travaux, appuyés par ceux d'autres équipes, permettent à Ashburner de proposer un modèle de réponse hormonale dans ce tissu (Figure 18, Ashburner *et al.*, 1974). Etant donné, que les "puffs" sont en fait le reflet de

l'activité transcriptionnelle de certains gènes qu'ils contiennent, Ashburner propose dans son schéma que le complexe composé de l'ecdysone couplée à son récepteur induit l'expression d'un nombre limité de gènes responsables des "puffs" précoces, tout en réprimant l'expression des gènes responsables de la formation "puffs" tardifs. Les produits des gènes précoces quant à eux répriment leur propre expression et permettent l'expression de nombreux gènes tardifs. Ce modèle inclut les transcrits précoces et tardifs, mais il existe également des transcrits qualifiés d'intermue et de précoces-tardifs dont l'expression dépend également du taux d'hormone.

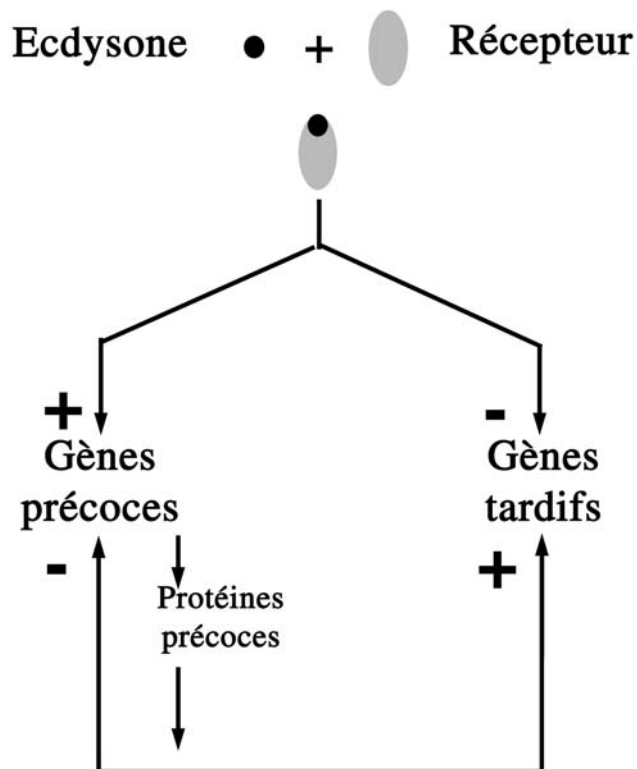


Figure 18. Le modèle fondamental proposé par Ashburner *et al.* (1974). Le complexe formé par l'ecdysone et son récepteur active un certain nombre de gènes précoces tout en réprimant les gènes tardifs. En retour, les protéines issues de l'expression des gènes précoces répriment leur propre expression tout en participant à l'induction des gènes tardifs.

2. Description générale d'une réponse hormonale.

Lorsque le taux d'ecdysone commence à s'accroître dans l'hémolymphe de la drosophile, l'hormone pénètre dans les cellules des glandes salivaires et se fixe sur son récepteur. Le complexe ainsi formé se fixe au niveau des régions régulatrices d'un petit nombre de gènes et va permettre leur induction. Les transcrits dont l'expression dépend directement de l'ecdysone sont qualifiés de transcrits précoces. Le modèle d'Ashburner prévoit que ces gènes sont essentiellement des gènes régulateurs qui, une fois exprimés, vont permettre à certains autres transcrits induits par l'ecdysone d'être induits de façon optimale: ceux-ci sont les transcrits précoces-tardifs. D'autre part, les produits des transcrits précoces induisent également de nombreux autres transcrits non directement induits par l'ecdysone: les transcrits tardifs, qui selon le modèle doivent être pour le plupart des transcrits codant pour des protéines effectrices. Enfin les produits des transcrits précoces répriment leur propre expression, ce qui a pour conséquence de limiter dans le temps la durée d'une réponse hormonale.

a. Les principaux transcrits précoces.

Au début de la réponse à l'ecdysone de fin de troisième stade larvaire, six "puffs" précoces sont induits par l'hormone.

Le "puff" 2B5 renferme le *Complexe Broad (BR-C)* qui se révèle être d'une grande complexité (Figure 19) et pour lequel pas moins de 11 ADNc, issus de trois promoteurs différents et d'épissages alternatifs, ont pu être observés (DiBello *et al.*, 1991). Cependant, il semble que ces ADNc ne codent que pour quatre protéines différentes. La partie N-terminale de ces quatre protéines, BR-C Z1, Z2, Z3 et Z4, est commune tandis que leur partie C-terminale varie par l'incorporation d'un doigt de zinc différent parmi les quatre possibles présents sur la séquence génomique. Les séquences protéiques tendent à laisser penser que les quatre protéines BR-C codent pour des facteurs de transcription (DiBello *et al.*, 1991; Bayer *et al.*, 1996).

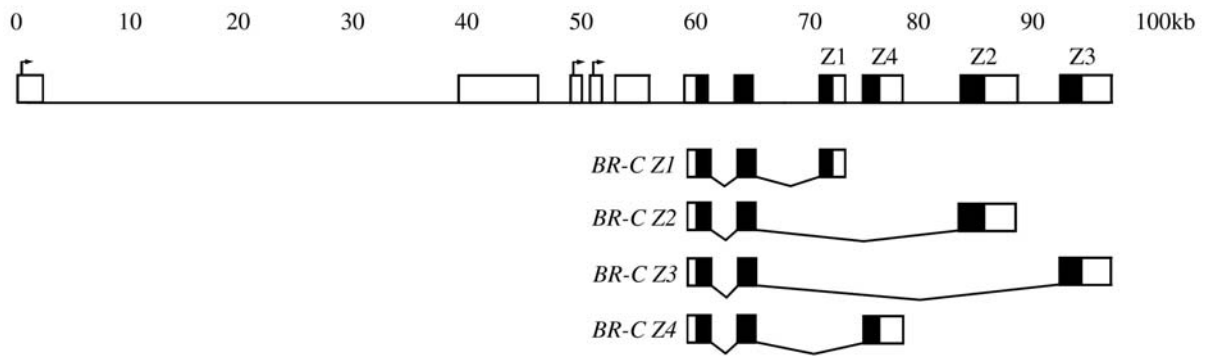


Figure 19. Organisation génomique du locus du gène *BR-C*. *BR-C* code pour au moins quatre transcrits: *BR-C Z1*, *Z2*, *Z3* et *Z4* à partir de trois promoteurs différents. Les exons sont représentés par des boîtes, les séquences codantes étant remplies en noir. (D'après Richards, 1997)

Le "puff" précoce 74E/F résulte de l'induction d'*E74A*, une des deux isoformes du gène *E74* avec *E74B*. *E74A* et *B* sont obtenus par l'utilisation de deux promoteurs différents. Les protéines *E74A* et *B* sont relativement différentes entre elles mais ont en commun dans leur partie C-terminale un motif *ets* qui les classe dans la superfamille des facteurs de transcription à *ets* (Janknecht *et al.*, 1989; Burtis *et al.*, 1990, Figure 20).

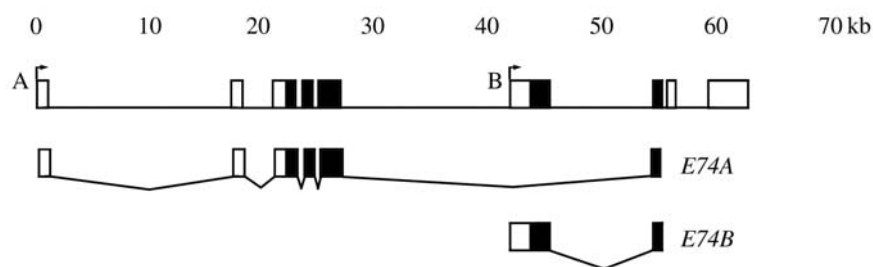


Figure 20. Organisation génomique du gène *E74*. *E74* code pour deux transcrits *A* et *B* à partir de deux promoteurs distincts. Les exons sont représentés par des boîtes, les séquences codantes étant remplies en noir. (D'après Richards, 1997)

L'étude par Segraves du "puff" 75B a initialement mis en évidence deux transcrits codés par le gène *E75* (Segraves, 1988), cependant plus tard Feigl *et al.* (1989) ont isolé un troisième transcrit. Chacune des trois isoformes, *E75A*, *B* et *C*, résulte de l'utilisation de trois promoteurs distincts et, tout comme *BR-C*, de l'existence d'épissages alternatifs (Figure 21). Tandis que *E75A* et *C* portent les deux doigts de zinc caractéristiques des récepteurs nucléaires, *E75B* est dépourvu de l'un de ces doigts de zinc (Figure 21). L'analyse de la séquence d'*E75A* a montré que celui-ci était un homologue du récepteur nucléaire des vertébrés Rev-erbA. De plus, à ce jour, aucun ligand n'a pu être associé à l'une de ces isoformes.

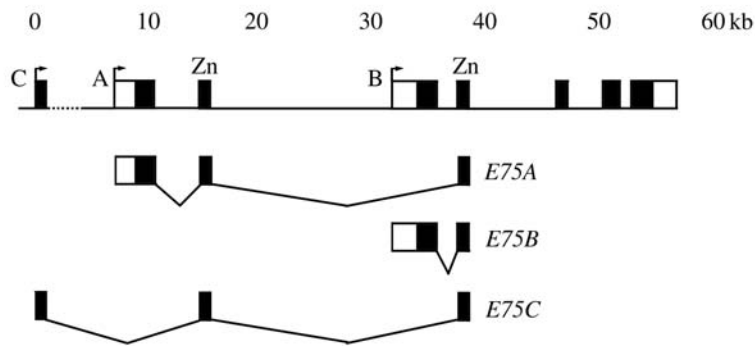


Figure 21. Organisation génomique du gène *E75*. *E75* code pour trois transcrits différents *E75A*, *B* et *C* à partir de trois promoteurs différents. Zn désigne une partie de la séquence codant pour un doigt de zinc. *E75A* et *C* codent chacun pour deux doigts de zinc tandis que *E75B* ne code que pour un seul. Les exons sont représentés par des boîtes, les séquences codantes étant remplies en noir. (D'après Richards, 1997)

Parmi tous les transcrits décrits plus haut, seuls *BR-C Z1*, *E74A*, *E75A* et *B* peuvent être qualifiés de transcrits précoces dans la mesure où ils sont directement induits par l'ecdysone couplée à son récepteur.

Enfin, Baehrecke et Thummel (1995) ont isolé et caractérisé le gène dont l'expression est responsable du "puff" précoce 93F, observé au cours de la réponse hormonale de fin de stade pré-pupal, mais pas pendant la réponse de fin de troisième stade larvaire. Le gène en question est *E93*, il n'a pas d'homologue connu mais l'analyse de sa séquence permet de penser qu'il code pour une protéine nucléaire capable de se fixer l'ADN.

Il faut remarquer qu'ont également été isolés dans le "puff" précoce 63C, deux gènes précoces *E63-1* et *E63-2*, qui ne codent pas pour des facteurs de transcription mais, dans le cas de *E63-1*, pour une protéine homologue à des protéines fixatrices d'ion calcium Ca^{2+} (Andres and Thummel, 1995; Vaskova *et al.*, 2000). Quant à *E63-2*, aucun cadre de lecture évident n'a pu être mis en évidence jusqu'à maintenant et sa séquence ne présente pas d'homologies avec d'autres séquences connues (Andres and Thummel, 1995). *E23*, qui code une protéine présentant des motifs semblables à ceux retrouvés dans des transporteurs comportant une cassette de fixation à l'ATP (Hock *et al.*, 2000), présente aussi les caractéristiques d'un gène précoce de la réponse à l'ecdysone, bien que ne codant pas non plus pour un facteur de transcription.

b. Les principaux transcrits précoces-tardifs.

Le gène *E78* contenu dans le "puff" précoce-tardif 78D code pour deux isoformes, *E78A* et *B* (Stone and Thummel, 1993). Les différences qui existent entre les deux isoformes rappellent les différences existant entre *E75A* et *E75B*. En effet, *E78A*, comme *E75A*, est un homologue du récepteur nucléaire Rev-erb des vertébrés tandis que *E78B* présente un motif de fixation à l'ADN incomplet comme c'est le cas pour *E75B*. Cependant, seul *E78B* peut être classé parmi les transcrits précoces-tardifs.

DHR3 (*Drosophila hormone receptor 3*) codant pour un récepteur nucléaire a également pu être isolé et caractérisé (Koelle *et al.*, 1992). Le gène *DHR3* est situé dans le "puff" précoce-tardif 46F et code pour un homologue de *ROR α* présent chez les vertébrés. Le gène *DHR3* code pour au moins trois transcrits mais les différences existant entre eux restent inconnues pour l'heure.

DHR39 est un autre gène codant pour un récepteur nucléaire dont l'expression présente les caractéristiques des transcrits précoces-tardifs. *DHR39* a initialement été isolé en 1992 par Ohno et Petkovich sur la base de sa forte homologie avec *FTZ-F1*.

c. Les principaux transcrits tardifs.

Il existe plus d'une centaine de "puffs" tardifs et le modèle d'Ashburner prévoit que ceux-ci résultent de l'expression de transcrits dont les protéines ont un rôle effecteur plutôt que régulateur. Malgré leur nombre important, peu d'études leur ont été consacrées. Le "puff" 71E contient sept gènes codant pour des protéines antimicrobiennes homologues aux défensines des vertébrés et à des toxines que l'on trouve dans certains venins (Restifo and Guild, 1986; Wright *et al.* 1996).

Le gène *L82* est aussi un gène tardif de la réponse à l'ecdysone et code pour une protéine nécessaire au développement mais sans homologue connu (Stowers *et al.*, 1999).

Enfin, récemment a pu être caractérisé le gène *L63* qui code pour plusieurs isoformes de la famille des kinases cyclines-dépendantes (Stowers *et al.*, 2000).

d. Les principaux transcrits d'intermue.

Les transcrits d'intermue sont exprimés lorsque le taux d'hormone est bas, l'augmentation du titre de l'ecdysone entraînant leur répression.

Les premiers transcrits d'intermue à être caractérisés sont des transcrits de gènes codant pour des protéines de la glu (Korge, 1975; Muskavitch and Hogness, 1980; Meyerowitz and Hogness, 1982). La glu est une sorte de colle produite et sécrétée par les glandes salivaires pour favoriser la fixation du puparium au support sur lequel l'animal s'empuqe.

En se basant sur la définition de ce qu'est un transcrit d'intermue, on peut mettre dans cette catégorie *E74B* et *E75C* bien que leurs gènes respectifs soient localisés dans des "puffs" précoces. De la même façon, on peut considérer que *EcR1* et *EcR2* appartiennent également à l'ensemble des transcrits d'intermue.

Le gène *FTZ-F1*, situé dans le "puff" 75CD (Lavorgna *et al.*, 1991, 1993; Ueda *et al.*, 1990), code pour deux transcrits α *FTZ-F1* et le transcrit d'intermue β *FTZ-F1*. Contrairement aux gènes codant pour les protéines de la glu, β *FTZ-F1* n'est pas induit avant la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire mais lorsque celle-ci se termine et avant que ne débute la réponse hormonale de fin de stade pré-pupal. β *FTZ-F1* code pour un autre récepteur nucléaire et comme pour les autres précédemment décrits, excepté *EcR*, aucun ligand n'a pu encore lui être associé.

3. Aperçu de la régulation des réponses à l'ecdysone dans la glande salivaire au cours de la métamorphose.

a. La réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire.

A partir du milieu du troisième stade larvaire, lorsque le taux d'ecdysone est encore faible, l'expression de *BR-C* et *E74B* dans les cellules des glandes salivaires permet l'induction des gènes de la glu et donc la production de la glu qui sera sécrétée en fin de stade larvaire (Figure 22). *EcR* est aussi exprimé avec *BR-C* et *E74B* en milieu de troisième stade larvaire, cependant lorsque le taux d'ecdysone augmente, on observe que *EcR* et *E74B* sont réprimés tandis que *BR-C* continue à être exprimé, insensible au fort taux d'hormone et que *E74A*, l'autre isoforme d'*E74*, est quant à lui induit (Huet *et al.*, 1993). Des expériences de culture de glandes salivaires *in vitro* montrent que les promoteurs de *BR-C*, *EcR* et *E74B* sont plus sensibles à l'ecdysone que ne l'est le promoteur d'*E74A* (Karim and Thummel, 1991, 1992), ce qui pourrait expliquer le décalage dans l'expression de ces transcrits. Ainsi, le faible taux d'hormone existant au milieu du troisième stade larvaire est suffisant pour induire *BR-C*, *EcR* et *E74B* par contre, lorsque le taux d'hormone augmente, cela a pour conséquence la répression de *EcR* et *74B* mais l'induction d'*E74A* tandis que *BR-C*, insensible au fort taux

d'hormone, continu à être exprimé et participe à la répression des gènes de la glu (Guay and Guild, 1991). D'autre part à ce stade, à la fin du troisième stade larvaire, lorsque le taux d'ecdysone est important, l'expression concomitante de *BR-C* (notamment l'isoforme *Z1*) et d'*E74A* permet l'expression du gène tardif *L71* (Fletcher and Thummel, 1995a). De plus l'expression de *BR-C* (essentiellement *BR-C Z3*) va également permettre son induction maximale ainsi que celles d'*E74A* et *E75A* (Karim *et al.*, 1993).

Parallèlement à cela, on observe que la transcription d'*E78B* fait suite à celle d'*E74A* (Stone and Thummel, 1993; Huet *et al.*, 1995). *E78B*, qui fait partie de la catégorie des transcrits précoces-tardifs est directement induit par l'ecdysone mais un ou plusieurs facteurs sont nécessaires à son induction maximale et *E74A* pourrait justement coder pour l'un de ces facteurs (Fletcher and Thummel, 1995b).

b. La réponse hormonale de fin de stade prépupal.

En milieu de stade prépupal, le taux d'ecdysone est faible, la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire est terminée. Si à ce stade la réponse de fin de stade prépupal n'a pas encore commencé, les cellules des glandes salivaires "se préparent" pourtant à répondre à l'augmentation du titre d'ecdysone qui va suivre. Cette préparation se caractérise par l'expression de *βFTZ-F1* (Figure 22) et la réinduction de EcR. *βFTZ-F1* est considéré comme étant un facteur de compétence, c'est à dire que son expression avant l'augmentation du taux d'hormone est nécessaire pour rendre apte la cellule à répondre de manière adéquate à l'ecdysone.

Ainsi lorsque le taux d'ecdysone augmente à nouveau et que débute la réponse hormonale de fin de stade pupal, *βFTZ-F1* permet la ré-induction de *BR-C*, *E74A* et *E75A* et ce, tout en réprimant sa propre expression (Woodard *et al.*, 1994). *βFTZ-F1* induit aussi directement l'expression d'*E93* indispensable à la destruction des glandes salivaires en fin de stade prépupal.

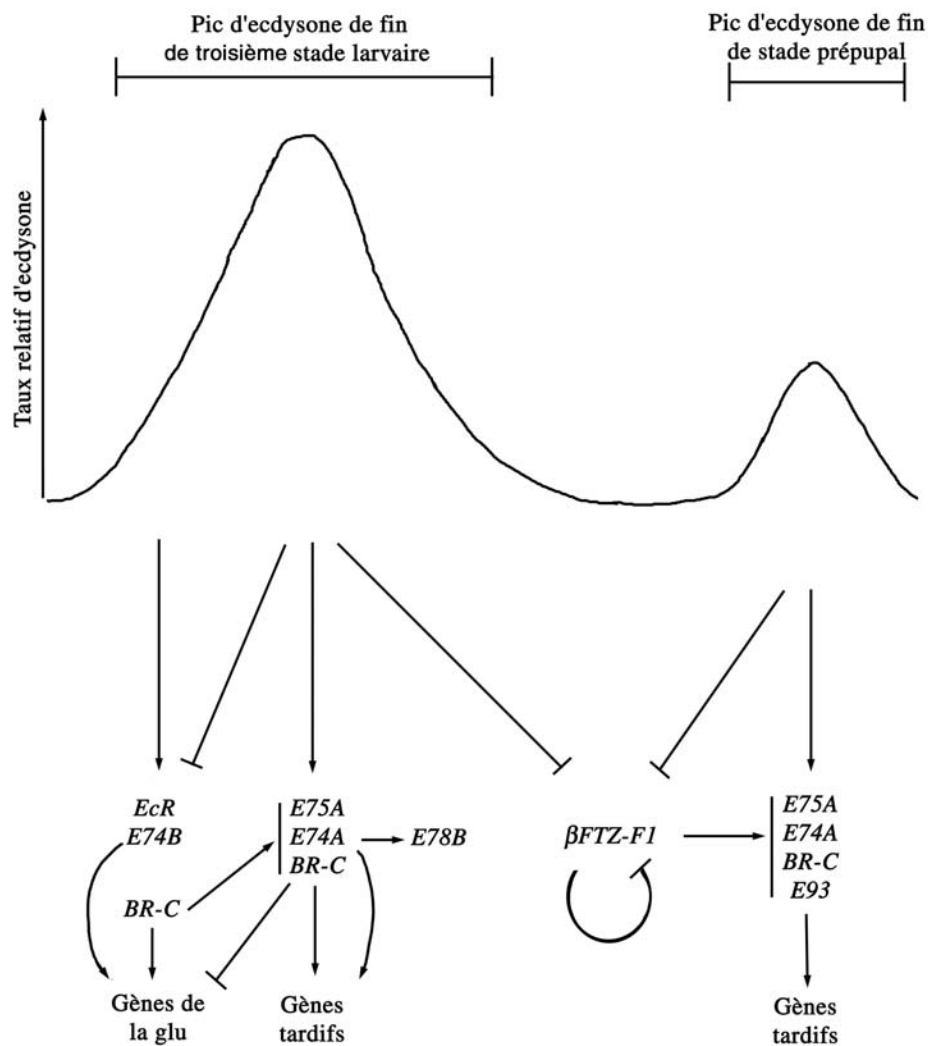


Figure 22. Aperçu du réseau de régulation mis en place dans les glandes salivaires au cours des réponses hormonales de fin de stade larvaire et de fin de stade prépupal. La courbe de la partie supérieure du schéma représente la variation relative du taux d'ecdysone au cours du temps. Dans la partie inférieure, chaque gène est placé en fonction du moment de son expression et suivant le taux relatif d'hormone alors observé. (Adaptée de Thummel, 1996.)

L'ensemble des relations de régulation qui peuvent exister entre toutes ces protéines tant régulatrices qu'effectrices est loin d'être entièrement connu et de nombreuses questions restent encore posées. Au fur et à mesure que progressent les connaissances sur les réponses hormonales à l'ecdysone, il apparaît que ces réponses forment un véritable réseau de régulation plutôt qu'une suite linéaire d'inductions et de répressions. Il serait notamment très intéressant de mieux comprendre comment un même stimulus: une augmentation du taux d'ecdysone, peut aboutir à deux réponses différentes à la fin du troisième stade larvaire et à la fin du stade prépupal. Aussi, c'est dans une étude ayant pour but d'isoler un nouveau facteur qui serait spécifiquement impliqué dans la réponse hormonale de fin de stade prépupal qu'a été isolé le gène *Krüppel-homolog*.

E. La mise en évidence de *Krüppel-homolog*.

La souche $\Delta I:3$, issue d'une étude par transgénèse d'un gène *sgs3* sans intron, par insertion aléatoire d'éléments P par Mettling *et al.* en 1987, a la particularité de présenter une létalité des individus homozygotes pour l'insertion du transposon à la fin du stade prépupal. Ces animaux mutants sont capables de passer sans encombre la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire mais échouent à passer la réponse hormonale de fin de stade prépupal. Les individus homozygotes sont incapables de procéder à l'éversion de la tête qui marque l'entrée dans le stade pupal. Ce défaut d'éversion de la tête est dû en fait à un problème dans le déplacement de la bulle de gaz, qui normalement se forme à l'intérieur du puparium et qui par ses déplacements facilite certains changements morphologiques. De plus chez ces animaux, on observe que les glandes salivaires normalement histolysées à ce moment sont encore présentes 24 ou 36 heures plus tard. Le gène, dont l'expression est perturbée par l'insertion de l'élément P, semblait donc un bon candidat pour coder une molécule indispensable à cette seconde réponse hormonale.

Le gène muté dans cette souche a été isolé et caractérisé, une courte séquence d'environ 320 paires de base avait déjà été décrite par Schuh *et al.* en 1986 qui l'avait alors baptisé *Krüppel-homolog* (*Kr-h*) en raison de l'homologie entre les doigts de zinc pour lesquelles ce fragment codait et ceux codés par le gène de segmentation *Krüppel*.

IV. La mort cellulaire programmée chez la drosophile.

A. Les différents types de mort cellulaire.

1. Généralités

La mort cellulaire fait partie intégrante du développement normal d'un organisme, mais aussi de sa vie au quotidien dans la mesure où elle peut être la conséquence de stimuli provenant de son environnement.

Classiquement, on peut distinguer deux grands types de mort cellulaire. Il y a tout d'abord la mort cellulaire dite programmée, qui se réalise suivant un plan bien déterminé, bien hiérarchisé, sous contrôle génétique et qui est une véritable fonction biologique. La mort cellulaire programmée se distingue de la nécrose, qui apparaît plus comme la conséquence

d'une impossibilité à rétablir un équilibre biologique compatible au maintien des fonctions biologiques de base de la cellule.

La mort cellulaire programmée est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Ainsi, elle intervient au cours du développement pour ôter les cellules surnuméraires, permettre de façonner des membres (comme les doigts), elle joue un rôle dans l'entretien normal de l'organisme afin d'éliminer les cellules trop vieilles, elle intervient aussi dans la défense contre des éléments pathogènes en éliminant des cellules malades ou trop gravement infectées. Malheureusement son dérèglement peut être à l'origine de graves problèmes. Un certain nombre de maladies sont associées à une inhibition de l'apoptose, c'est le cas pour certains cancers, tels que le cancer du sein, pour certaines maladies auto-immunes ou la conséquence d'infections causées par des virus comme les adénovirus. A l'opposé, de nombreuses pathologies montrent un excès d'apoptose, c'est le cas du SIDA, de certaines maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer ou maladie de Parkinson par exemple) ou certaines maladies du foie provoquées par des produits toxiques comme l'alcool (Thompson, 1995).

La mort cellulaire programmée peut être divisée en deux grands types: l'apoptose et la mort cellulaire lysosomale aussi appelée autophagie. Un troisième type de mort cellulaire programmée a également été décrit: la mort cellulaire programmée non lysosomale, mais celle-ci semble beaucoup moins répandue et très peu décrite (Schweichel and Merker, 1973).

2. L'apoptose.

L'apoptose, d'une façon générale, concerne des cellules isolées. On observe une perte d'adhérence de la cellule vis-à-vis des cellules voisines ou de la matrice extracellulaire. La chromatine s'agglutine sur les bords de la membrane nucléaire et le cytoplasme se fragmente. La cellule finit par former des sortes de vacuoles qui vont par la suite être phagocytées. Les mitochondries jouent un rôle très important dans le déroulement de l'apoptose. Leurs membranes semblent demeurer intactes, mais on observe cependant que celles-ci subissent une dépolarisation. La dépolarisation des membranes mitochondriales va induire la libération de cytochrome c. Les cytochromes c vont alors intervenir dans toute une chaîne de réactions qui va aboutir à l'activation de caspases et de protéases. Les caspases ("CysteinyI ASPartate specific proteASE") sont des protéases capables de couper spécifiquement les protéines au niveau notamment de séquences consensus contenant un ou deux résidus aspartates

(Nicholson, 1999). Ainsi protéases et caspases vont détruire de nombreux éléments du cytosquelette, des éléments de réparation cellulaire, inactiver les inhibiteurs de l'apoptose et endommager la matrice nucléaire favorisant l'entrée de DNase dans le noyau, qui va alors couper l'ADN entre les nucléosomes.

La disparition d'une cellule mourante se produit très rapidement, entre une et deux heures, grâce à l'action de phagocytes ou/et des cellules voisines. Les phagocytes reconnaissent ces cellules car elles exposent sur leur surface extracellulaire des signaux comme la phosphatidylsérine (Savill, 1998).

3. L'autophagie.

L'autophagie concerne plus particulièrement un ensemble de cellules, voire même un tissu entier. Les cellules subissant ce phénomène sont plus généralement de grosses cellules quiescentes et post-mitotiques. La mort par autophagie montre un certain nombre de caractères semblables à ceux observés au cours de l'apoptose. Au cours de l'autophagie, apparaissent dans le cytoplasme des cellules de grosses vacuoles contenant divers dérivés lysosomaux qui vont digérer un certain nombre de composés et d'organelles cellulaires (Lee and Baehrecke, 2001). Lorsque environ 80% du cytoplasme est digéré, on observe la condensation du cytoplasme restant et de l'ADN. Pour terminer les cellules sont phagocytées comme c'est le cas au cours de l'apoptose.

4. La mort cellulaire non lysosomale.

La mort cellulaire programmée non lysosomale a été initialement décrite par Schweichel et Merker (1973) dans une étude portant sur la morphologie caractérisant la mort cellulaire de différents tissus prénataux. Baehrecke et ses collègues se basant sur cette étude rapportent l'apparition de cavités se formant à partir des membranes plasmiques, phénomène suivi par une dégénération n'impliquant pas la participation des lysosomes (Lee *et al.*, 2002). Cependant d'une manière générale, la mort cellulaire programmée non lysosomale a été très peu décrite.

5. La nécrose.

La nécrose apparaît plus comme une suite d'événements chimiques qu'un réel processus biologique. Lorsqu'une cellule est trop sérieusement endommagée, les fonctions mitochondriales ne peuvent plus être assurées, il se déclenche donc une glycolyse qui conduit à une accumulation d'acide lactique dans la cellule, le pH de la cellule baisse. L'acide lactique s'accumule, provoquant une augmentation de la pression osmotique de la cellule, ce qui entraîne un afflux important d'eau avec pour conséquence la lyse de la cellule. Les nombreux composés contenus dans la cellule se répandent dans le tissu. Parmi ces composés, un certain nombre attirent les mastocytes qui vont déclencher un phénomène d'inflammation.

S'il est souvent pratique de séparer ces différents mécanismes de mort cellulaire, il faut cependant avoir conscience qu'il existe en fait une certaine continuité entre eux. Ainsi la nécrose apparaît le plus souvent comme le résultat d'un mécanisme d'apoptose qui n'a pu arriver à son terme, interrompu plus ou moins précocement. Le principal facteur qui sépare mort cellulaire programmée et non programmée est en fait la possibilité pour les mitochondries d'assurer ou pas leur fonction. En effet, la réalisation de la mort cellulaire programmée nécessite la production d'énergie pour accomplir les différentes modifications morphologiques ou la présentation de phosphatidylsérine à la surface des cellules.

B. La destruction des glandes salivaires chez la drosophile.

La destruction des glandes salivaires chez la drosophile est sous contrôle de l'ecdysone, c'est la libération de l'hormone dans l'organisme en fin de stade prépupal qui va en être le point de départ (Aizenzon and Zhimulev, 1975; Jiang *et al.*, 1997). Le pic d'ecdysone se produit environ 12 heures après le début de la puparaison et il est à l'origine de la réponse hormonale de fin de stade prépupal. Lee et Baehrecke (2001) ont suivi les différentes modifications morphologiques apparaissant au cours de l'histolyse des glandes salivaires. Ainsi, dans leurs conditions de culture, lorsque le taux d'ecdysone est à son maximum, les cellules des glandes salivaires ont une forme de cube, leur membrane cytoplasmique est intacte tandis que le cytoplasme contient de grosses vacuoles pouvant être colorées par l'éosine. Le noyau contient les chromosomes qui gardent une taille importante et dont les bandes sont nettement visibles. 13 heures après la puparaison, les premiers signes de mort cellulaire sont observables, les cellules prennent une forme plus ronde, tandis que les grosses vacuoles que l'on pouvait observer préalablement commencent à se fragmenter et un nouveau

type de vacuoles apparaît, insensibles à la coloration par l'éosine et associées à la membrane cytoplasmique. Une heure plus tard se forment les premières vacuoles autophagiques contenant des structures cellulaires (dont les mitochondries). Dans les 30 minutes qui suivent, la destruction des membranes cytoplasmiques a lieu, on note alors la présence que de quelques vacuoles et l'on ne peut plus observer comme auparavant les bandes caractéristiques des chromosomes. Enfin, entre 15h et 15h30 après le début de la puparaison, soit environ trois heures et demie après le début de la réponse hormonale, Lee et Baehrecke ont pu constater que les glandes salivaires sont totalement détruites (Lee and Baehrecke, 2001).

Depuis relativement longtemps, les chercheurs étudient la régulation de la réponse hormonale dans la glande salivaire à cause des avantages qu'offrent ce tissu (dissection et culture *in vitro* faciles, présence de chromosomes polytènes et observation des "puffs" relativement aisées). Cependant ce n'est que plus récemment que les recherches s'attardent à montrer le lien entre la disparition des glandes salivaires et la réponse à l'ecdysone. La participation dans l'histolyse de la glande salivaire de certains gènes régulateurs de la réponse hormonale a pu être récemment mis en évidence. Parmi ces gènes, on trouve *βFTZ-F1*, *BR-C*, *E75* et *E74A*, ainsi qu'*E93* dont l'induction au cours de la réponse pré-pupale est responsable de la formation du puff 93F mais pour lequel aucun rôle précis n'avait pu être mis en évidence. Des mutations dans ces gènes entraînent le blocage de la mort cellulaire de la glande salivaire. L'action d'autres gènes préalablement isolés pour leur rôle dans l'apoptose, notamment chez l'embryon, a également pu être mis en évidence. C'est le cas de *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)* (Jiang *et al.*, 1997), et d'un certain nombre de caspases DRONC, DREDD, DCP-1, DRICE, DECAP1.

Au cours de la réponse hormonale pré-pupale, le complexe ecdysone/ECR/USP induit l'expression de *BR-C* et d'*E74A* (Figure 23). La présence de *βFTZ-F1* permet également l'expression d'*E93*. L'expression d'*E93* va alors favoriser l'expression de *BR-C* et *E74A*. Le complexe ecdysone/ECR/USP pourrait également induire directement l'expression de *rpr*, un activateur de l'apoptose, mais cette expression est maximale seulement lorsque *BR-C* est également induit (Jiang *et al.*, 2000). En ce qui concerne l'expression de *hid*, un autre activateur de l'apoptose, celle-ci n'est pas directement induite par l'ecdysone comme pour *rpr* mais par *BR-C* et *E74A* (Jiang *et al.*, 2000). Il semble donc que *rpr* et *hid* soient régulés par deux mécanismes différents. *E93* est également nécessaire à l'induction de *crq (croquemort)*, un récepteur reconnu par les macrophages (Lee *et al.*, 2000). Par contre *E93*, *BR-C* et *E74A* participent tous trois à la pleine expression de *dark* et *dronc*. *E93* joue un rôle central dans la destruction de la glande salivaire en déterminant l'activation des gènes de mort cellulaire.

C'est entre autres l'expression des gènes *crq*, *dark*, *dronc*, *rpr* et *hid* qui va permettre la correcte exécution de la mort cellulaire programmée de la glande salivaire.

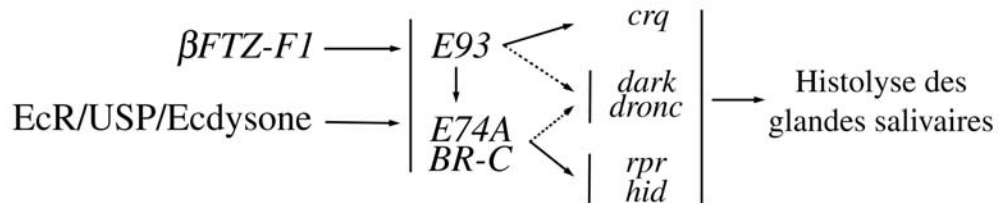


Figure 23. Modèle pour le déclenchement de l'histolyse de la glande salivaire chez la drosophile au cours de la réponse à l'ecdysone de fin de stade pré-pupal. Les flèches pleines indiquent un niveau de régulation prouvé tandis que les flèches en pointillés indiquent un possible niveau de régulation qui n'a pas encore été testé. (D'après Lee *et al.*, 2000)

Comment ces gènes participent à l'exécution de la mort cellulaire programmée n'est pas encore très bien compris. Par exemple, il semble que RPR et HID interviennent pour promouvoir la destruction d'un complexe formé par un inhibiteur de l'apoptose: DIAP1 (*Drosophila inhibitor of apoptosis 1*) et une enzyme E3 de type ubiquitine ligase (Figure 24). Sans la présence de RPR ou HID, ce complexe serait capable de provoquer l'ubiquitination de la caspase DRONC, conduisant ainsi à sa destruction, rendant impossible l'activation des caspases effectrices par DRONC. Par contre en présence de RPR ou GRIM, l'ubiquitination du complexe de DRONC par DIAP1/E3 n'a pas lieu mais ce serait ce dernier complexe qui subirait l'ubiquitination, laissant la possibilité à DRONC d'activer les caspases effectrices (Yoo *et al.*, 2002; Ryoo *et al.*, 2002). Cependant l'essentiel des études portant sur les gènes de mort concerne leur rôle au cours de l'apoptose et non au cours de l'autophagie, il n'est donc pas certain que les mêmes mécanismes d'action soient mis en jeu (Figure 24).

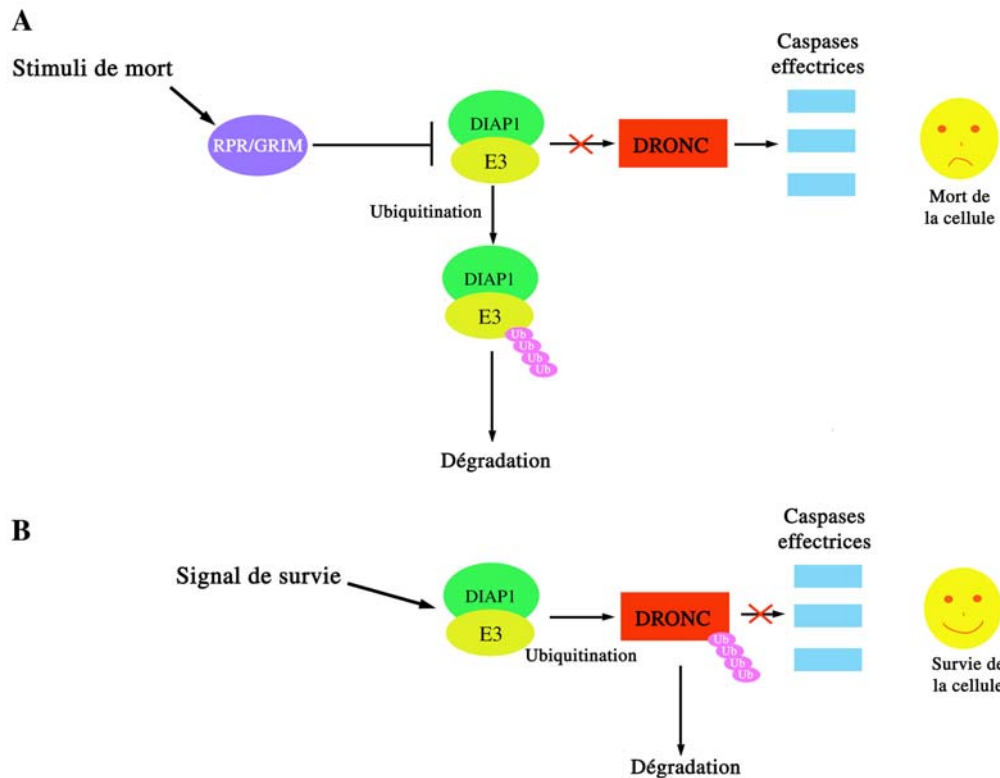


Figure 24. Régulation de l'apoptose via DIAP1. (A) Après stimulation de l'apoptose le complexe DIAP1/E3 est dégradé laissant ainsi la voie libre à DRONC pour activer les caspases effectrices dont l'action participe à la mort de la cellule. (B) Lorsque seuls des signaux de survie parviennent à la cellule, le complexe DIAP1/E3 participe à l'ubiquitination de DRONC qui va ainsi être dégradé. Les caspases effectrices ne pouvant être induites par DRONC, le cellule survit. (Adaptée de Palaga and Osborne, 2002)

Des études récentes montrent que le processus de dégradation de la cellule peut être séparé en deux parties distinctes, d'une part la destruction du cytoplasme et d'autre part la fragmentation de l'ADN contenu dans le noyau (Farkas and Mechler, 2000; Lee and Baehrecke, 2001).

L'étude morphologique de différentes mutations abolissant l'histolyse des glandes salivaires a montré un certain nombre de différences. Il semble que si *βFTZ-F1*, *BR-C*, *E74A* et *E93* sont nécessaires à la destruction de la glande, *βFTZ-F1* et *E93* seraient chacun nécessaires non seulement pour la destruction du cytoplasme mais aussi pour la fragmentation de l'ADN. On observe par contre chez les mutants *BR-C* et *E74A* la possibilité de débiter la mort cellulaire avec la destruction des membranes plasmiques, la présence de vacuoles contenant des composants cytoplasmiques et la fragmentation d'une partie de l'ADN (Lee and Baehrecke, 2001). *E93*, en régulant l'expression de *crq*, interviendrait dans le contrôle du "nettoyage" des cellules mortes par le processus d'autophagie proprement dit plutôt que par l'action de macrophages (Lee and Baehrecke, 2001). Il est intéressant de constater que l'induction ectopique de la protéine de baculovirus P35, un inhibiteur de caspases à large spectre, inhibe la fragmentation de l'ADN, par contre la destruction du cytoplasme n'est que

partiellement réduite (Farkas and Mechler, 2000; Lee and Baehrecke, 2001). Il semble que des caspases sensibles à P35 soient nécessaires à la fragmentation de l'ADN, tandis que la destruction du cytoplasme impliquerait des caspases insensibles à P35 ou d'autres types de protéases. Un certain nombre d'hypothèses sont avancées ainsi la caspase DRICE, induite dans la glande salivaire, est sensible à P35 et DRICE est justement nécessaire à l'activation de la Dnase dCAD pour que cette dernière puisse induire la fragmentation de l'ADN (Yokoyama, 2000). En ce qui concerne la destruction du cytoplasme, une autre caspase, DRONC, est insensible à P35 et de plus son expression est très peu réduite dans les mutants *E74A* (qui subissent une dégradation du cytoplasme) mais fortement réduite dans les mutants *E93* (qui ne présentent pas de dégradation du cytoplasme). DRONC est donc un bon candidat pour expliquer la destruction du cytoplasme (Lee *et al.*, 2002). Cependant, des protéases autres que des caspases sont également activées au cours de l'histolyse des glandes salivaires (Leist *et al.*, 2001) et elles pourraient avoir un rôle à jouer dans ce processus.

Les études menées ces 7 ou 8 dernières années ont permis de beaucoup progresser dans la compréhension du mécanisme d'autophagie des glandes salivaires. Pourtant de nombreux points obscurs demeurent et l'on ne connaît pas encore précisément le rôle d'un certain nombre de facteurs dont on sait qu'ils sont, non seulement présents au cours de ce processus, mais également au cours de l'apoptose. En effet, autophagie et apoptose, bien que montrant des différences d'un point de vue morphologique partagent certains facteurs, comme certaines caspases, *rpr*, *hid*, *dark*, Pourtant, l'on ne sait pas si ce sont les mêmes mécanismes moléculaires, tant au niveau de la régulation que de l'exécution, qui entrent en jeu.

RESULTATS

CHAPITRE I

***Krüppel-homolog*, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis.**

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence un nouveau facteur sans influence apparente sur la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire mais indispensable à la réponse hormonale de fin de stade prépupal.

Grâce à une mutation létale au stade prépupal, nous avons isolé le gène *Krüppel-homolog* (*Kr-h*) et 7 autres mutations dans ce gène conduisant à la mort des individus homozygotes à différents stades du développement. Nous avons caractérisé le gène en établissant sa séquence génomique et en décrivant le profil d'expression de chacun de ses transcrits et nous montrons que *Kr-h* est exprimé de façon quasi ubiquitaire au début du stade prépupal. Nous mettons en évidence les conséquences de la mutation *Kr-h¹* sur l'expression des transcrits des principaux gènes de la régulation hormonale au cours des réponses à l'ecdysone de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal

Kr-h, dont la séquence génomique laisse penser qu'il code pour un facteur de transcription, est indispensable à la drosophile pour passer la réponse hormonale de fin de stade prépupal et qu'il est lui même inductible par l'ecdysone. *Kr-h* a un rôle de modulateur sur l'expression de nombreux gènes impliqués dans cette réponse permettant une régulation fine de celle-ci. La mauvaise expression de *Kr-h* chez les homozygotes *Kr-h¹* aboutit à un complet déséquilibre dans l'expression des principaux régulateurs de la réponse à l'ecdysone à un moment donné, conduisant à la mort de l'animal à la fin du stade prépupal. L'analyse des différentes mutations isolées laisse penser que *Kr-h* pourrait jouer un rôle plus précoce dans le développement de la drosophile. D'autre part, les individus homozygotes *Kr-h¹* ne montrent pas d'histolyse des glandes salivaires mais il apparaît paradoxalement que la mauvaise expression de *Kr-h* mène à une surexpression de gènes pro-apoptotiques dans la glande salivaire parallèlement à une sous-expression de gènes anti-apoptotiques, laissant penser que d'autres facteurs régulés directement ou non par *Kr-h* entrent en jeu dans ce processus.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Krüppel-homolog, a Stage-Specific Modulator of the Prepupal Ecdysone Response, Is Essential for *Drosophila* Metamorphosis

Frédéric Pecasse, **Yannick Beck**, Claude Ruiz et Geoff Richards

Developmental Biology, 2000, Vol. 221, Pages 53-67

Pages 53 à 67 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2000.9687>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Données complémentaires

Introduction

Chez la drosophile, les glandes salivaires sont des organes dont la fonction principale est la sécrétion d'une sorte de colle: la glu. La glu, synthétisée dans les cellules des glandes salivaires, est sécrétée dans le conduit salivaire et excrétée à la fin du troisième stade larvaire par la bouche de l'animal. La glu excrétée permet à l'animal de se fixer solidement au support sur lequel il va demeurer tout au long de sa métamorphose.

A la fin du stade pré-pupal, l'augmentation du taux d'ecdysone va être à l'origine d'un processus de mort cellulaire programmée par autophagie, conduisant à l'histolyse des glandes salivaires environ 12 heures après le début du stade pré-pupale (voir introduction IV.B). Plusieurs mutations dans des gènes régulateurs des réponses hormonales de fin de troisième stade larvaire et/ou de fin de stade pré-pupal bloquent l'histolyse des glandes salivaires, on peut ainsi observer leur présence chez des pré-pupes âgées de plusieurs dizaines d'heures. La mutation *Kr-h¹*, à l'état homozygote, présente aussi ce phénotype. Dans le but de déterminer dans quelle mesure l'histolyse des glandes salivaires est avancée chez les mutants homozygotes *Kr-h¹*, nous avons réalisé des coupes semi-fines de glandes salivaires disséquées à partir de mutants âgés de pré-pupes de 24h. Afin de préciser nos observations, nous avons également réalisé des coupes ultra-fines de ces glandes et les avons observées au microscope électronique à transmission.

Résultats

Les glandes salivaires issues d'homozygotes *Kr-h¹* semblent tout à fait intègres d'un point de vue générale lorsqu'on les compare avec celles d'individus sauvages en début de stade pré-pupal (Figures 25A et B). On peut nettement déterminer les limites de chacune des cellules, de forme "cubique", ainsi que celles des noyaux (Figures 25B et D). A fort grossissement, il apparaît que les membranes cytoplasmiques des cellules semblent intactes et il en va de même pour les membranes nucléaires (Figure 25D).

Les chromosomes, à l'intérieur des cellules, sont nettement visibles et l'on peut même discerner les bandes qui les caractérisent. Cependant, contrairement aux chromosomes que l'on peut observer dans les cellules de glandes salivaires sauvages de 0h pré-pupe, les

chromosomes des cellules mutantes semblent plus denses et leur coloration plus intense (Figures 25C et D).

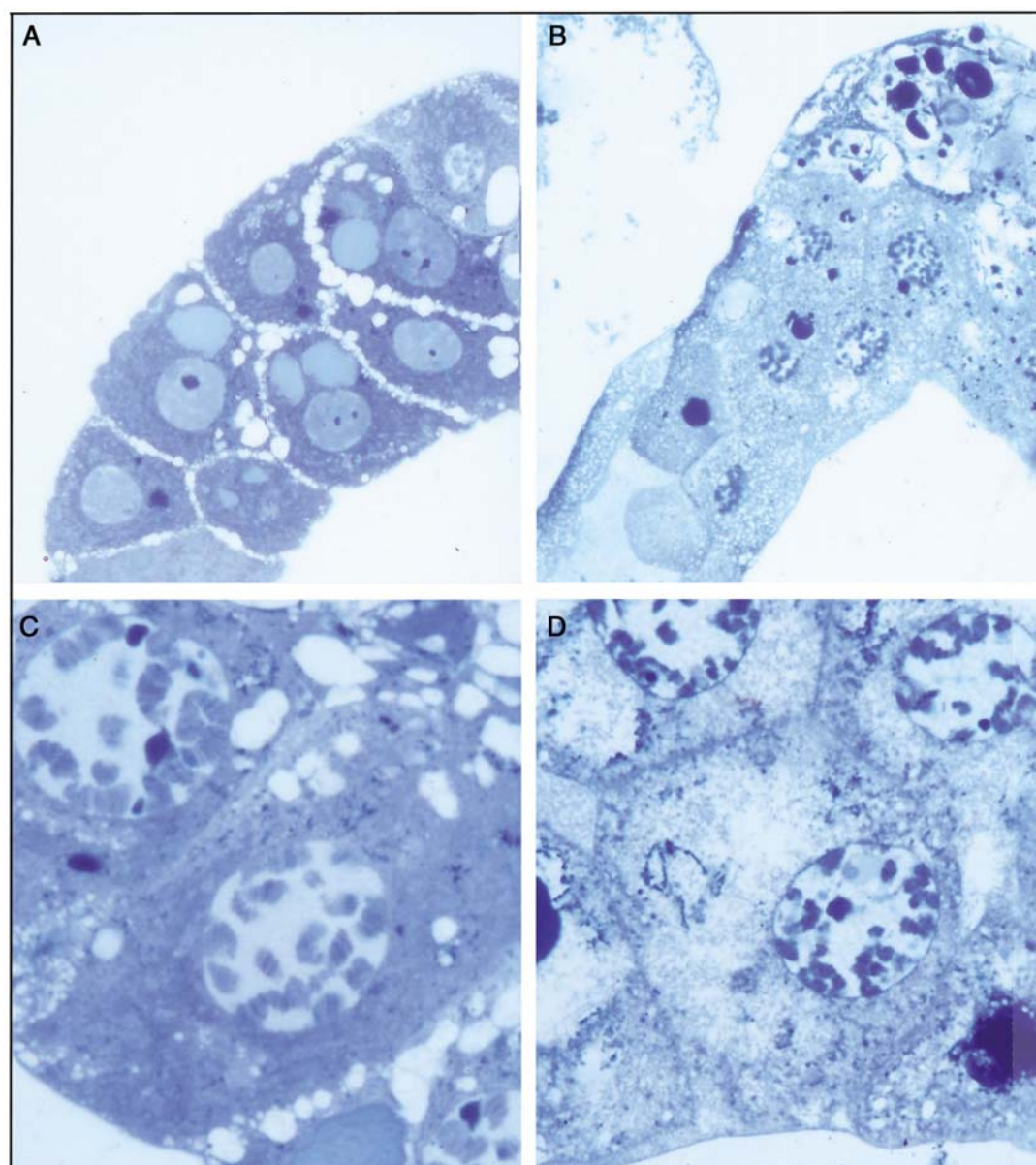


Figure 25. Coupes semi-fines colorées au bleu de Toluidine de glandes salivaires issues de prépuces sauvages de 0h (A et C) et de prépuces *Kr-h¹* de 24h (B et D). Les coupes histologiques sont observées au microscope optique avec un grossissement de 10 fois (A et B) ou de 100 fois (C et D).

En ce qui concerne le cytoplasme des cellules *Kr-h¹*, il semble comporter de nombreux petits "trous" lui donnant un aspect "poreux" et fragmenté (Figure 25D). Cet aspect fragmenté du cytoplasme paraît être la conséquence de la dissolution de certains composés lipidiques lors de la préparation des coupes.

Nous avons observé également les cellules des glandes salivaires de prépuces *Kr-h¹* de 24h par microscopie électronique à transmission (Figure 26), afin de voir plus en détail les composants intracellulaires de ces cellules.

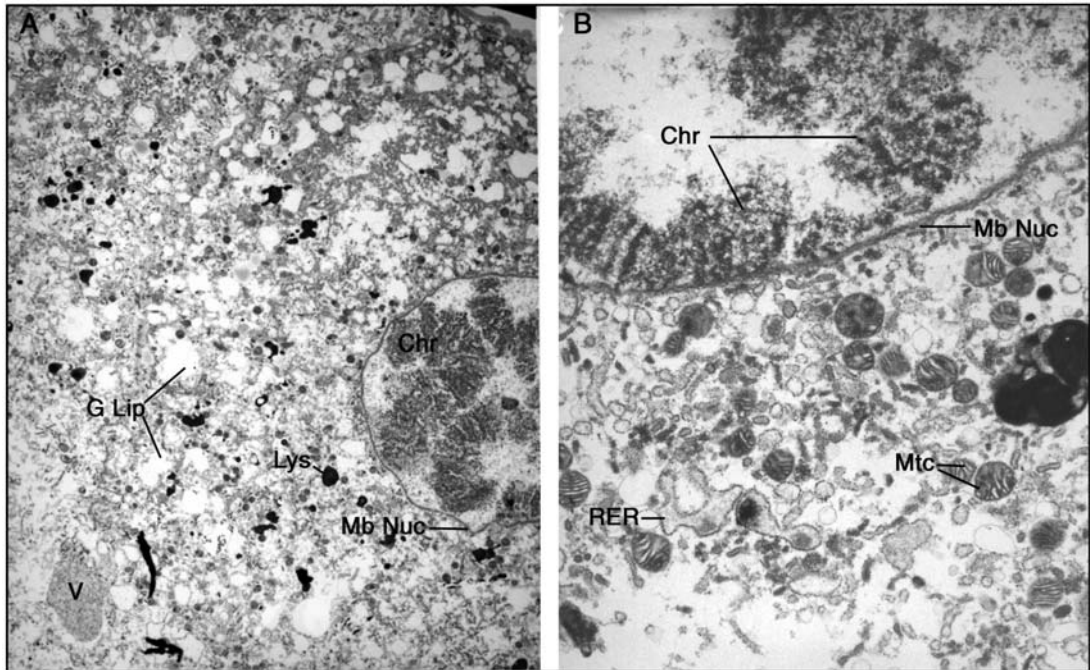


Figure 26. Coupes ultra-fines de glandes salivaires issues de pré-pupes homozygotes *Kr-h¹* âgées de 24h. Les coupes sont observées au microscope électronique à transmission avec une amplification de 2500 (A) et 10000 fois (B). Chr: chromosomes, G Lip: gouttelette lipidique, Lys: Lysosome, Mb Nuc: membrane nucléaire, Mtc: mitochondrie, RER: réticulum endoplasmique rugueux, V: vacuole.

Les observations faites par microscopie optique sont confirmées: les membranes cytoplasmiques ne présentent pas de défauts apparents (données non montrées) et il en va de même pour les membranes nucléaires (Figures 26A et B). Les chromosomes sont bien visibles ainsi que les bandes qui les caractérisent. Le cytoplasme quant à lui apparaît toujours très fragmenté et l'on peut observer les mitochondries en quantité attendue et de forme normale. Le réticulum endoplasmique est également visible ainsi que les ribosomes disposés à sa surface. On note aussi la présence, en quantité normale, de lysosomes (Figure 26A). Cependant, on ne peut observer la présence de vacuoles qu'en nombre limité et de plus, celles-ci sont de petite taille.

Ces résultats ne montrent aucun défaut important dans les glandes salivaires des pré-pupes homozygotes *Kr-h¹* de 24h. Il apparaît chez ces mutants que, si le processus d'autophagie a été initié, il n'a pas eu de conséquences clairement visibles sur l'ultrastructure des cellules. Le processus de mort cellulaire programmée dans les glandes salivaires de mutants *Kr-h¹* n'est pas déclenché ou est stoppé dans ses toutes premières étapes.

Conclusions et discussion

L'observation de coupes histologiques de glandes salivaires issues de prépuces *Kr-h*¹ de 24h a permis de mettre en évidence que le programme de mort cellulaire de cet organe n'est pas ou peu avancé chez ces mutants. Lee et Baehrecke (2001) ont comparé l'état d'avancement de l'histolyse des glandes salivaires chez plusieurs mutants de la réponse à l'ecdysone. Ils ont pu montrer que cet état d'avancement pouvait varier d'un mutant à l'autre. Les deux auteurs montrent que *βFTZ-F1* et *E93* sont nécessaires à l'initiation des changements observés par la mort cellulaire par autophagie, tandis que *BR-C* et *E74A* quant à eux ne sont pas nécessaires à cette initiation mais interviennent sans doute lors d'étapes plus avancées.

Gène	Membrane cytoplasmique	Vacuoles dans le cytoplasme	Bandes sur chromosomes polytènes
<i>βFTZ-F1</i>	Intacte	Oui, taille importante	Oui
<i>E93</i>	Intacte	Oui, taille importante	Variable
<i>BR-C</i>	Absence	Non	Variable
<i>E74A</i>	Absence	Présence de vacuoles autophagique et de petites vacuoles	Variable
<i>Kr-h</i>	Intacte	Peu nombreuses et de petite taille	Oui

Tableau 2. Récapitulatif des phénotypes observés chez les mutants des gènes *βFTZ-F1*, *E93*, *BR-C*, *E74A* et *Kr-h* au niveau de la membrane cytoplasmique, des vacuoles et des bandes des chromosomes polytènes des cellules de glandes salivaires issues de prépuces âgées de 24h. Les données concernant les gènes *βFTZ-F1*, *E93*, *BR-C* et *E74A* sont extraites de Lee et Baehrecke (2001).

En effet, lorsque l'expression de *E74A* ou *BR-C* est perturbée, les glandes salivaires demeurent mais les membranes cytoplasmiques disparaissent, tout comme les grandes vacuoles présentent au début du programme de mort et les chromosomes sont plus difficilement observables (Tableau 2).

A la vue de ces résultats, il semble que l'action de *Kr-h* soit nécessaire pour démarrer le programme de mort cellulaire au niveau de la destruction de l'ADN et des membranes cytoplasmiques comme c'est le cas pour *E93* et *βFTZ-F1*. L'absence de *Kr-h* semble également empêcher la vacuolisation du cytoplasme normalement observée au début du programme de mort cellulaire (Lee and Baehrecke, 2001; Farkas and Mechler, 2000). L'absence de débris cellulaires et l'absence de vacuoles autophagiques laissent penser que *Kr-h* agit en amont de *E74A* et *BR-C* en ce qui concerne la destruction du cytoplasme.

Le fait que l'histolyse des glandes salivaires des prépuces de 24h *Kr-h¹* soit si peu avancée est assez surprenant car le gène *reaper (rpr)* est fortement induit dans ces glandes entre 12 et 24h (Pécasse *et al.*, 2000). Farkas et Mechler (2000) ont montré que l'induction de *rpr* en fin de troisième stade larvaire était suffisante pour induire la lyse des cellules des glandes salivaires. On peut envisager dans ce cas, l'hypothèse que *Kr-h* soit indispensable à la régulation d'un ou plusieurs facteurs importants en aval de *rpr* et indispensable à la lyse des glandes salivaires en fin de stade prépuce.

Matériels et méthodes

Une dizaine de paires de glandes salivaires issues de prépuces sauvages âgées de 0h ainsi qu'une dizaine de paires de glandes salivaires issues de prépuces *Kr-h^{1/-}* âgées de 24h sont disséquées dans du PBS. Les échantillons sont ensuite fixés une nuit dans un tampon phosphate à pH7 contenant 2,5% de glutaraldéhyde. Après cela, les échantillons sont transférés dans un premier bain de PBS, acide osmique 1% pendant 30mn puis dans un second pendant 60mn. Les glandes salivaires sont ensuite déshydratées par une série de 2 bains de 5mn contenant successivement 50, 70 et 90% d'éthanol. La déshydratation est complétée par 2 bains de 20mn dans de l'éthanol 100% puis par un dernier bain de 15mn dans de l'oxyde de propylène. Les échantillons sont ensuite laissés 6h dans une solution de 50% épone, 50% oxyde de propylène puis une nuit dans de l'épone 100%. Les échantillons sont transférés dans une étuve à 60°C pendant 48h pour permettre à l'épone de polymériser. Pour chaque échantillon une série de coupes semi-fines d'une épaisseur variant de 0,2 à 2µm est réalisée ainsi qu'une série de coupes ultra-fines d'épaisseur de 60 à 80nm. Les coupes semi-fines sont colorées par une solution de bleu de Toluidine tandis que les coupes ultra-fines, destinées à être observées sous microscope électronique à transmission, sont plongées dans un bain d'acétate d'uranyl puis enfin 10mn dans un bain de solution de plomb pendant 10mn.

CHAPITRE II

***Krüppel-homolog* is essential for the co-ordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development.**

Cette étude a pour objectif de préciser le rôle du gène *Kr-h* au cours des stades précoces du développement.

Kr-h code pour deux transcrits principaux: *Kr-h α* et *Kr-h β* . Alors que *Kr-h α* est exprimé tout au long du développement, *Kr-h β* est exprimé principalement au cours du stade embryonnaire. Nous avons isolé quatre mutations, obtenues par insertion ou mobilisation et excision imprécise d'éléments P, responsables d'une létalité dans les stades précoces du développement, principalement au cours de l'embryogenèse et du premier stade larvaire. L'analyse des stades de létalité des individus homozygotes et trans-hétérozygotes pour chacune de ces mutations, nous a permis de montrer que ces mutations à l'état homozygote induisent effectivement une proportion importante de létalité précoce mais que cette précocité disparaît chez les individus trans-hétérozygotes. Pour mieux comprendre ce "décalage" de létalité entre homozygotes et trans-hétérozygotes, nous avons suivi l'expression pendant l'embryogenèse des principaux gènes régulateurs des réponses hormonales de la métamorphose. Pour cela, nous avons dû préalablement établir les profils d'expression de ces gènes au cours de ce stade. De manière intéressante, l'observation de ces profils, nous a permis d'envisager l'existence d'une véritable réponse hormonale au cours de l'embryogenèse. Grâce à cela, nous avons pu décrire un certain nombre de problèmes dans l'expression de certains de ces gènes régulateurs chez des embryons de différents génotypes.

L'une des mutations décrites aboutissant à la létalité des homozygotes au cours du premier stade larvaire, la même approche que lors de l'embryogenèse a été employée. Les signes d'une participation des mêmes gènes régulateurs à une réponse hormonale au cours de ce stade sont plus discrets, mais nous montrons que leur expression est perturbée dès l'éclosion dans les mutants *Kr-h* mourant au cours de ce stade.

Parallèlement à cela, nous montrons que, contrairement à ce qui est observé au cours du stade pré-pupal, *Kr-h* est exprimé de manière spécifique pendant l'embryogenèse et ce, dans les neurones. L'élaboration d'un anticorps dirigé contre les protéines KR-H confirme cette observation. *Kr-h* ne paraît cependant pas indispensable à la formation des neurones mais pourrait intervenir dans certains aspects de leur fonctionnement restant à déterminer.

***Krüppel*–homolog is essential for the co-ordination of
regulatory gene hierarchies in early *Drosophila*
development**

Yannick Beck, Frédéric Pecasse¹ and Geoff Richards²

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP,
B.P. 10142, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France

¹ Present address : IRIBHN-Campus Erasme, C4-124, 808, Route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium.

² To whom correspondence should be addressed. Fax : (33) 3 88 65 32 03. E-mail : richards@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Drosophila development is marked by two major morphogenetic processes : embryogenesis and metamorphosis. While insect metamorphosis is known to be controlled by the steroid hormone ecdysone, relatively little is known concerning the hormonal control of embryogenesis. Here we show that many ecdysone regulated transcripts of metamorphosis are also expressed in a wave-like manner during embryogenesis, suggesting that these genes also participate in an embryonic ecdysone response. At metamorphosis, the *Krüppel-homolog* (*Kr-h*) gene, coding for a zinc finger protein, is required during the prepupal ecdysone response. *Kr-h* mutants die at the prepupal-pupal transition. In these mutants, the expression of several ecdysone regulated genes is disrupted and we concluded that *Kr-h* was a key modulator of the hormonal response (Pecasse *et al.*, 2000). While *Kr-h* is expressed in many tissues at metamorphosis, in embryos expression is restricted to neurones. Here, we investigate its role during early *Drosophila* development using new alleles with an earlier lethality than those previously described. Although we detect only minor morphological defects in these mutants, we show that *Kr-h* expression is necessary for the early development of *Drosophila* and that, as during metamorphosis, *Kr-h* acts as a modulator of the expression of many of these ecdysone regulated genes.

Key words: *Drosophila*, ecdysone, metamorphosis, embryogenesis, *Krüppel-homolog*, Zn fingers, neurones

Introduction.

In higher eucaryotes many gene loci give rise to a family of transcripts derived from multiple promoters and/or differential splicing. These different transcripts may be stage and/or tissue specific and may encode distinct protein variants. Understanding the role(s) of these different isoforms throughout development and adult life is a major challenge. Holometabolous insects, such as *Drosophila*, are particularly interesting for such studies as they elaborate two distinct body plans. The first is seen at the end of embryogenesis at the emergence of the larva, while the second becomes evident during metamorphosis as the larval form is destroyed to be replaced by that of the adult. While studies of hormonal regulation during embryogenesis are in their infancy, it is well established that insect metamorphosis is orchestrated by the steroid hormone, ecdysone. The question of the significance of isoforms has been the subject of numerous studies in the past decade as most, if not all, regulatory genes, implicated in the ecdysone response at metamorphosis give rise to tissue or stage specific transcripts (Richards, 1997; Thummel, 1996 for reviews). Most recently, Cherbas *et al.* (2003) have used a novel approach to study tissue specific requirements for different ecdysone receptor (EcR) isoforms. They blocked general receptor function by the expression of a dominant negative form of *EcR* and simultaneously provided a specific isoform in the same target tissues so as to evaluate the processes supported by that isoform. They conclude that there is not a simple rule to explain *EcR* isoform requirements in different tissues. As concerns stage specific requirements, earlier studies of the genes of the ecdysone regulatory hierarchy have revealed that there are mutant alleles of many of these genes that are lethal either during embryogenesis or metamorphosis (Bender *et al.*, 1997; Carney *et al.*, 1997), suggesting that the underlying regulatory circuits are conserved in the two processes.

In the course of our studies of the metamorphic ecdysone responses of pupariation and pupation, we described a number of P-element mutations in the gene *Kruppel-homolog* (*Kr-h*). Homozygous individuals, after an apparently normal larval life and pupariation, die in the prepupal period and fail to complete pupation (Pecasse *et al.*, 2000). Expression of members of the ecdysone regulatory hierarchies was disrupted in these mutants between these two ecdysone responses. Molecular studies of the gene revealed at least two major transcripts, *Kr-h α* and *Kr-h β* , derived from distinct promoters (see Figure 1), and we showed that *Kr-h α* was the major transcript during metamorphosis while *Kr-h β* was particularly abundant during embryogenesis. Most of the first *Kr-h* alleles (*Kr-h²* to *Kr-h⁵*), selected for their prepupal lethality and non-complementation with *Kr-h¹*, proved to be insertions in the region of the distal *Kr-h α* promoter, or the beginning of the first intron. Two P element insertions closer to the *Kr-h β* promoter (*Kr-h⁶* and *Kr-h⁷*) also gave rise to partial embryonic or early larval lethality. Finally a deletion, obtained by the mobilisation of the P element of *Kr-h⁷*, that removed coding sequences common to all isoforms, was an early lethal (Pecasse *et al.*, 2000).

Here we study the early lethality of *Kr-h* mutants and the expression of transcripts and proteins in wild type embryos and first instar larvae. To do so we first establish that many of the genes known from the metamorphic response to hormone participate in waves of gene activity during embryogenesis that are reminiscent of the classical ecdysone responses of metamorphosis. We find that early *Kr-h* lethals show similar disruptions in the normal progression of the expression of these transcripts as do the late *Kr-h* lethals at the onset of metamorphosis.

Results.

The *Kr-h* locus : transcripts and mutant alleles.

The *Kr-h* locus gives rise to two major transcripts (*Kr-h α* and *Kr-h β*), which derive from two distinct promoters whose first exons are spliced to a common exon 2 (Pecasse *et al.*, 2000, see Figure 1).

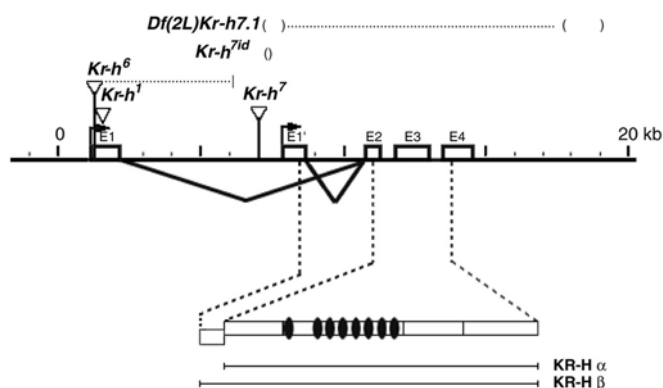


Figure 1. The molecular map of the *Kr-h* locus (Pecasse *et al.*, 2000). The five exons are noted from E1 to E4 and represented as open boxes. Coding sequences predict a 791 amino acid protein for KR-H α and the same sequence with 54 additional residues at the N-terminal for KR-H β . The two KR-H proteins exhibit 8 zinc fingers (black ovals). The sites of three P element insertions *Kr-h¹*, *Kr-h⁶* and *Kr-h⁷*, are indicated (open triangles). *Kr-h⁶* is associated with a 6kb deletion. Mobilisation of the P-LacW element of *Kr-h⁷* resulted in two alleles: *Df(2L)Kr-h7.1*, a deletion removing exons E1' to 4 and *Kr-h^{7id}* associated with a 3.3kb internal deletion in the transposon (see text). Parentheses denote the limits of the deletion end points.

P element insertions in exon 1 of the *Kr-h α* transcript disrupt the prepupal ecdysone response. Deletions or insertions closer to the β -specific exon 1' (*Kr-h⁶* and *Kr-h⁷*) also result in embryonic or early larval losses, in addition to the prepupal lethalties, and the importance of *Kr-h* earlier in development was established by the early lethality of the deletion *Df(2L)Kr-h7.1*, obtained by mobilising the P element of *Kr-h⁷* (Pecasse *et al.*, 2000). We obtained a second *Kr-h⁷* derivative in that screen, *Kr-h^{7id}*, that also showed early lethality. Molecular analyses of these alleles allowed us to localise the 3' limit of the deficiency *Df(2L)Kr-h7.1* to between 3.8 and 5.2 kb 3' to the last exon, while for *Kr-h^{7id}* we found that the loss of w^+ activity (the selection criterion for the P element mobilisation screen of *Kr-h⁷*) was the result

of a 3.3 kb *internal deletion* in the 3' region of the *Kr-h⁷* transposon, which had not left its initial insertion site. Furthermore we did not detect second site insertions locally, or indeed elsewhere in the genome (data not shown).

Genetic and developmental studies of early *Kr-h* mutants.

We introduced CyO-GFP balancers to facilitate a series of genetic and developmental studies of the new alleles (*Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h^{7id}*) to assess the consequences of these mutations and their interactions in inter-allelic crosses (Materials and Methods).

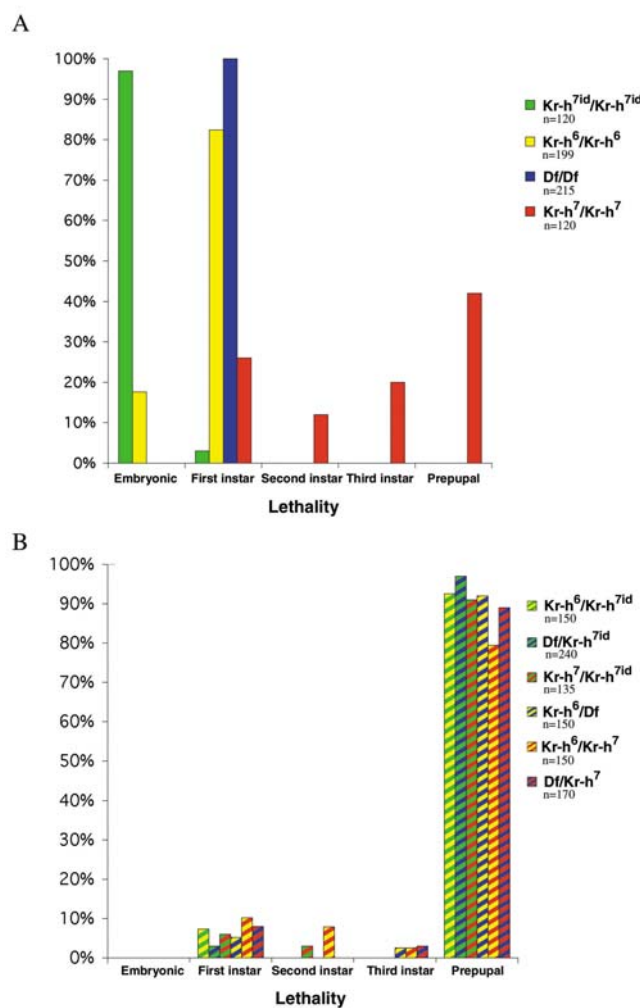


Figure 2. Stage dependent lethality of individuals (A) homozygous for the *Kr-h* alleles *Krh⁶*, *Krh⁷*, *Df(2L)Kr-h7.1*, *Kr-h^{7id}* and (B) heterozygous for different combinations of these alleles. All combinations are lethal, at the latest, by the end of the prepupal stage. n is the number of animals of a given genotype examined.

In developmental studies we observed that *Kr-h^{7id}* homozygotes elaborated larval structures by the end of embryogenesis but rarely eclosed as larvae (Fig. 2). Similarly,

Df(2L)Kr-h7.1 homozygotes showed an apparently normal embryonic development and it appeared that problems developed during the first half of the first larval instar. However by using the GFP balancer we were able to observe that individuals homozygous for the deletion completed embryogenesis some 2 to 4 hours later than their heterozygous siblings (Fig. 3). This was important for our comparative molecular analyses as we had encountered problems of interpretation when analysing individuals staged by their chronological age alone (see below).

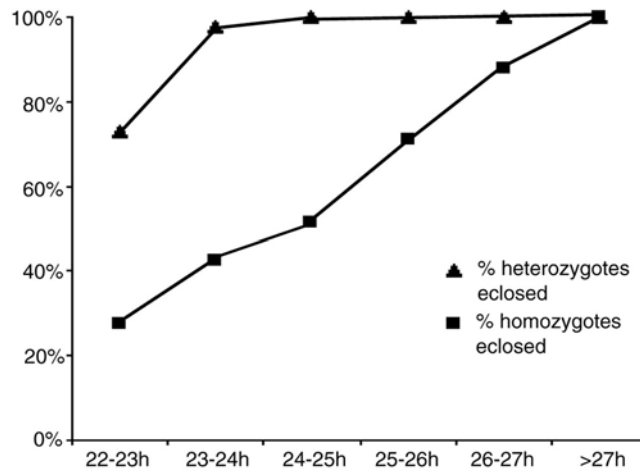


Figure 3. *Kr-h* nulls are retarded in embryogenesis. Cumulative percentage of *Df(2L)Kr-h7.1* heterozygous (triangles, n=138) and homozygous (squares, n=66) animals eclosed as a function of hours after egg laying.

As the first instar advanced, homozygous animals became more and more sluggish in their movements and finally stopped moving and their development in the second half of the instar. Mutants for the original insertion *Kr-h⁷* also show an apparently normal embryonic development, however during each of the three larval instars between 12 and 26 % of these mutants die (Fig. 2A), although the majority of the lethality occurs at the end of the prepupal stage. Interestingly these animals exhibit a characteristic prepupal phenotype, with their anterior spiracles close to the midline (Pecasse *et al.*, 2000). We also re-examined *Kr-h⁶*, and found that some (c. 18%) *Kr-h⁶* homozygotes died during embryogenesis while the rest died during the first larval instar (Fig. 2A). Only *Kr-h⁶* heterozygotes reach pupariation and it

appears that the prepupal lethality observed for this allele in our earlier study (Pecasse *et al.* 2000) concerned heterozygotes. Thus, this allele, which carries a deletion extending from the first exon throughout a large part of the intron 5' of the embryonic promoter (Fig. 1) is in fact an 'early' *Kr-h* allele which is semi-lethal in heterozygotes. Indeed only approximately a third of the embryos in these stocks (with a CyO or CyO-GFP balancer) reach adulthood

Crosses between these alleles produced unexpected results. Surprisingly, *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h^{7id}* individuals showed normal embryogenesis and larval development and almost all survived until the end of the prepupal period. *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h⁷* and *Kr-h^{7id}/Kr-h⁷* individuals also died essentially as late prepupae (Fig. 2B) and all three combinations showed abnormal spiracle positioning (not shown). We have only observed the spiracle phenotype in the presence of the *Kr-h⁷* or *Kr-h^{7id}* allele. Although the early lethality of the *Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h^{7id}* alleles, when homozygous, are consistent with the molecular analyses (see below), as they derive from the *Kr-h⁷* chromosome by P element activation, it is difficult to formally exclude the possibility that second site mutations (of a 'hit and run' type) might be responsible for the early phenotypes. Note that the lethality of *Kr-h⁷* is due to the original P element insertion as we obtained a large number of reversions to wild type in the mobilisation screen thus excluding the presence of a second site mutation. We therefore pursued the analysis with crosses of *Kr-h⁶*, an independent isolate of the original P element mutagenesis (Török *et al.*, 1993) to the other alleles. In these crosses, most importantly with the *Df(2L)Kr-h7.1*, the majority of animals died in the prepupal stage (Fig. 2B) thus showing the same unexpected behaviour as for *Kr-h⁷* and *Kr-h^{7id}*. It seems unlikely that both *Kr-h⁶* and *Kr-h^{7id}* carry distinct second site mutations responsible for their early lethality when homozygous, the more so in that *Kr-h⁷* shows a similar behaviour over the deficiency.

Expression of *Kr-h* transcripts during embryogenesis in relation to known ecdysone-regulated transcripts: an embryonic regulatory hierarchy ?

Using semi-quantitative RT-PCR assays specific for *Kr-h α* and *Kr-h β* we followed the expression of the two transcripts in wild type embryos staged at 2 hour intervals throughout embryogenesis together with transcripts from other known members of the ecdysone regulatory hierarchies (Fig. 4).

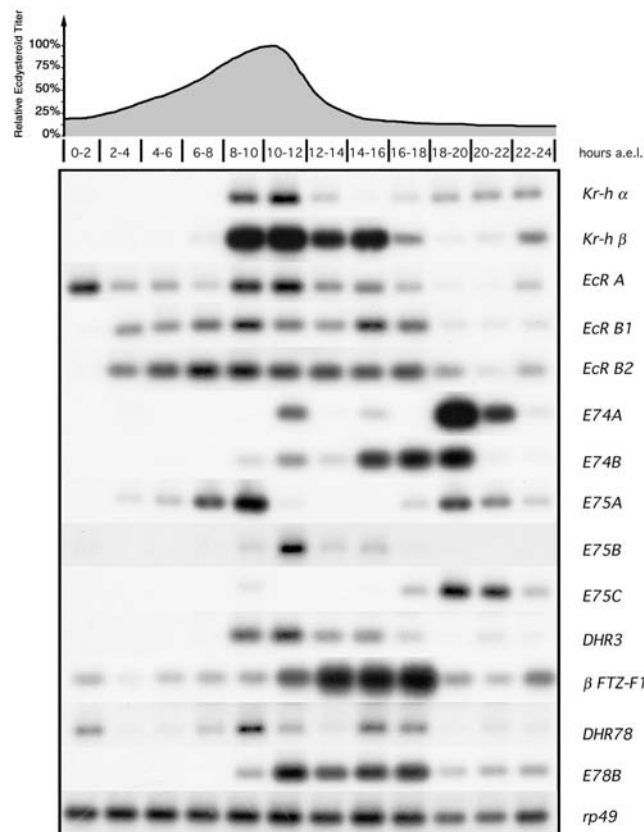


Figure 4. Transcript expression patterns of a number of genes regulated by ecdysone at metamorphosis, during embryogenesis. For each time period RT-PCR was performed using a pool of ten wild type Oregon embryos. *rp49* was used to control RNA extracts. Transcript analyses are shown below the profile of relative ecdysteroid levels during embryogenesis, expressed as a percentage of the mid-embryonic peak (after Kraminsky *et al.*, 1980).

Confirming results from northern analyses (Pecasse *et al.*, 2000), *Kr-h β* is the major transcript in embryogenesis with a broad peak of expression between 8 and 12 hours, coincident with

the reported ecdysone peak (Kraminsky *et al.*, 1980), which then declines by 18 hours. There is a new increase just prior to hatching. *Kr-h α* levels also peak between 8 and 12 hours and trace levels remain until the end of embryogenesis. In the same samples we detected all three *EcR* isoforms, *B1* and *B2* showing essentially the same broad peak while *EcRA* expression was distinct. In particular *EcRA* transcripts were present in the youngest embryos suggesting a maternal origin (Talbot *et al.*, 1993). *E74* and *E75* showed temporal differences in promoter usage. While *E74B/E74A* switching at 18 to 20 hours was similar to that seen during the late larval response of *E74* to ecdysone, *E75A* and *E75C* showed a similar regulation from 16 hours onwards, in contrast to metamorphosis where their expression profiles are quite distinct. *DHR3* showed a similar profile to that of *Kr-h β* and *EcR A* between 8 and 18 hours, while in the same period *β FTZ-F1* transcripts increased as the former decreased. Both *DHR78* and *E78B* were active in this same period. This study places *Kr-h β* expression in the middle of embryogenesis and reveals an overall organisation of the expression of these transcripts, which correlates with the reported ecdysone peak (Kraminsky *et al.*, 1980), and while reminiscent of the ecdysone regulatory hierarchies of metamorphosis, clearly involves different interactions.

Transcript analyses of *Kr-h* mutant embryos.

As the time of death was variable in *Kr-h⁶* with both embryonic and early larval lethality (Fig. 2A) we limited our analysis to transcripts in *Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h^{7id}* mutant embryos. We first studied *Kr-h* expression. As expected, we did not detect *Kr-h α* or *Kr-h β* transcripts in *Df(2L)Kr-h7.1* embryos, while in *Kr-h^{7id}* embryos we observed abnormal expression of both transcripts, *Kr-h α* appearing only from 16 hours onwards while *Kr-h β* transcripts remained unusually abundant from 12 hours until eclosion. To study the effects of these *Kr-h* mutations on promoter usage of the genes of the ecdysone regulatory hierarchies, we followed *E74* and *E75* transcripts in homozygous *Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h^{7id}*

embryos from 8 hours onwards using *Df(2L)Kr-h7.1/CyO* heterozygotes as an internal control (Fig. 5). For *E74*, the effects are most pronounced for the deficiency, as the *E74A* peaks are more clearly separated than in the heterozygote and *E74B* transcripts show a steady level of expression between 8 and 26 hours. *E75A* peaks are equally separated while *E75B* and *E75C* show coordinated over-expression between 8 and 16 hours in contrast to their expression in wild type Oregon embryos (Fig. 4) where *E75A* and *E75C* showed coordinated expression. In *Kr-h^{7id}*, early *E74A* and *E74B* expression is missing but the expression of these transcripts is normal from 18 hours onwards. The *Kr-h^{7id}* mutation shows little or no effect on *E75*, but note that *E75A* and *E75C* are clearly co-expressed from 16 hours onwards.

Because of the unexpected survival of *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h^{7id}* individuals, which reached the prepupal period (see above), we undertook an analysis of transcripts in embryos of this genotype (Fig. 5). As might be predicted, the pattern generally resembles that of *Kr-h^{7id}* homozygotes but with a delay of 1 to 2 hours in the peaks which probably reflects the delay seen with the deficiency allele. Exceptions were *E74B* where the over-expression characteristic of the deficiency is superimposed on the 14-16 hour peak seen in *Kr-h^{7id}* homozygotes, and *E75B* where transcript levels were reduced. These profiles show that the embryonic death of *Kr-h^{7id}* homozygotes does not result directly from the lack of early *Kr-h α* transcripts (8 to 14 hours) as levels are comparable in *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h^{7id}* individuals in this period.

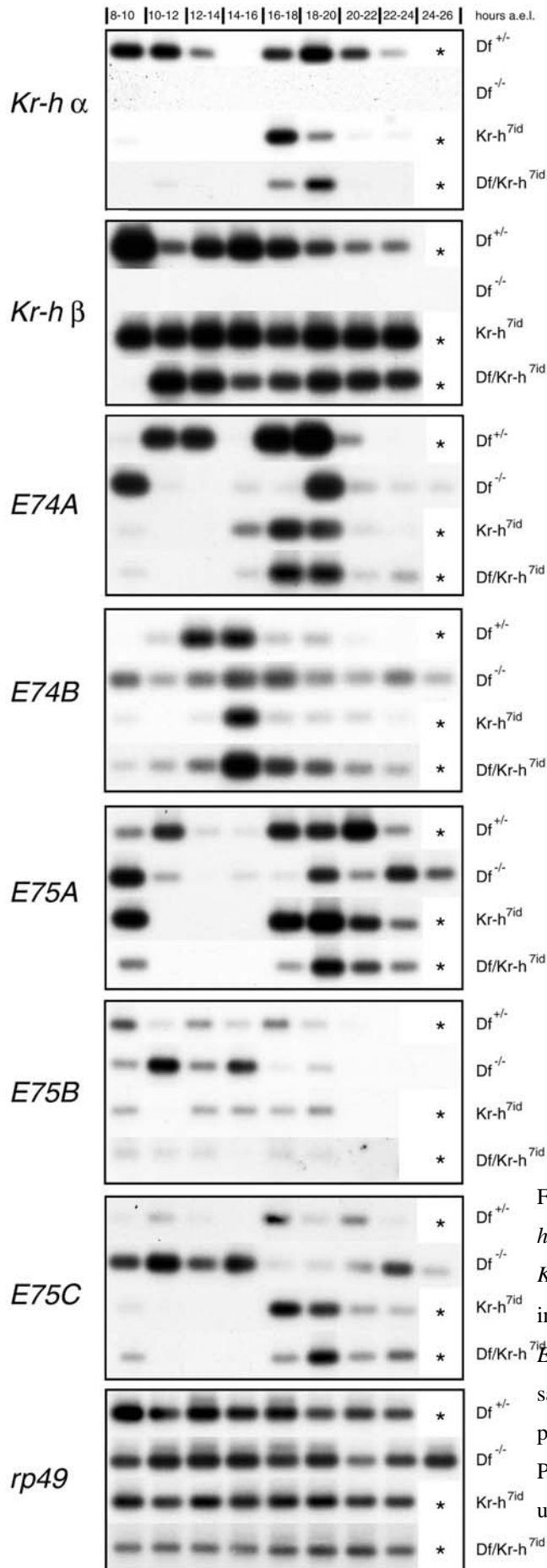


Figure 5. Transcript expression patterns in *Df(2L)Kr-h7.1* heterozygotes, homozygous *Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h^{7id}* individuals and *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h^{7id}* individuals during embryogenesis for *Kr-hα* and *β*, *E74A* and *B*, *E75 A*, *B*, *C*. RT-PCR analyses used the same RNA extracted from a single embryo for each period and genotype. Genotypes were confirmed by PCR analysis (see material and methods). *rp49* was used to control RNA extracts.

Northern analyses of embryonic transcripts in the mutants are impractical. In an attempt to understand the molecular consequences of the *Kr-h^{7id}* mutation, we analysed transcripts from late 3rd instar larvae heterozygous for this allele. We found an accumulation of primary transcripts from the *Kr-h* α promoter whose processing was impaired in the presence of the *Kr-h^{7id}* element, which we confirmed by RT-PCR analyses of intronic sequences after DNase pre-treatments (data not shown). This block was not observed in *Kr-h⁷* larvae, where the presence of the P element both reduced *Kr-h* α transcripts to about 5% of wild type levels and gave rise to a truncated transcript (Pecasse *et al.*, 2000). We cannot exclude that such aberrant transcripts contribute to the molecular abnormalities and premature death seen in embryos.

Transcripts in first instar wild type and dying *Df(2L)Kr-h7.1* larvae

While *Kr-h^{7id}* homozygotes rarely eclose as larvae, most *Df(2L)Kr-h7.1* homozygotes emerge and wander for several hours before gradually slowing and becoming immobile. No larvae reach the second instar. To study the underlying molecular events we undertook an RT-PCR analysis of transcripts of genes of the ecdysone regulatory hierarchies in both wild type and *Df(2L)Kr-h7.1* homozygous larvae staged from eclosion (Figs. 6A and B). Note that *Kr-h β* and *E75B* transcripts were not detected in larvae (data not shown). Overall changes in wild type first instar larvae are modest. There is a clear switching event around 8 hours which is evident in an increase in the levels of most of the transcripts studied, with the exception of *β FTZ-F1* transcripts which decrease from 10 hours onwards (Fig. 6A).

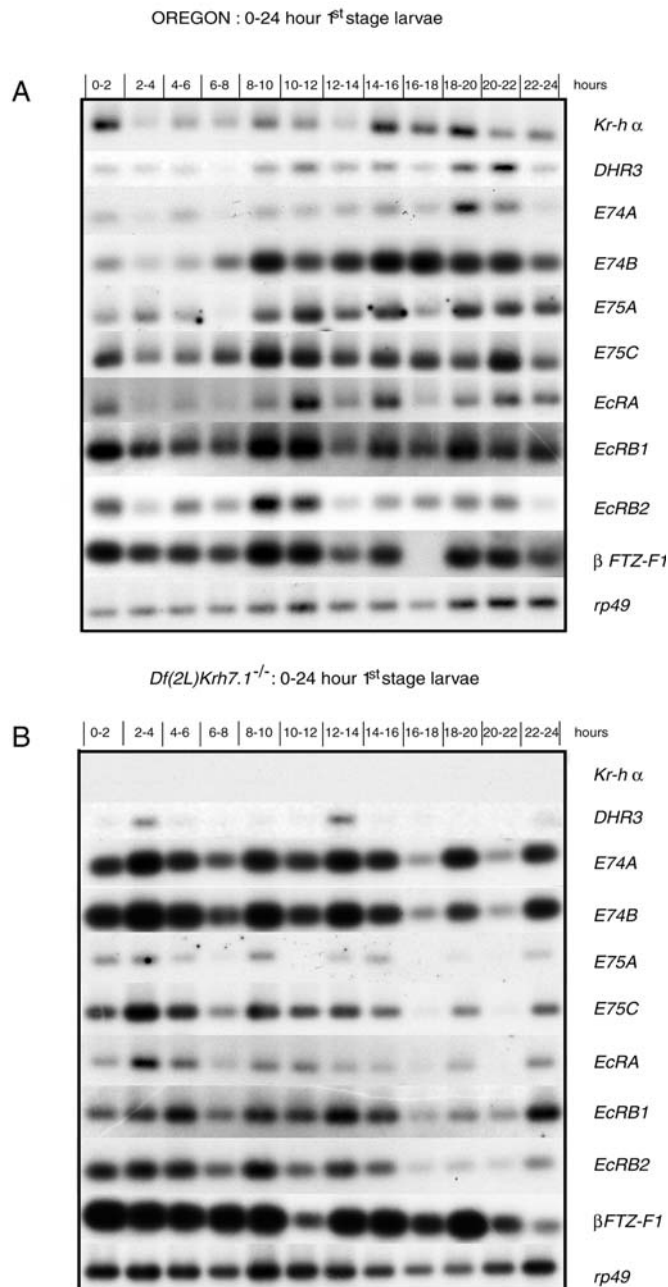


Figure 6. Wild type (A) and homozygous *Df(2L)Krh7.1* (B) expression patterns for genes regulated by ecdysone at metamorphosis, during the first larval instar. For each period, RNA from five animals was used. *rp49* was used to control RNA extracts.

Transcripts in the mutant larvae show marked changes, compared to wild type, notably an increased expression of *E74A*, *E74B* and β FTZ-F1. These abnormal levels are maintained for at least 12 to 14 hours (Fig. 6B). Thereafter we observed two situations in these analyses of individual larvae, either a maintenance of the abnormal profile (e.g. the 18 to 20 hour larva)

or an overall diminution of transcripts (Fig. 6B, 16 to 18 hour or 20 to 22 hour larvae, and other data not shown) which we interpret as characteristic of a dying larva. Thus doomed larvae show defects in the expression of genes of the ecdysone regulatory hierarchies at the time of hatching which are unmodified until a general decline of the animal, leading to death, occurs.

***Kr-h* transcripts are localised to the nervous system.**

We used DNA probes specific to *Kr-h α* and *β* for *in situ* hybridisation to visualise tissues in which *Kr-h* transcripts are expressed. *Kr-h β* , the major embryonic transcript, was detected from stage 12 of embryogenesis, around 8 hours after egg laying, confirming the RT-PCR observations. *Kr-h β* is located in the brain, the ventral nerve chord and in some cells located laterally in a pattern suggesting a connection with the PNS (Fig. 7).

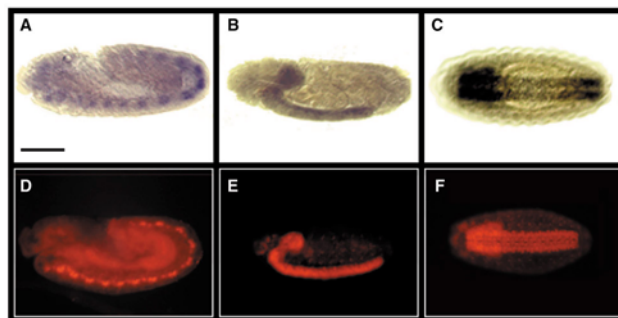


Figure 7. *Kr-h β* transcripts and KR-H protein expression in wild type embryos. (A-C) *Kr-h β* transcript expression in (A) stage 12, (B) stage 16 lateral views and (C) stage 14 ventral view. (D-F) KR-H protein expression in (D) stage 12, (E) stage 15 lateral views and (F) stage 16 ventral view. Anti KR-H polyclonal antibody was diluted to 1/4000. Bar represents 100 μ m.

Kr-h β RNA is found in these same areas until stage 17, at the end of the embryonic development. A similar pattern of expression of *Kr-h* transcripts was reported by Brody *et al.*

(2002) in late embryos. In contrast, we did not detect *Kr-h α* transcripts *in situ* (data not shown), perhaps because of the low expression level of this isoform (see above).

KR-H is restricted to neuronal cells

In order to follow the KR-H protein, we elaborated a polyclonal antibody directed against the KR-H α and β common C terminal region (see Materials and Methods). Our observations confirm the *in situ* hybridisation results. KR-H is observed as early as stage 12 in the same tissues as those where we observed *Kr-h β* transcripts (Fig. 7). To determine the cell type expressing KR-H, we used a monoclonal antibody recognising Elav, a protein specifically expressed in neurons (Robinow and White, 1988). KR-H is detected in all Elav expressing cells : in the brain, the ventral nerve chord and in the PNS, suggesting that KR-H is also specifically expressed in neurons. To confirm that *Kr-h* is associated with neuronal identity, we observed its distribution in *Sca-gal4, UAS-glide/gcmM24A; UAS-glide/gcmM21G* embryos, which over-express *glide/gcm* in neuroblasts, thus promoting the glial destiny of these cells and reducing the number of neurons (Bernardoni *et al.*, 1998). In these embryos KR-H was weakly expressed in the few differentiated neurons (data not shown). Therefore KR-H is only expressed in those cells having a neuronal identity. In addition we detected KR-H in a few cells not expressing Elav, notably between the main lobes of the brain (Fig. 8). However *Kr-h* is not essential for the neuronal identity as Elav staining was normal in *Df(2L)Kr-h7.1* homozygotes (data not shown). Attempts to raise polyclonal (rabbit, rat) or monoclonal (mouse) antibodies recognising the 54 amino acid β -specific N-terminal fragment were unsuccessful (data not shown).

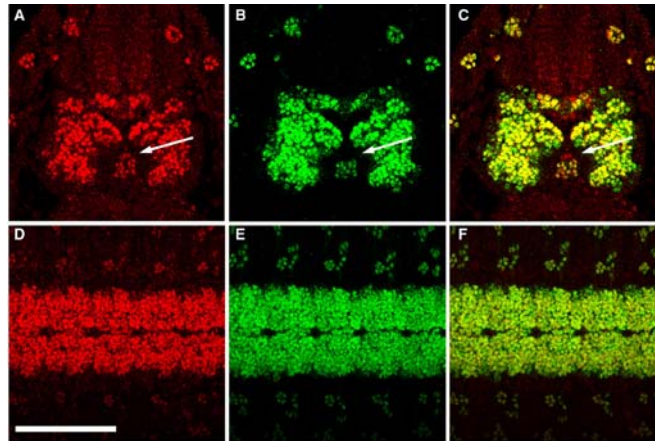


Figure 8. Elav and KR-H expression in wild type brain and ventral nerve cord. (A-C) Confocal images of wild type brain. KR-H (A) and Elav (B) are largely co-expressed (C) except notably in a few cells (arrow) located in the ring gland region. (D-F) Part of a wild type embryo stage 16 ventral nerve cord. KR-H (D) and Elav (E) are co-expressed in neurons (F). Anti KR-H polyclonal antibody was diluted to 1/4000 and anti Elav monoclonal antibody was diluted to 1/200. Bar represents 50 μ m.

Despite the dramatic changes in the transcripts of the ecdysone hierarchies, we did not observe an obvious embryonic mutant phenotype. We investigated several putative pathways/structures by immunostaining mutant embryos with antibodies against Dachshund, Neurotactin, Fasciclin II, Fasciclin III and the BP102 serum each of which stain different parts of the nervous system (Mardon *et al.*, 1994; Hortsch *et al.*, 1990; Bastiani *et al.*, 1987; Patel *et al.*, 1987; Carney *et al.*, 1997). We also tested α Spectrin and a serum recognising trachea (Y. Beck unpublished), β 3 Tubulin (Paululat *et al.*, 1999) which is expressed in the visceral and somatic mesoderm, Hindsight expressed in CNS, glial cells, midgut, PNS and tracheas (Yip *et al.*, 1997). However none of these antibodies revealed clear abnormalities. Only when using the 22C10 antibody, directed against the Futsch protein found in axon and neuron cellular bodies (Hummel *et al.*, 2000), did we observe in certain homozygous

Df(2L)Kr-h7.1 and heterozygous or homozygous *Kr-h^{7id}* embryos, the presence of one extra neuron (Fig. 9).

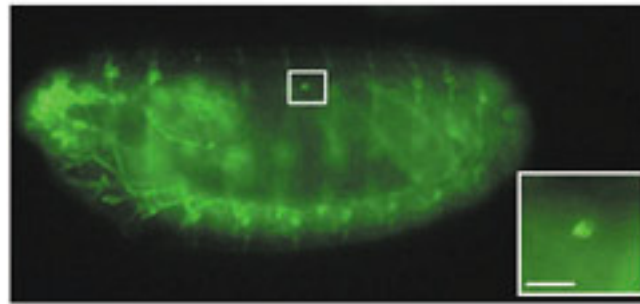


Figure 9. 22C10 expression in a *Kr-h^{7id}* embryo showing an ectopic neuron. Note the absence of axons in the magnification (white rectangle). Anti 22C10 antibody was diluted to 1/200. Bar represents 10 μ m.

These occasional ectopic neurons are not always found in the same segment and do not possess an axon, as only the cellular body is visible.

Discussion

Gene regulatory hierarchies are variants on a common theme.

The gene regulatory hierarchies induced by ecdysone at metamorphosis are the link between the initial action of a nuclear hormone and the stage and tissue specific responses that it affects. The primary targets, as defined by cytological approaches with salivary gland giant chromosomes, are often complex loci encoding families of transcription factors. An increase in ecdysone levels leads to co-ordinated activation and repression of their transcripts in a reproducible temporal pattern, often involving isoform switching at a given locus as the response progresses. Within the salivary gland there are differences in the levels of induction and the duration of their expression between the late larval and prepupal response to ecdysone. In addition, the time of induction and the moment of isoform switching is tissue specific, suggesting that if the same general principle is used in different tissues, variations in

the expression of members of the hierarchies may contribute to both stage and tissue specificity.

As genetic studies have shown that these genes are essential for metamorphosis and the establishment of the insect's second body plan, we looked for evidence for a similar coordinated expression in embryogenesis as the first body plan is elaborated. Studies on the possible role of ecdysone in embryogenesis are limited, although a peak of hormone was detected in mid-embryogenesis by radio-immune assays (reviewed in Richards, 1981). Unlike the larva, which can be fed ecdysones, the embryo is a relatively closed system, and coupled with its smaller size, is less amenable to experimental manipulation. We have used our semi-quantitative RT-PCR approach, developed for salivary gland studies, to circumvent in part the problem of size, although there is a clear disadvantage in embryonic studies as we cannot follow tissue specific events. Our results establish that members of the metamorphosis regulatory hierarchies show similar waves of expression in embryogenesis, including isoform switching, but that their relationships are different, notably the temporal co-expression of certain isoforms (e.g. *E75A* and *E75C*) which is not seen at metamorphosis. These observations are consistent with models of regulatory complexity deriving from related but distinct protein complexes. A parallel study (Sullivan and Thummel, 2003), using northern analyses of wild type embryos, centred on the members of the nuclear receptor family, also describes waves of transcriptional activity in *Drosophila* embryogenesis and concludes that the underlying patterns of gene activation seen in embryogenesis are similar to those of metamorphosis. Because of differences in the sensitivity of the techniques there are minor differences between these studies – for example *E75C* was not seen by northern blotting (Sullivan and Thummel, 2003). Together they suggest that ecdysone has a central role to play in embryogenesis and may interact with many of the signalling pathways previously described in *Drosophila* embryogenesis.

It is perhaps also noteworthy that, in contrast to embryogenesis, during the first larval instar, which also lasts about 24h, there are relatively few changes in the transcripts of these master genes. This would support the idea that dipteran larval instars are relatively uneventful and that although there are cuticle changes at each moult, they are essentially important for growth. A similar conclusion was drawn from a recent analysis of the development of *E75* mutants (Bialecki *et al.*, 2002).

***Kruppel-homolog* is essential for early development.**

As seen in previous studies (Schuh *et al.*, 1986; Pecasse *et al.*, 2000), *Kr-h β* is the preponderant embryonic isoform, both by transcript and *in situ* analyses. Unlike *Kr-h* expression at metamorphosis, where *Kr-h α* expression is found at similar relative levels in many tissues (Pecasse *et al.*, 2000), *Kr-h β* expression is specific to neuronal cells. It is not however necessary for the determination of the neuronal lineages as seen by Elav staining of homozygous *Df(2L)Kr-h7.1* embryos, which present a normal neuronal pattern. Although our studies have not revealed major structural changes during embryogenesis, the occasional ectopic neurons in both mutants are consistent with the suggestion of a role for *Kr-h* in the elaboration of the nervous system derived from observations of disruptions in misexpression studies (Abdelilah-Seyfried *et al.*, 2000; Kraut *et al.*, 2001). As KR-H spatial expression is very similar to Elav it may prove to be a useful marker of the neuronal system.

***Kruppel-homolog* is a dose dependant modulator of regulatory hierarchies.**

Based on our analyses of its role in metamorphosis (Pecasse *et al.*, 2000) we defined *Kr-h* as a modulator of the hormonal response, and this description is also appropriate in embryos. The consequences of early *Kr-h* mutations are as dramatic as at metamorphosis and the molecular consequences of mutant *Kr-h* alleles are similarly complex as they lead to

errors in the timing and level of expression of genes of the ecdysone regulatory hierarchies and, perhaps more noticeably in these experiments, to failures in isoform switching. *Kr-h* is necessary for the correct expression of *E74A*, *E74B* and *E75C*.

Between 8 and 14 hours, *E74A* expression is aberrant in the absence of *Kr-h* transcripts and this appears to depend primarily on *Kr-h α* as expression is not restored in the presence of the *Kr-h^{7id}* allele where there are normal *Kr-h β* levels in this period. *E74B* expression is similarly aberrant in the absence of *Kr-h* being broadly expressed between 8 and 24 hours. The 12-16 hour peak seen in the control heterozygotes is restored in a dose dependant manner by the *Kr-h^{7id}* allele suggesting that *Kr-h β* represses *E74B* expression from 16h onwards. A similar effect is seen at metamorphosis where *E74B* is expressed prematurely in *Kr-h^l* prepupae (Pecasse *et al.*, 2000). A further striking interaction concerns *E75C* expression. In the absence of *Kr-h*, *E75C* transcripts are abundant between 8 and 16 hours. Their repression is restored by a single dose of *Kr-h^{7id}* suggesting that *Kr-h β* is sufficient for this repression. Note however the correlation between *Kr-h α* transcripts and *E75C* transcripts in these animals from 16 hours onwards.

While each change is in itself modest, if one considers the levels of transcripts of different isoforms present at a given time point, the ratios of the expression of these key regulatory genes are significantly perturbed (compare for example *E74A*, *E75A*, *E75B* and *E75C* transcript levels in 10 – 12 hour embryos of the *Df(2L)Kr-h7.1/+* and *Df(2L)Kr-h7.1/Df(2L)Kr-h7.1* genotypes, Fig. 5). Note that as *Kr-h* is limited in its expression to neuronal cells, it is possible that our total embryo RT-PCR approach averages down the impact of the mutation in those tissues, although the *Kr-h* mutations may have indirect effects on gene expression in other tissues.

The idea that *Kr-h* is necessary to assure a fine balance in the regulatory hierarchies is supported by our observations that the expression of key genes is highly dose dependant on

the different *Kr-h* alleles. An unexpected result was the survival until the prepupal stage of combinations of *Kr-h*⁶, *Kr-h*⁷ and *Kr-h*^{7id} with *Df(2L)Kr-h7.1*. This was perhaps most striking for *Kr-h*^{7id} as, unlike *Kr-h*^{7id} embryos, the *Df(2L)Kr-h7.1/Kr-h*^{7id} embryos hatch and the larvae reach pupariation. *Kr-hβ* transcripts are reduced in these embryos compared to *Kr-h*^{7id} and are closer to control levels, suggesting that excess *Kr-hβ* transcript levels cause the block in late embryogenesis. Levels of the other ecdysteroid regulated transcripts are also closer to controls than in *Df(2L)Kr-h7.1* embryos. The idea that a reduction in *Kr-hβ* transcripts is necessary for early development is consistent with one interpretation of our observations of *Kr-h* expression during metamorphosis (Pecasse *et al.*, 2000) where the programmed disappearance of *Kr-hα* during the early to mid-prepupal period may be crucial for the transition from pupariation to pupation. This problem of balance may be further complicated by the observation that the KR-H protein binds in the vicinity of the *Kr-h* locus in salivary gland polytene chromosomes (Beck Y. unpublished) suggesting that there may be an element of autoregulation at the locus. These same studies show that KR-H localisation is dynamic, and our current efforts to understand its mode of action are focussed on its role during the metamorphic response to hormone (Beck *et al.*, in preparation).

Materials and Methods

Stocks

Strains were maintained at 25°C on a standard agar medium. *Kr-h⁶* and *Kr-h⁷* were from the collection of Török *et al.* (1993) provided by Bernard Mechler and were originally designated l(2)59/5 and l(2)44/11 respectively. The *Kr-h⁷* stock carries the w⁺ marked P-lacW (Bier *et al.*, 1989) and is maintained as a second chromosome balanced lethal (y,w; P[w⁺mc=lacW] *Krhl^{k04411}*/CyO). To mobilise the transposon, *Kr-h⁷* females were crossed with P[ry⁺lethal]/CyO;Ki kar²ry⁵⁰⁶P(Δ2-3)ry⁺99B males. The P element excision events were selected on the loss of the w⁺ phenotype.

To facilitate selection of *Kr-h⁶*, *Kr-h⁷*, *Df(2L)Kr-h7.1* or *Kr-h^{7id}* homozygotes, males of each genotype were crossed with female w[*];L[2] Pin[1]/CyO, P{Gal4-Kr.C}DC3, P{UAS-GFP.S65T}DC7 obtained from the Bloomington stock centre (#5194). Progeny showing a GFP signal were selected to construct CyO, P{Gal4-Kr.C}DC3, P{UAS-GFP.S65T}DC7 balanced stocks.

Inter-allelic crosses

Five heterozygous virgin females of a given genotype were crossed with two heterozygous males of the same or another given genotype. F0 genotypes are *Df(2L)Kr-h7.1*, *Kr-h⁶*, *Kr-h⁷* and *Kr-h^{7id}* balanced with a chromosome CyO, GFP (see above). Newly eclosed first instar larvae are separated in 2 groups, those expressing GFP and the others not. GFP⁺ larvae are either CyO, GFP homozygotes, which die in a few hours, or heterozygotes which survive to the adult stage. GFP⁻ larvae carry two *Kr-h* mutant alleles. Each group is raised on a medium containing 10% agar, 40% apple juice supplemented with yeast. Larvae are counted and observed daily, and their medium changed every one or two days.

Molecular characterisation of Kr-h alleles

The sites of the P element insertions of *Kr-h*⁶ and *Kr-h*⁷ were characterised by plasmid rescue which also revealed the presence of a c. 6 kb deletion 5' to exon 1' in *Kr-h*⁶ (Pecasse *et al.*, 2000, see Figure 1). The limits of the deletions in *Df(2L)Kr-h7.1* and *Kr-h*^{7id} alleles were characterised in PCR walks using template DNA from homozygous mutant embryos. Wild type DNA was used as a control for the primer pairs of each PCR reaction.

RT-PCR

One or ten embryos or five L1 larvae were crushed against the wall of an eppendorf tube with a stainless steel needle, then the RNA extraction and RT-PCR were performed as described in Huet *et al.* (1995). The RNA extracted from a single embryo is taken up in 12 µl of distilled water whereas extraction from ten embryos or five L1 larvae is taken up to 24 µl of distilled water. Oligonucleotides and probes were as previously published (Huet *et al.*, 1993, 1995; Pecasse *et al.*, 2000) except for *Kr-hβ* where the primers were TCAAGAAATCGGGCACGGAA and TGGTCGTCGCTGTTAGTGGA and the probe TCTAGTCAGGCGCAGTTCTG. For general considerations of the reproducibility of the RT-PCR assay see Huet *et al.* (1993). In every case the level of an RT-PCR product is checked for its coherence within a developmental series and compared with other products obtained using the same RNA extract. Unexpected values (using these criteria) are validated by repeating the series and/or using RNA from similarly staged animals.

When genotyping was necessary, one microliter of the RNA extraction was used in PCR using as a template the contaminant DNA present in the extraction. Primers used in genotyping are CAGGTCGACGGGACCACCTTATGTTA, localised in the 5' extremities of the imperfectly excised P-element, CCTTGCGACTATAGTATGCG localised upstream of the transposon and CCTTCGACTATTAAGGCTC downstream of the P-element. The mutant allele gives rise to a 110 bp fragment whereas the wild type allele gives rise to a 440 bp

fragment. PCR was performed as described in Pecasse *et al.* (2000) except that the number of cycles was increased from 30 to 35.

In situ hybridisation.

In situ hybridisation is adapted from Tautz and Pfeifle (1989). The exon 1' probe was made by PCR. Two 20-oligomers allowed the amplification of a 195 bp fragment using a 6kb EcoR1 restriction fragment inserted in the Bluescript SK+ plasmid as a template. The PCR mix consists of 1.5mM MgCl₂, 150mM KCl, 25mM Tris-HCl pH8.3, 100µg/ml BSA, 100µl/ml of "DIG DNA labeling mixture 10X, concentrated" (Boehringer Mannheim), 0.25pmol/ml of each primer, 400ng/ml of template and 25U/ml of Taq polymerase (Sigma). Sequences of the primers are GAGTTCAGCGCTAAAGTCTG and TTGCTACTGCTCCATACAGG. PCR processing was as above (30 cycles).

Antibody production and characterisation

The DNA sequence coding for amino acids 652 to 702 localised 3' to the *Kr-h* zinc finger domain was fused to the GST sequence in pGEX-4T3 (Pharmacia Biotech), and the fusion protein expressed in BL21 bacteria in order to express the fused protein. The GST fusion protein was purified according to the manufacturer's protocol (GST, Gene Fusion System, Pharmacia Biotech, 2nd edition, 1994). About 80 ml of serum from a rabbit immunised with this KR-H common region fused protein was collected.

The polyclonal antibody detects KR-H in those cells expressing *Kr-hβ* transcripts and fails to mark *Df(2L)Kr-h7.1* homozygotes which lack the entire *Kr-h* coding region.

Immunocytochemistry

Embryos were harvested and dechorionated in 50% bleach for 3 min then rinsed in 0.1% Triton X100 (Sigma). Embryos were permeabilised and fixed in 16mM Hepes pH6.9, 0.32mM MgSO₄, 0.16mM EGTA, 0.8% para-formaldehyde, 80% heptane for 20 min on an agitator. The lower layer was removed and replaced by 500 µl of methanol. The mix was

vigorously shaken for about 10 s. Precipitated embryos were taken and rinsed in methanol, rehydrated by three 10 min steps in 75%, 50%, 25% methanol in PBS without shaking. All the subsequent steps were performed on an agitator. Embryos were pre-incubated three times in PBS, 0.3% Triton X-100, 10% goat serum for 20min. Primary antibodies were added (see figure legends) and the embryos were incubated 2 hours. Thereafter, the antibody solution was removed and the embryos washed 3 times 20 min in PBS, 0.3% Triton X-100, 10% goat serum. Secondary antibodies were added. To detect a mouse primary antibody we used Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (Molecular Probes A-11001) and to detect a rabbit primary antibody, we used Cy3-conjugated affini-pure donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Jackson Immuno research 711-165-152). Embryos were incubated 2 hours. Finally, embryos were washed 2 times for 10 min in the pre-incubation solution then 4 times 10 min in PBS, 0.3% Triton X-100. Embryos were mounted in fluoromount G medium (Southern Biotechnology Associated, Inc.) and observed using an epifluorescence microscope. If necessary, anti-KR-H or anti-GFP (Molecular Probes A-6455) antibodies were used as appropriate to distinguish homozygous mutant embryos from their heterozygous siblings.

Sca-Gal4, *UAS-glide/gcm* embryos (Bernardoni *et al.*, 1998) were provided by A. Giangrande. The Dachshund and Elav antibodies developed by G.M. Rubin, the BP102, Neurotactin, Fasciclin II and III antibodies developed by C. Goodman, the Hindsight antibody developed by H.D. Lipshitz, the α Spectrin developed by D. Branton and the 22C10 antibody developed by S. Benzer were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242.

Acknowledgements

We thank Claude Dauer for excellent technical assistance. We are grateful to Angela Giangrande and Uwe Strähle for critically reading drafts of the manuscript. We are grateful to Renate Renkawitz-Pohl for her β 3 Tubulin antibody gift and to Angela Giangrande for sharing antibodies and the *Sca-Gal4*, *UAS-glide/gcm* embryos. We thank the IGBMC core facilities for oligonucleotide synthesis, confocal microscopy and antibody production. This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Hôpital Universitaire de Strasbourg and studentships from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and the Association pour la Recherche sur le Cancer to Y.B.

References

Abdelilah-Seyfried, S., Chan, Y., Chaoyang, Z., Justice, N. J., Younger-Shepherd, S., Sharp, L. E., Barbel, S., Meadows, S. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N., 2000. A gain-of-function screen for genes that affect the development of the *Drosophila* adult external sensory organ. *Genetics* **155**, 733-752

Bastiani, M. J., Harrelson, A. L., Snow, P. M., Goodman, C. S., 1987. Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell* **48**, 745-755

Bender, M., Imam, F. B., Talbot, W. S., Ganetzky, B., Hogness, D. S., 1997. *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**, 777-788

Bernardoni, R., Miller, A. A., Giangrande, A., 1998. Glial differentiation does not require a neural ground state. *Development* **125**, 3189-3200

Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W. A., Thummel, C. S., 2002. Loss of the ecdysteroid-inducible *E75A* orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell.* **3**, 209-220

Bier, E. H., Vaessin, S., Shepherd, S., Lee, K., McCall, S., Barbel, L., Ackerman, R., Carreto, R., Uemura, T., Grell, E., Jan, L. Y., Jan, Y. N., 1989. Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev.* **3**, 1273-1287

Brody, B., Stivers, C., Nagle, J., Odenwald, W. F., 2002. Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech. Dev.* **113**, 41-59

Carney, G. E., Wade, A. A., Sapra, R., Goldstein, E. S., Bender, M., 1997. *DHR3*, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12024-12029

Cherbas, L., Hu, X., Zhimulev, I., Belyaeva, E., Cherbas, P., 2003. EcR isoforms in *Drosophila*: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue. *Development* **130**, 271-284

Hortsch, M., Patel, N. H., Bieber, A. J., Traquina, Z. R., Goodman, C. S., 1990. *Drosophila neurotactin*, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* **110**, 1327-1340

Huet, F., Ruiz, C., Richards, G., 1993. Puffs and PCR: the *in vivo* dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development* **118**, 613-627

Huet, F., Ruiz, C., Richards, G., 1995. Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development* **121**, 1195-1204

Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G., Klämbt, C., 2000. *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* **26**, 357-370

Kraminsky, G. P., Clark, W. C., Estelle, M. A., Gietz, R. D., Sage, B. A., O'Connor, J. D., Hodgetts, R. B., 1980. Induction of translatable mRNA for dopa decarboxylase in *Drosophila*: An early response to ecdysterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4175 - 4179

Kraut, R., Menon, K., Zinn, K., 2001. A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**, 417-430

Mardon, G., Solomon, N. M., Rubin, G. M., 1994. *Dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-3486

Patel, N. H., Snow, P. M., Goodman, C. S., 1987. Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* **48**, 975-988

Paululat, A., Breuer, S., Renkawitz-Pohl, R., 1999. Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **296**, 151-160

Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C., Richards, G., 2000. *Krüppel-homolog*, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.*, **221**, 53-67

Richards, G., 1997. The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila*. In "Advances in developmental biochemistry" (P.M. Wassarman, Ed.), **5**, 81-135. JAI Press, Greenwich, CT.

Richards, G. P., 1981. The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **21**, 181-197

Robinow, S. and White, K., 1988. The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* **126**, 294-303

Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côté, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schröder, C., Kemler, R., Jäckle, H., 1986. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* **47**, 1025-1032

Sullivan, A. A. and Thummel C. S., 2003. Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol. Endocrinol.*

Talbot, W. S., Swyryd, E. A., Hogness, D. S., 1993. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**, 1323-1337

Tautz, D. and Pfeifle, C., 1989. A non radioactive *in situ* hybridization method for localisation of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* **98**, 81-85

Thummel, C., 1996. Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet.* **12**, 306-310

Török, T., Tick, G., Alvarado, M., 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

Yip, M. L., Lamka, M. L., Lipshitz, H. D., 1997. Control of germ-band retraction in *Drosophila* by the zinc-finger protein HINDSIGHT. *Development* **124**, 2129-2141

Données complémentaires

Introduction

Chez la drosophile, le premier pic d'ecdysone observé se produit durant la première moitié du développement embryonnaire, après six heures de développement (Kraminsky *et al.* 1980). Les effets de ce pic restent peu étudiés contrairement à ceux de la fin du troisième stade larvaire. Nous avons pu apporter précédemment certains éléments permettant de penser qu'une véritable réponse à l'ecdysone pouvait avoir lieu au cours de ce stade. C'est pourquoi, nous avons tenté d'étendre l'approche des cultures *in vitro* largement utilisée pour l'étude de la réponse hormonale de fin de troisième larvaire et de l'appliquer à une possible réponse hormonale embryogénique. Afin de voir si un apport exogène d'ecdysone pouvait avoir des conséquences sur l'expression de certains gènes au cours de l'embryogenèse, nous avons, dans des expériences préliminaires, laissé des embryons se développer dans un milieu contenant de l'ecdysone. Nous avons ensuite observé les effets de cet apport exogène sur l'expression de plusieurs d'entre eux.

Résultats

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que des embryons déchorionés pouvaient se développer dans le milieu de Grace pendant plusieurs heures à 25°C (température permettant un développement optimal de la drosophile). La majorité des embryons ne montrent pas de signes de gonflement, ni de flétrissement qui pourraient être causés par des problèmes de pression osmotique. Environ 40% des embryons effectuent la totalité de leur développement embryonnaire dans ce milieu de culture et donnent des larves, environ 40% sont bloqués en fin de stade embryonnaire tandis que 20 % restent bloqués aux stades précoces de l'embryogenèse.

Le titre d'ecdysone active n'étant pas connu au moment du pic de production de l'hormone au cours de l'embryogenèse, nous avons choisi une concentration d'ecdysone équivalente à celle existant en fin de troisième stade larvaire et au début du stade pré-pupal, c'est à dire $1,7 \cdot 10^{-6}$ M.

Dans une des séries d'expériences réalisées que nous allons décrire ici, des embryons stadés et déchorionés, âgés de cinq heures sont déposés deux heures dans milieu contenant de l'ecdysone. Parallèlement, deux cultures témoins sont menées. D'une part, des embryons de cinq heures, déchorionés, sont cultivés deux heures dans un milieu de culture sans ecdysone. D'autre part des embryons déchorionés, âgés de cinq heures, sont laissés deux heures sur le milieu de ponte sans traitement. Ces deux cultures témoins nous permettent de mettre en évidence les changements spécifiquement dus à la présence d'ecdysone et les changements imputables au mode de culture.

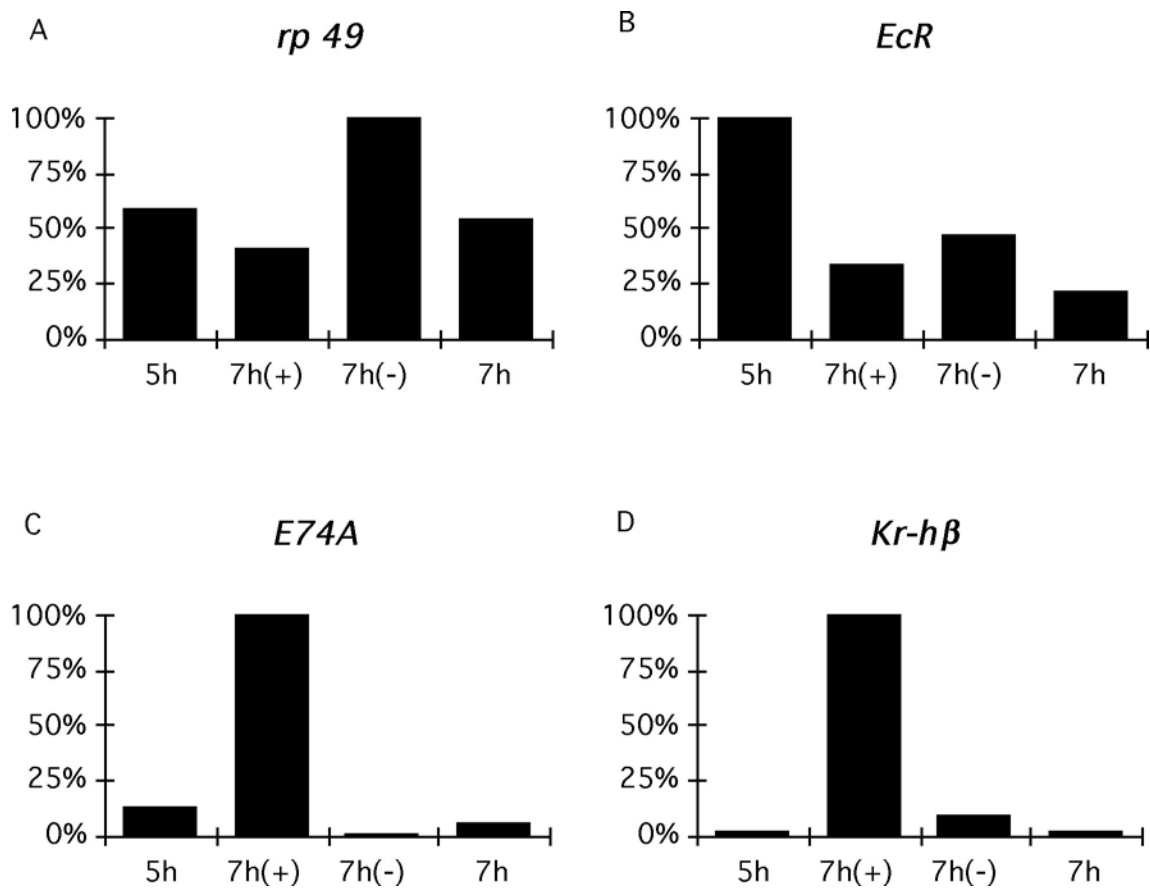


Figure 27. Expression relative de différents transcrits chez des embryons sauvages âgés de 5 heures (5h), de 5 heures puis mis en culture 2 heures dans un milieu avec $1,7 \cdot 10^{-6} M$ d'ecdysone (7h (+)), de 5 heures puis mis en culture 2 heures dans un milieu sans hormone (7h(-)), et de 7 heures n'ayant subi aucun traitement (7h). La valeur 100% représente l'expression la plus importante parmi les différents lots pour un transcrit donné. Les résultats montrés ont été corrigés en tenant compte des variations observées pour le témoin interne *rp49*. A : *rp49*, B: *EcR*, C: *E74A*, D: *Kr-hα*

Les ARN des différents lots sont extraits puis un fragment de chaque transcrit étudié est amplifié par RT-PCR. On constate que le taux de transcrits *rp49*, témoin interne, n'est pas identique d'un échantillon à l'autre (Figure 27A), cette différence liée à l'extraction de l'ARN

peut atteindre un facteur 3. Afin d'homogénéiser les résultats un facteur de correction est appliqué à chaque extraction.

E74A (Figure 27C) et *Kr-hβ* (Figure 27D) sont, en absence de traitement, faiblement exprimés à 5 et 7 heures. Cette faible expression est retrouvée chez les embryons mis en culture dans un milieu sans ecdysone. Par contre, les embryons mis en culture en présence d'ecdysone montrent une induction de ces deux transcrits. Huet *et al.* (1995) avaient déjà noté une telle induction de *E74A* dans la glande salivaire de larves de troisième stade par un apport d'ecdysone exogène. Il est par conséquent tout à fait intéressant d'observer le même phénomène chez l'embryon. D'autre part, le fait que *Kr-hβ* soit induit par l'hormone au cours de l'embryogenèse permet de nous conforter dans l'idée que le gène *Kr-h* est un gène intervenant dans la cascade de réponse à l'ecdysone.

Dans la glande salivaire des larves de troisième stade, l'augmentation d'ecdysone exogène induit la répression de *EcR*, toutes isoformes confondues. Nos résultats sur l'expression des transcrits *EcR* (Figure 27B) montrent une diminution de ces transcrits entre 5 et 7 heures dans les embryons non traités. Cette baisse pourrait être la conséquence du pic d'ecdysone endogène.

Si l'on compare la quantité d'ARN présent dans les embryons mis en culture, on constate une expression de *EcR* plus faible en présence d'ecdysone, ce qui une nouvelle fois correspond aux observations faites dans la glande salivaire.

Il apparaît avec ces premières expériences, que l'apport exogène d'ecdysone pendant 2 heures chez des embryons âgés de 5 heures a un effet inducteur sur la transcription de *E74A* et de *Kr-hβ*. Par contre, en ce qui concerne les autres gènes étudiés (données non montrées), les différences observées dans l'abondance des transcrits en présence ou en absence d'hormone ne semblent pas significatives.

Discussion

D'après les résultats préliminaires obtenus par la culture d'embryons en présence d'ecdysone, il semblerait que *Kr-hβ* soit induit par la présence d'hormone. Cependant, il s'avère nécessaire d'optimiser cette technique car si certains résultats obtenus sont

encourageants, comme l'induction importante par l'ecdysone de *Kr-h β* ou d'*E74A* par exemple, d'autres sont plus nuancés. En effet, dans le cas de *EcR*, nos études établissant le profil d'expression de ses trois isoformes au cours de l'embryogenèse ne mettent pas particulièrement en évidence une baisse de cette expression entre cinq et sept heures de développement. De nombreux facteurs sont susceptibles de venir perturber le développement normal de l'embryon au cours de ces expériences. D'abord, bien que les effets de chocs osmotiques soient peu observés, il est probable que l'homéostasie de l'embryon est perturbée. Ainsi, il est possible que l'hormone endogène se trouve diluée en diffusant vers le milieu extérieur. De plus, l'hormone *in vivo* s'accumule sous la forme d'un pic. Il est nécessaire qu'il y ait une augmentation, puis une diminution du titre d'ecdysone pour que la réponse à l'hormone soit efficace, ce qui n'est pas le cas dans nos expériences. Il conviendrait aussi d'augmenter le nombre d'embryons contenus dans un échantillon (ici 5), en effet le niveau d'expression de certains transcrits est si faible en valeur absolue, comme c'est le cas pour *EcR*, que la moindre augmentation ou diminution peut se traduire par un facteur multiplicatif important, pas forcément représentatif de la réalité. Enfin, il faut être conscient que très peu de choses sont connues sur les différentes formes d'ecdystéroïdes présents au cours de l'embryogenèse, ni en quelle quantité les formes les plus actives se trouvent, ni si ces formes actives sont les mêmes que celles agissant au cours de la métamorphose.

Cependant, en étudiant de façon systématique l'effet de l'apport d'ecdysone sur des embryons d'âge différent et ce, pendant des traitements de différentes durées, nous devrions pouvoir mettre en évidence la capacité de différents gènes à répondre au stimulus hormonal au cours du développement embryonnaire, ce qui n'a encore jamais été fait chez la drosophile.

Une telle étude devrait nous permettre de mieux appréhender la hiérarchie des gènes intervenant dans la réponse à l'hormone durant l'embryogenèse et de préciser les relations qu'entretient *Kr-h* avec eux.

Notre but à terme est de déterminer si les mécanismes moléculaires utilisés par les insectes holométaboles pour établir les formes larvaires et adulte reposent sur les mêmes molécules.

Matériels et méthodes

Deux prépontes de 30mn sont effectuées afin d'éviter que les femelles ne retiennent les embryons dans leur utérus et ainsi obtenir une ponte d'embryons synchrones. Aux prépontes, fait immédiatement suite une ponte de 15mn à 25°C. On laisse les embryons se développer à cette température jusqu'à l'heure souhaitée.

- 5 embryons sont alors récoltés et déposés dans un tube eppendorf contenant 25µl de tampon d'extraction, écrasés à l'aide d'une aiguille et immédiatement plongés dans l'azote liquide.

- 5 embryons sont déchorionés sur du ruban adhésif double face et déposés dans une cupule contenant 25µl de tampon de dissection en absence d'ecdysone, la cupule est recouverte d'une lamelle pour empêcher toute évaporation et placée à 25°C.

- 5 embryons sont déchorionés et déposés dans une cupule recouverte d'une lamelle contenant 25µl de tampon de dissection en présence d'ecdysone $1,7 \cdot 10^{-6}$ M puis placée à 25°C.

- 5 embryons sont laissés sur le milieu de ponte à 25°C et ne subissent aucun traitement.

Au terme de chacun des traitements, les différents lots d'embryons sont déposés dans des tubes eppendorf contenant 25µl de tampon d'extraction, écrasés et plongés dans l'azote liquide.

Les ARN des différents lots sont ensuite extraits pour analyse par RT-PCR comme décrits par Beck *et al.*, 2003. Après hybridation, la membrane sur laquelle est fixé l'ADN obtenu par RT-PCR est exposée entre 1 et 2 h sous un écran Fuji Type Bas-III. L'écran est ensuite lu grâce à un appareil phospho-imager Fuji Bas 2000 qui, une fois le bruit de fond déduit, donne l'intensité relative de la radioactivité contenue dans chaque bande d'ADN présente sur la membrane, cette intensité étant proportionnelle à la quantité d'ARN utilisée comme matrice au départ.

CHAPITRE III

Dynamic localisation of KR-H during an ecdysone response in *Drosophila*.

Cette étude a pour but de déterminer l'expression des protéines KR-H et de préciser le mode d'action de ces protéines au cours de la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la partie commune de KR-H pour déterminer leurs domaines d'expression dans les différents tissus des larves de fin de troisième stade larvaire ou de début de stade pré-pupal. Nos observations nous ont permis de montrer que KR-H est présent dans la quasi-totalité des tissus que nous avons observés, confirmant ainsi nos premiers résultats sur la distribution des transcrits obtenus par RT-PCR.

Nous nous sommes attardés ensuite à suivre l'expression des protéines KR-H dans la glande salivaire au cours de la réponse hormonale de fin de troisième stade larvaire. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que KR-H présente un domaine d'expression dynamique dans cet organe au cours de la réponse à l'hormone. En effet, KR-H est tout d'abord détecté dans la partie proximale de la glande salivaire avant de s'étendre à l'ensemble de l'organe. KR-H disparaît ensuite de la partie proximale puis perd peu à peu la localisation nucléaire qui était observée jusque là.

D'autre part, grâce à de nombreuses préparations de chromosomes polytènes provenant de glandes salivaires à différents stades de la réponse hormonale de fin de stade larvaire, nous avons pu localiser KR-H au niveau d'un nombre limité de loci. Cependant, un certain nombre d'entre eux contiennent des gènes importants des réponses à l'ecdysone et dont l'expression est perturbée chez les mutants homozygotes *Kr-h¹*. Enfin, de manière très intéressante, nous avons pu également montrer que la localisation de KR-H au niveau des chromosomes est dynamique pendant que progresse la réponse hormonale.

Dynamic localisation of KR-H during an ecdysone response in *Drosophila*

Yannick Beck, Claude Dauer and Geoff Richards*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP,

B.P. 10142, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France

To whom correspondence should be addressed. Fax : (33) 3 88 65 32 03. E-mail : richards@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract.

The propagation of a hormonal response following an increase in titre involves intensive cross-talk between the products of the key regulatory genes. The *Kr-h* gene of *Drosophila* is a modulator of both the embryonic and metamorphic hierarchies of ecdysone responsive genes, but its mode of action is puzzling as mutants have both quantitative and qualitative (timing) effects on the ecdysone responsive genes. We have used an antibody against KR-H to follow its distribution in larval tissues as they prepare for metamorphosis. While in most tissues protein levels remain stable, its distribution within the salivary gland changes throughout the late larval ecdysone response and the ensuing prepupal period. We show that, at the chromosomal level, KR-H localisation is dynamic and that the protein is recruited to, and released from, loci harbouring an important subset of the known regulatory genes as the response advances.

Introduction.

Hormonal signalling through members of the nuclear receptor superfamily is critical for many biological processes. Although the initial events leading to the induction of early target genes has been extensively studied in both vertebrates and invertebrates, we know relatively little concerning the temporal propagation of hormonal responses which include both early and late responding genes. Until the introduction of DNA arrays, relatively few target genes were known in such responses, with the notable exception of the ecdysone responses of *Drosophila* in which the activity of several hundred polytene chromosome puff loci had been described in detail during pupariation and pupation, an 18 hour period which marks the beginning of metamorphosis (Ashburner 1978). The genes contained within many of these puff sites have since been characterised and the waves of gene expression, often

involving promoter/isoform switching in the key genes of the regulatory hierarchies, have been studied at the molecular level (Richards, 1997; Thummel, 1996 for reviews). These studies have shown that, although there are many hormonal responses at different stages of development and in different tissues, the underlying mechanisms are similar in all the responses studied to date and indeed many of the same genes are involved.

In an attempt to find a factor specific to one such response we have studied *Krüppel-homolog* (*Kr-h*). Homozygous mutants carrying the first allele of this gene, *Kr-h¹*, pass the larval ecdysone responses and develop normally until the late prepupal period when they fail to complete the late prepupal ecdysone response (Pecasse *et al.*, 2000). However *Kr-h¹* expresses the embryonic specific *Kr-h β* isoform and is a hypomorph for the *Kr-h α* isoform, the major isoform at metamorphosis. A *Kr-h* null mutant that removes both the *Kr-h α* and *Kr-h β* isoforms, shows a delayed embryogenesis and dies shortly after hatching to a first instar larva (Beck *et al.*, submitted). In both the early (embryogenesis) and late (metamorphosis) *Kr-h* mutants there is a disruption of the expression of the key genes of the ecdysone response. Indeed the striking similarity of the waves of expression of these transcripts in wild type embryos and their disruption in the *Kr-h* mutant (Beck *et al.*, submitted) between embryogenesis and metamorphosis, is strong evidence that there is indeed an embryonic ecdysone response that coincides with the reported mid embryonic peak of hormone (Kraminsky, 1980).

The consequences of the *Kr-h* mutations are puzzling. In *Kr-h* mutants, expression of individual members of the ecdysone regulatory hierarchies can be too high or too low, too early or too late and different promoters of the same gene can be affected differently, thus disrupting the controlled isoform switching which is one characteristic of these responses. Although the effects on each transcript are modest (2 or 3 fold on expression levels, 1 or 2 hours asynchrony in timing) the combined result is a complete breakdown in the propagation

of the response, leading to lethality. To test our hypothesis that *Kr-h* is necessary for the cohesion of the hormonal responses we have studied KR-H localisation during the metamorphic response so as to benefit from the visual support of the giant polytene chromosomes of the salivary gland. While in most tissues KR-H levels appear constant, within the salivary gland, we find that KR-H does indeed bind the cytological loci harboring many of the genes of the ecdysone regulatory hierarchies and does so in a dynamic manner, rapidly changing its binding profile as the response proceeds.

Material and methods

Stocks

The Oregon-R wild type strain was maintained at 25°C on a standard agar medium.

Immunocytochemistry

The KR-H protein was detected using a rabbit polyclonal antibody raised against a GST fusion protein including KR-H amino acids 652 to 702 localised 3' to the zinc finger domain. In embryos this antibody marks tissues expressing *Kr-h* transcripts and fails to mark *Kr-h* deficiency homozygous embryos (Beck *et al.*, submitted).

Tissues

Tissues were dissected in PBS, 0.1% Triton X100 (Sigma) and fixed in PBS, 1.8% formaldehyde, 0.1% Triton X100 for 20 minutes on an agitator. All the subsequent steps were performed on an agitator. The tissues were pre-incubated three times in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum for 20 minutes. Anti-KR-H primary antibodies diluted 4000 times in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum were added and the tissues were incubated 2 hours. Thereafter, the antibody solution was removed and the embryos washed 3 times 20 minutes in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum. Secondary antibodies, Cy3-conjugated affinipure donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Jackson Immuno research 711-165-152) were used

and tissues incubated 2 hours. Finally, tissues were washed 2 times for 10 minutes in the pre-incubation solution then 4 times 10 minutes in PBS, 0.1% TRITON X100. Tissues were mounted in Fluoromount-G medium (Southern Biotechnology Associated, Inc.) and observed with an epifluorescence microscope.

Chromosomes

Salivary glands were dissected in PBS, 0.1% Triton X100, fixed in PBS, 1.8% formaldehyde for 10 to 20 seconds and then transferred to a drop of 1.8% formaldehyde, 45% acetic acid on a cover-slip, for 3 minutes. A poly-lysine coated slide was placed on the cover-slip which was then inverted. The cover-slip was first tapped across its whole surface with the tip of a paintbrush to disperse the chromosomes and then squashed with a finger in order to remove excess liquid. The slide was plunged into liquid nitrogen for 10 seconds and then the cover-slip removed with a scalpel. About 1ml of absolute ethanol at -20°C was added immediately and left for one minute to warm. The slide was then rinsed 2 times 15 minutes in PBS with gentle agitation and treated 2 times 10 minutes in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum. Anti-KR-H antibody, diluted 4000 times in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum, was added to the slide with a cover-slip to avoid desiccation. Chromosomes were incubated for 1 hour. The cover-slip was then removed and the excess antibody was washed 2 times 10 minutes with PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum. The Cy3 anti-rabbit secondary antibody (see above) was added and the chromosome preparation incubated as above for 45 minutes before rinsing 2 times 10 minutes in PBS, 0.1% Triton X100, 10% goat serum. The slide was rinsed 2 times 10 minutes in PBS with gentle agitation. The chromosome preparation was mounted in Fluoromount-G medium (Southern Biotechnology Associated, Inc.) and observed with an epifluorescence microscope.

Results

KR-H expression is ubiquitous at the onset of metamorphosis.

In situ transcript analyses revealed *Kr-h* expression to be restricted to the nervous system during embryogenesis (Beck *et al.*, submitted) while RT-PCR analyses showed expression in all tissues tested at pupariation (Pecasse *et al.*, 2000). Antibody studies of embryos confirmed that KR-H was restricted to neurones. We therefore undertook a study of KR-H localisation in late larval and prepupal tissues making a series of preparations from the second half of the third larval instar until the mid prepupal stage. KR-H is expressed in numerous organs in this period: imaginal discs, trachea, malpighian tubules, brain, muscles, fat body, salivary glands and gut (see Figure 1). With the exception of the salivary gland (see below), the localisation and intensity of the KR-H signal was relatively constant throughout this period in the different tissues (data not shown). However there were significant differences in the level and intracellular distribution of antibody staining between tissues. Staining was essentially nuclear in certain tissues (late larval salivary glands and trachea, Figure 1A and B) while in other tissues there was significant cytoplasmic staining in addition to a clear nuclear signal (fat body, malpighian tubules, imaginal discs and brain, Figure 1C to 1F). KR-H expression in the larval muscles was weak and, when observed by confocal microscopy, appeared punctate within the nuclei (Figure 1G). In the gut, staining was generally diffuse although certain cells showed a strong nuclear signal (e.g. the proventriculus, Figure 1H and data not shown). The relative level of proteins detected by the antibody was in agreement with the transcript levels seen in the previous RT-PCR analyses. However unlike those analyses, these experiments reveal localised concentrations of KR-H, for example at the extremities of the wing disc and in the larval brain complex.

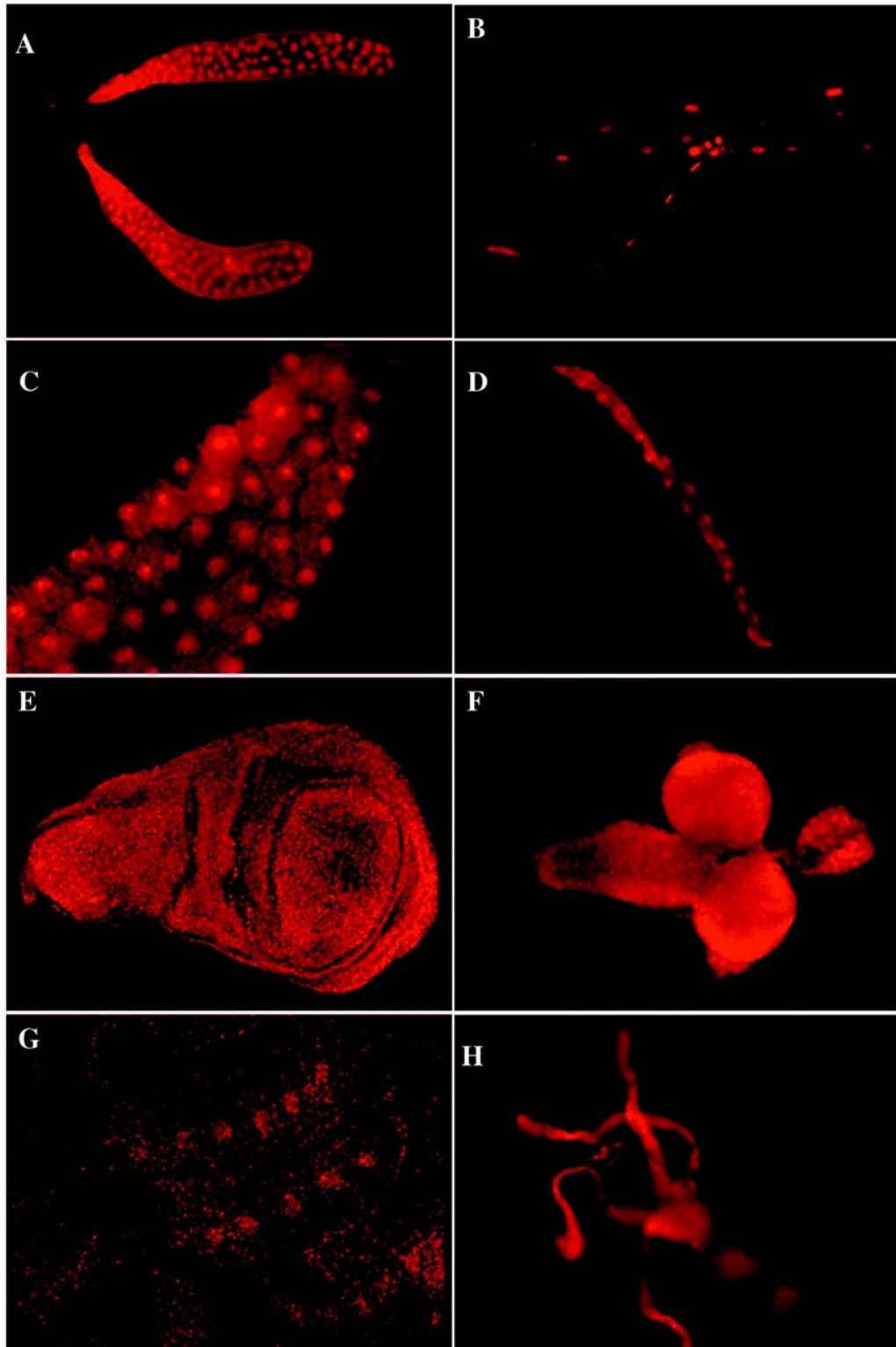


Figure 1. KR-H is localised in numerous organs between third larval instar and 2 hour prepupae. (A) Wandering third larval instar salivary glands. (B) White prepupal trachea. (C) Wandering third larval instar fat body. (D) Early third larval instar malpighian tubule. (E) Wandering third larval instar wing disc. (F) Wandering third larval instar brain. (G) Wandering third larval instar muscle. (H) White prepupal midgut. Observations were made with a classical epifluorescence microscope except for (E) et (G) which used a confocal microscope.

Thus although many of these tissues respond to ecdysone at the end of the third larval instar, this is not reflected by obvious changes in the level or localisation of KR-H during this period.

Salivary gland KR-H expression is dynamic during the late larval and prepupal ecdysone responses.

In contrast to these tissues, KR-H shows a dynamic localisation in salivary glands during late larval and late prepupal ecdysone responses. We followed KR-H from the late third larval instar wandering phase until the histolysis of the gland some 12 hours after pupariation (Figure 2).

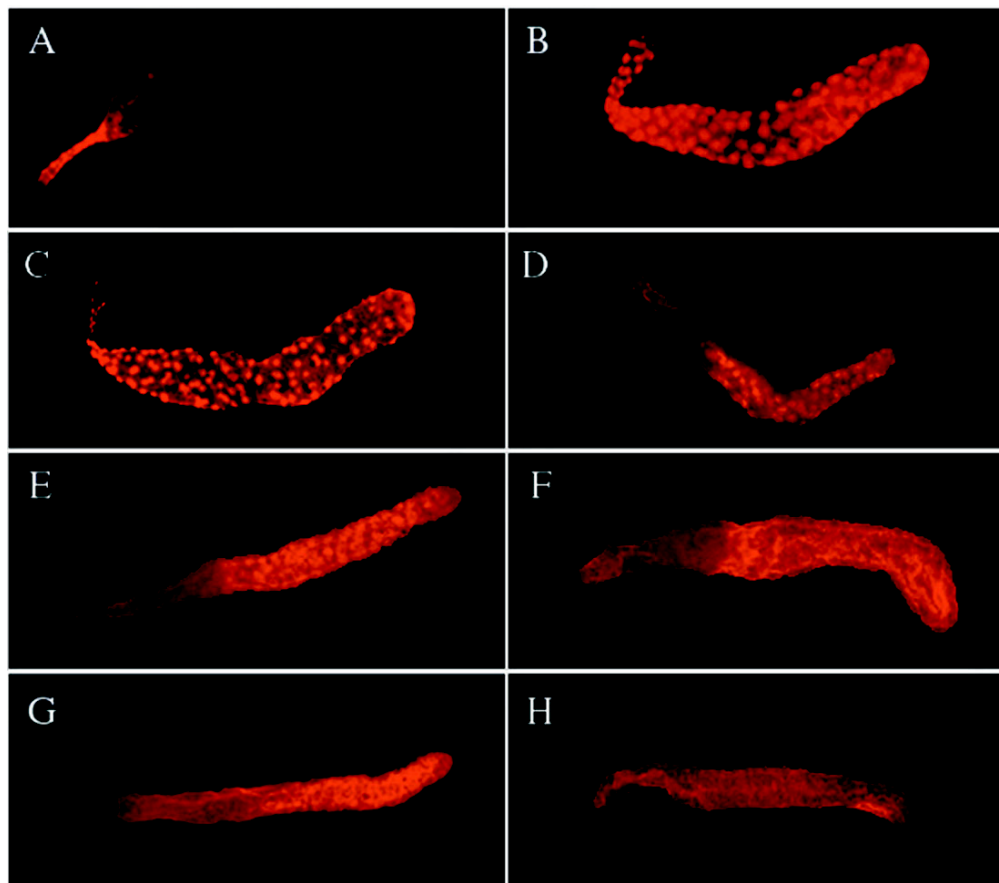


Figure 2. KR-H localisation in salivary glands during the late third larval instar and the late prepupal ecdysone responses. Salivary glands from: wandering third instar larva (A), white prepupa (B), 2 hour prepupa (C), 6 hour prepupa (D), 8 hour prepupa (E), 10 hour prepupa (F), 11 hour prepupa (G) and 12 hour prepupa (H).

Initially KR-H is detected in nuclei of the anterior cells of the salivary gland (Figure 2A) and expression extends progressively towards the posterior of the gland showing a strong nuclear localisation in all cells by pupariation (Figure 2B). This is maintained 2 hours after pupariation (Figure 2C) whereafter the protein disappears from the anterior cells (see 6h prepupa, Figure 2D), while remaining essentially nuclear in the rest of the gland. *Kr-h* transcripts are no longer detectable in the salivary gland from 6h after pupariation (Pecasse *et al.*, 2000) and the KR-H protein progressively loses its predominantly nuclear localisation (Figure 2E and F) and the antibody signal becomes diffuse as histolysis approaches (Figure 2G and H). In the first phase, this pattern of expression resembles that of the ecdysone induced E74A protein in late larval and early prepupal salivary glands (Boyd *et al.*, 1991). By 2 hours after pupariation the E74A protein has lost its nuclear localisation while that of KR-H remains throughout the mid prepupal period.

KR-H localisation to polytene chromosome bands evolves during the ecdysone response

Analyses of *Kr-h* mutants have shown that *Kr-h* is necessary for the normal progression of the larval and prepupal ecdysone responses in salivary glands. Given the dynamic nuclear localisation of the protein seen in this tissue, we sought to localise the protein on the polytene chromosomes of the salivary gland. An initial analysis, using chromosomes from a white prepupal salivary gland shows that KR-H localises to a relatively small number (30 to 40) of major sites (Figure 3). We extended this analysis using glands from 110 hour larvae, late third instar larvae in which the ecdysone response was initiated, white prepupae and 2 hour prepupae. Table 1 summarises the major sites that were marked at at least one time point. Many (19 out of 45), correspond to puff sites (Ashburner 1972), eight of which contain known ecdysone regulated genes of the late larval and prepupal ecdysone

response. Transcripts of six of these puffs are altered in the *Kr-h¹* mutant, including *Kr-h* itself (Pecasse *et al.*, 2000).

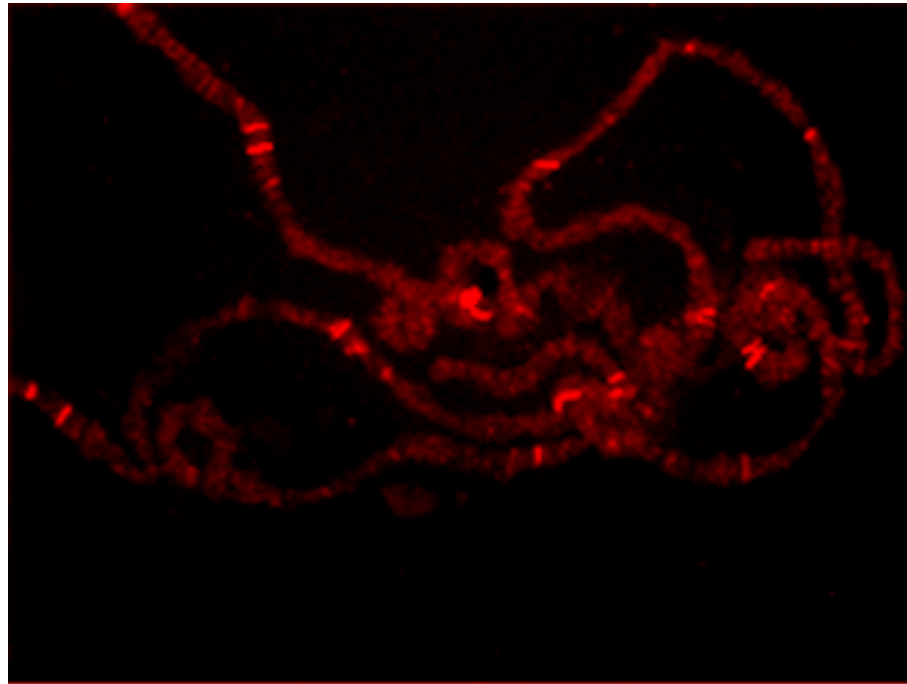


Figure 3. Binding of the antibody directed against KR-H to the polytene chromosomes isolated from a 0h prepupal salivary gland.

X	2L	2R	3L	3R
1C	24C	42A*	63D	86F
2A	26BC*	42B	64B	87B
2B*	29A	42 F	67B	87C
2C		47D	67D	92B
3A		48A	74C	93F*
3CD		48B	74EF*	94A
3EF		48 F	75B*	98C
9C		50D	75D*	98F
9E		52D		
		52E		
		56E		
		56F		
		57B		
		58F		
		59C		
		59E		
		60A		

Table 1. Polytene chromosome loci bound by KR-H. The ecdysone regulated puffs are indicated in bold. (*) indicates puffs that contain a gene for which expression is disturbed in *Kr-h¹* mutants.

Figure 4 presents these results as developmental series for chosen chromosome regions that were characterised in several nuclei at each time point.

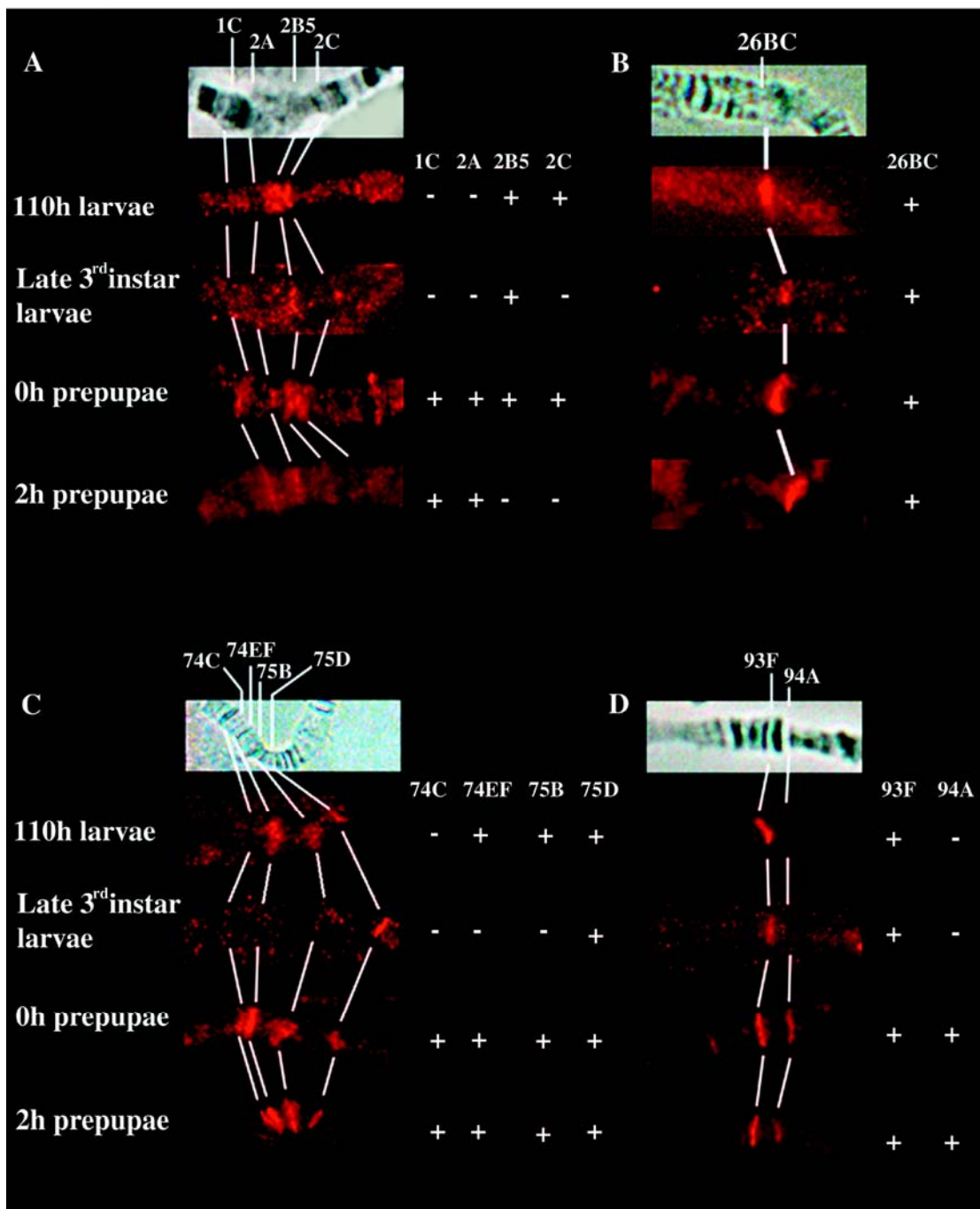


Figure 4. KR-H localisation in four regions of the polytene chromosomes during the late third larval instar ecdysone response. (A) Extremity of the X chromosome where the 2B5 locus containing the *BR-C* gene is located. (B) Region of the 2L chromosome containing the *Kr-h* locus 26B/C. (C) Region of the 3L chromosome containing the *E74*, *E75* and *βFTZ-F1* loci, respectively : 74EF, 75B, 75D. (D) Region of the 3R chromosome with the *E93* transcription factor locus : 93F. The ecdysone response is shown at four time points : 110h larvae, late 3rd instar larvae, 0 and 2h prepupae.

While certain bands showed a relatively constant staining level, KR-H staining was dynamic at other sites. In the region of the *broad-complex* (*BR-C*) staining was observed on 2B5 from the late third instar until pupariation while 1C and 2A were only marked from pupariation onwards. 2C staining was biphasic. Strong KR-H staining was observed at 26BC in the vicinity of the *Kr-h* locus throughout the response (Figure 4B) which is consistent with suggestions of an autoregulation of the locus derived from the analysis of transcripts in *Kr-h* mutants (unpublished results). In the 74/75 region there are two prominent zones which are marked throughout this period except during the period of the puffing of 74EF and 75B which harbor the *E74* and *E75* ecdysone induced genes. 75CD, which contains the *βFTZ-F1* gene, is marked throughout this period which precedes the mid prepupal expression of the gene. Finally the 3R chromosome region containing the late prepupal 93F puff/*E93* gene is also marked uniformly while the adjacent 94A locus is marked only after pupariation (Figure 4D). Thus the pattern of KR-H localisation on polytene chromosomes evolves throughout the late larval ecdysone response.

Discussion.

Localisation and levels of KR-H in early metamorphosis

The present study completes our analysis of *Kr-h* transcripts and proteins during embryogenesis and early metamorphosis and confirms that the KR-H proteins follow the *Kr-h* transcript pattern. Thus it appears that *Kr-h* regulation is mainly at the level of transcription although with our current antibody we cannot exclude that KR-H may be subject to post translational modifications. The protein is localised essentially in the nucleus, which is consistent with the presence of eight zinc fingers and the widespread consequences of *Kr-h* mutants on transcript levels in the ecdysone hierarchies (Pecasse *et al.*, 2000; Beck *et al.*, submitted). Whole larvae transcript analyses and *in vitro* salivary gland studies showed that

Kr-h α is present from the mid instar onwards and that the late instar ecdysone induction is modest (Pecasse *et al.*, 2000). It is therefore not unexpected that KR-H protein levels appear stable in the majority of tissues, a notable exception being the distribution of KR-H within the salivary gland. Such a behaviour in the salivary gland is not unique as E74A showed a similar progression during the late larval to early prepupal period (Boyd *et al.*, 1991). However the late larval ecdysone induction of E74 causes at least a hundred fold change in transcript levels which is reflected in protein levels in most tissues (Boyd *et al.*, 1991).

Kr-h distribution is dynamic in salivary glands during the late larval ecdysone response.

KR-H is localised to relatively few major sites in the polytene chromosomes, at least in comparison with the products of other known actors of the ecdysone response (for example β FTZ-F1 >150, Lavorgna *et al.*, 1993; BR-C > 300 Gonzy *et al.*, 2002; E93: 65, Lee *et al.*, 2000). This suggests that a limited number of key genes are modulated by KR-H at this stage, although we cannot exclude that further sites show a low binding affinity resulting in a weak signal. The presence of zinc finger motifs in the KR-H protein and its localisation to precisely defined chromosomal regions suggests that KR-H is indeed binding to DNA. It is unlikely to be binding RNA as although often bound in the vicinity of puff sites it does not mark active puffs. However it is possible that its localisation is regulated by protein-protein binding in complexes that are positioned in the regulatory regions of these genes.

We looked for a correlation between the profile of KR-H binding to a given locus and the expression profile of the different ecdysone regulated transcripts contained in the locus. KR-H binds to E74A, E75A, β FTZ-F1, E93 and *Kr-h β* at periods of low or no expression of these transcripts during the late larval ecdysone response (Huet *et al.*, 1993; Baehrecke and Thummel, 1995; Pecasse *et al.*, 2000) while in its absence they are expressed. Thus the dynamism of KR-H binding correlates with the dynamism of their expression and suggests

that KR-H participates in the repression of *E74A*, *E75A*, *βFTZ-F1*, *E93* and *Kr-hβ*. In contrast, there is no obvious link between KR-H binding at the locus 2B5 and the expression of different Br-C isoforms, although we would not detect changes linked with isoform switching by this approach.

We have previously described perturbations in the expression of ecdysone regulated genes during the prepupal period in *Kr-h¹* mutants (Pecasse *et al.*, 2000). Of those genes whose expression is disturbed, KR-H proteins bind the *E74*, *EcR*, *βFTZ-F1*, *E75*, *E93*, *diap2* loci during the late larval response. For the other transcripts studied by Pecasse *et al.* (*DHR3*, *hid*, *rpr*,) the KR-H protein may arrive at these loci later during the prepupal period or they may represent secondary targets in the response. However the localisation does not in itself predict the consequences on gene expression. If *βFTZ-F1* is upregulated in the *Kr-h¹* mutant, as would be predicted from the above analysis in the wild type, *E93* is underexpressed at the end of the prepupal period in the mutant, as is the anti-apoptotic gene *diap2*. For the remaining transcripts, problems in the mutant are essentially in the timing of their expression. Thus at the end of the late larval ecdysone response, 3 to 4 hours after pupariation, the second increase in *E75B* transcripts is late and their repression is delayed as is the case for *E74A* transcripts. The mid-prepupal inductions of *E74B* and *EcRB* isoforms are advanced, perhaps linked to the absence of KR-H, seen at 74EF and the *EcR* locus (42A) in wild type glands (Table 1). As in mid third instar larval glands, *E75C* transcripts follow those of *E74B* and *EcR* and are induced early in the mutant. The consequences of the lack of KR-H in the mutant are complex at the *E74* and *E75* loci during the late prepupal response. While the period of *E75B* activity is advanced, the induction of both *E74A* and *E75A* transcripts is delayed (Pecasse *et al.*, 2000). However, as for the BR-C complex, immunolocalisations of KR-H on these loci at this stage are unlikely to be informative as the degree of resolution is not sufficient to detect errors in isoform switching.

Autoregulation and crosstalk in the ecdysone hierarchies.

It is clear from studies of the regulation of the ecdysone response that the process is far from a linear response. One of the earliest hypotheses to explain the limited temporal expression of early gene expression/puff activity, notably E74EF and E75B, was that of autoregulation that ensured that the hormonal signal was a discrete switching event (Ashburner *et al.*, 1974). Immunolocalisation studies support this hypothesis as E74A binds the 74EF puff site (Urmess and Thummel, 1990) and E75A binds at 75B (Hill *et al.*, 1993). However the principle appears even more general as the early late gene DHR3 protein binds at 46F (Lam *et al.*, 1997), the mid prepupal intermolt gene β FTZ-F1 protein binds at 75C/D (Lavorgna *et al.*, 1993) while the late prepupal ecdysone response puff 93F is bound by E93 (Lee *et al.*, 2000). Indeed the only notable exception is that of the BR-C proteins that do not bind the 2B5 locus at the end of the third larval instar (Gonzy *et al.*, 2002). The fact that KR-H is able to bind its own locus, suggests that an autoregulation also exists for *Kr-h*, which would explain the aberrant transcripts observed in some of the *Kr-h* mutant alleles (Pecasse *et al.*, 2000 and our unpublished results). It is of course noteworthy that all of these proteins bind at least a subset of the other known regulators providing a graphic illustration of the crosstalk between the factors that is necessary for the normal progression of the response.

Acknowledgements

We thank the IGBMC core facilities for confocal microscopy and antibody production. This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Hôpital Universitaire de Strasbourg and studentships from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and the Association pour la Recherche sur le Cancer to Y.B.

References

- Ashburner, M. (1972) in *Developmental studies on giant chromosomes : Results and problems in cell differentiation*, ed. Beermann, W (Springer-Verlag, Berlin) **4**, 101-151
- Ashburner, M. & Berendes, H. D. (1978) in *The Genetics and Biology of Drosophila melanogaster*, eds. Ashburner, M. & Wright, T. R. F. (Academic press, New-York), **2b**, pp. 315-395
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. & Richards G. (1974) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 355-662
- Baehrecke, E. H. & Thummel, C. S. (1995) *Dev. Biol.*, **171**, 85-97
- Boyd, L., O'Toole, E., & Thummel, C. S. (1991) *Development*, **112**, 981-995
- Gonzy, G., Pokholkova, G. V., Peronnet, F., Mugat, B., Demakova, O. V., Kotlikova, I. V., Lepesant, J. -A., & Zhimulev, I. F. (2002) *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 121-132
- Hill, R. J., Segraves, W. A., Choi, D., Underwood, P. A. & Macavoy E. (1993) *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**, 99-104
- Huet, F., Ruiz, C. & Richards, G. (1993) *Development*, **118**, 613-627
- Kraminsky, G. P., Clark, W. C., Estelle, M. A., Gietz, R. D., Sage, B. A., O'Connor, J. D. & Hodgetts, R. B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4175 - 4179

Lam, G. T., Jiang, C. & Thummel, C. S. (1997) *Development* **124**, 1757-1769

Lavorgna, G., Karim, F. D., Thummel, C. S., & Wu, C. (1993) *Proc. Natl. Acad. USA*, **90**, 3004-3008

Lee, C.-Y., Wendel, D. P., Reid, P., Lam, G., Thummel, C. S., & Baehrecke, E. H. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 433-443

Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C., & Richards, G. (2000) *Dev. Biol.*, **221**, 53-67

Richards, G. (1997) *Adv. in Dev. Biol.* **5**, 81-135

Thummel, C. S. (1996) *Trends Genet.* **12**, 306-310

Urness, L. D & Thummel, C. S. (1990) *Cell* **63**, 47-61.

CHAPITRE IV

***Kr-h* au cours du stade pupal de la drosophile**

Introduction

Nos précédentes études ont montré l'importance de *Krüppel-homolog* à la fois au cours de l'embryogenèse et de la réponse à l'ecdysone de fin de troisième stade larvaire pour permettre à la drosophile d'entrer dans le stade pupal. L'ensemble des études menées au cours de ces stades a montré que l'absence de *Kr-h*, ou sa mauvaise expression, pouvaient avoir des conséquences plus ou moins importantes sur l'expression d'un certain nombre de gènes connus pour être régulés par l'ecdysone au cours des réponses hormonales de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal. En outre, nos observations effectuées au cours du stade embryonnaire permettent de faire l'hypothèse de l'existence d'une véritable réponse hormonale, mettant en jeu au moins une partie des gènes déjà impliqués dans les réponses hormonales de fin de stade larvaire et prépupal.

Dans cette étude, nous avons essayé de savoir si le fait de corriger la mauvaise expression de *Kr-h α* grâce à l'utilisation d'un transgène *hs-Kr-h α* chez les mutants *Kr-h^l* qui présentent une mauvaise expression de *Kr-h* pouvaient leur permettre de passer la réponse hormonale de fin de stade prépupal et leur permettre d'atteindre le stade adulte. Notre approche a permis à une certaine proportion de ces individus d'entrer effectivement dans le stade pupal. Cependant, une partie très importante de ces individus meurent dès le début du stade pupal ou à la fin de ce stade, incapables d'atteindre le stade adulte. Nous avons alors dressé le profil d'expression de *Kr-h* au cours de l'ensemble de la métamorphose et mis en évidence une induction de *Kr-h* à la fin du stade pupal. Après comparaison du profil d'expression de *Kr-h* au cours de la métamorphose avec celui d'autres gènes régulés par l'ecdysone, il semble qu'en plus d'une réponse à l'ecdysone en milieu de stade pupal, une autre réponse hormonale puisse avoir lieu à la fin de ce stade, réponse au cours de laquelle *Kr-h* pourrait jouer un rôle important.

Résultats

Expériences de sauvetage: utilisation d'un transgène *Kr-h α* sous contrôle d'un promoteur thermosensible.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de *Kr-h* au cours de la réponse hormonale de fin de stade prépupal, nous avons utilisé une souche de drosophiles *Kr-h¹* transgéniques, dans le génome desquelles un transposon contenant l'ADN codant de *Kr-h α* sous contrôle d'un promoteur thermosensible a été inséré (Pécasse, 1998). Afin de sauver les individus homozygotes pour l'allèle *Kr-h¹* présentant une létalité de fin de stade prépupal, plusieurs traitements à la chaleur ont été testés au cours de différentes étapes de la réponse hormonale de fin de stade larvaire. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus en soumettant des larves errantes de troisième stade larvaire à un choc modéré de 30°C pendant une période relativement longue de trois heures trente (Figure 28.).

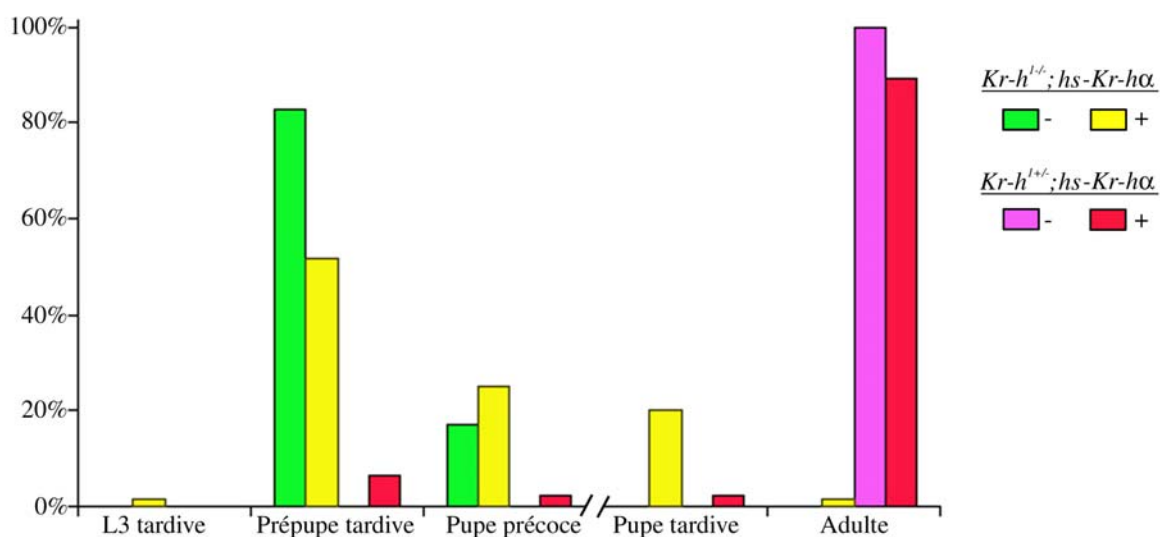


Figure 28. Pourcentage des animaux hétérozygotes et homozygotes *Kr-h¹* portant le transgène *hs-Kr-h α* mourant aux différents stades de développement après (+) ou non (-) un choc thermique. Le choc thermique consiste en une exposition de larves de fin de troisième stade larvaire à une température de 30°C pendant 3h30.

Les résultats de cette expérience sont assez mitigés dans le sens où, la proportion de d'individus *Kr-h¹* homozygotes choqués parvenant au stade adulte reste très modeste (environ 1%) alors que dans le même temps la proportion des individus présentant un phénotype de létalité en fin de stade prépupal reste importante avec près de la moitié des individus. Cependant, une catégorie d'animaux relativement conséquente, avec 46,4% des animaux,

présentant un phénotype de sauvetage partiel apparaît. Les individus de cette catégorie peuvent être divisés en deux groupes distincts. Un premier groupe est caractérisé par des animaux mourant juste après le début du stade pupal tandis que le second groupe comprend des animaux mourant à la fin de ce dernier stade.

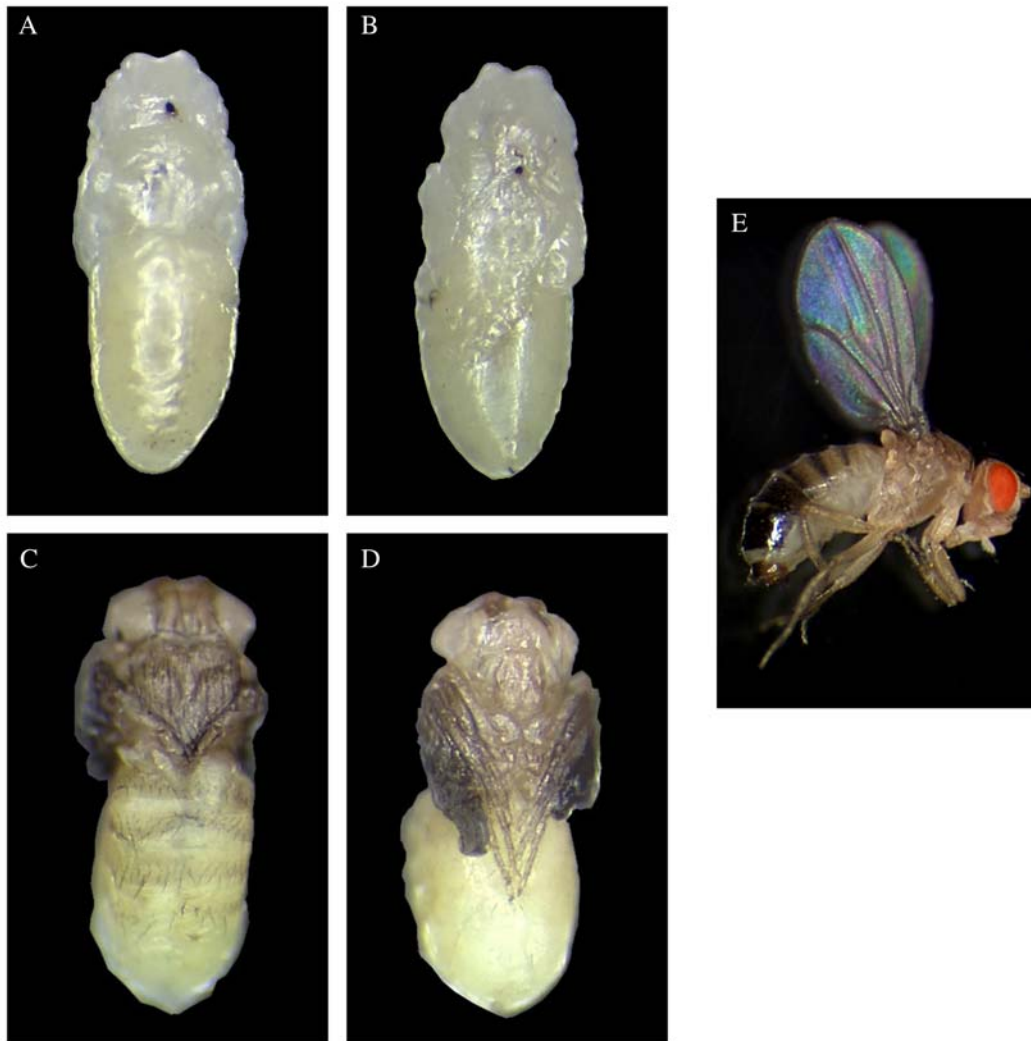


Figure 29. Phénotype des individus *Kr-h^{1-/-}, hs-Kr-hα* partiellement ou totalement sauvés par un choc thermique de 30°C pendant 3h30, appliqué à la fin du troisième stade larvaire. (A-B) : phénotype des animaux mourant au début du stade pupal en vue dorsale (A) et ventrale (B). (C-D) : phénotype des animaux mourant à la fin du stade pupal en vue dorsale (C) et ventrale (D). (E) : individu viable totalement sauvé et ne présentant pas de phénotypes particuliers.

Chez les animaux présentant une létalité de début de stade pupal, près d'un quart des individus homozygotes, on peut clairement discerner la forme de l'abdomen, du thorax et de la tête qui vient juste de s'éverter (Figures 29A, B). Le dessin des pattes ainsi que celui des ailes sont également discernables. On peut associer ces individus au stade P5 de développement tel qu'il a été défini par Bainbridge et Bownes (1981).

Les 20% d'individus caractérisés par une mort en fin de stade pupal présentent des ailes bien colorées en noir, on note aussi la présence des soies à la fois sur la tête, le thorax, l'abdomen et les pattes (Figures 29C, D). La segmentation des pattes est bien visible. Ces observations permettent d'estimer que ces individus ont atteint le stade P13 de Bainbridge et Bownes, confirmant un arrêt du développement en fin de stade pupal. Outre le phénotype de létalité observé chez ces animaux, aucun autre phénotype n'a pu être mis en évidence. De la même façon, les quelques individus viables parvenant au stade adulte semblent tout à fait normaux (Figure 29E).

Un autre résultat intéressant ressort de cette expérience, en effet on relève que 17% des individus homozygotes pour la mutation $Kr-h^1$ et pour le transgène $Kr-h\alpha$ passent la transition prépupe-pupe et meurent au début du stade pupal (Figure 28) sans pour autant que ces individus ne soient soumis à un choc thermique. Dans le même temps, les animaux homozygotes $Kr-h^1$ dépourvue de transgène $Kr-h\alpha$ montrent une létalité proche de 100% des animaux homozygotes en fin de stade prépupal (Pécasse *et al.*, 2000). Ce constat mène à penser que la présence seul du transgène $Kr-h\alpha$ et son niveau d'expression basal (Pécasse, 1998) fournissent suffisamment de transcrits $Kr-h\alpha$ à ces individus pour passer la réponse à l'ecdysone de fin de stade prépupal sans cependant leur permettre de poursuivre plus loin leur développement.

Le même type de traitement thermique a été réalisé sur des larves errantes de troisième stade larvaire hétérozygotes pour l'allèle $Kr-h^1$ et portant le transgène $Kr-h\alpha$ à l'état homozygote. Lorsque ces animaux ne subissent aucun choc thermique, on observe que la totalité d'entre eux parvient au stade adulte. Ce résultat montre que la présence de l'allèle sauvage $Kr-h$ permet d'assurer le développement correct des individus et permet de vérifier que dans ce cas, la présence du transgène $Kr-h\alpha$, s'il n'est pas induit, ne présente aucun effet délétère. Cependant, lorsque ce dernier est induit par un choc thermique on observe la mort d'environ 6% des individus hétérozygotes pour $Kr-h^1$ à la fin du stade prépupal et de 2% en début de stade pupal et 2% en fin de stade pupal. Afin de déterminer si cette létalité était la conséquence du choc thermique en lui même (en tant que stress), nous avons fait subir le même type de traitements à des individus hétérozygotes pour $Kr-h^1$ mais ne portant pas le transgène $Kr-h\alpha$ dans leur génome, nous avons alors observé un taux de létalité d'environ 4% à la fin du stade prépupal (données non montrées). Ce résultat n'étant pas significativement

différent des 6% de mortalité en fin de stade pré-pupal relevés chez les animaux transgéniques hétérozygotes choqués, on peut penser que cette létalité est plutôt liée au stress lié au choc thermique plutôt qu'à l'induction proprement dite du transgène.

Expression de *Kr-h* et des principaux transcrits régulés par l'ecdysone au cours du stade pupal.

La principale interrogation découlant des expériences de chocs thermiques est la suivante : pourquoi près de 20% des individus homozygotes pour l'allèle mutant *Kr-h¹* chez qui l'on induit *Kr-h α* en fin de stade larvaire parviennent à passer les réponses à l'ecdysone de fin de stade larvaire et de fin de stade pré-pupal, se développent apparemment normalement au cours du stade pupal pour finalement mourir à la fin de ce stade, sans parvenir au stade adulte?

Afin d'essayer de répondre à cette question, nous avons entrepris de déterminer le profil d'expression de *Kr-h* au cours de l'ensemble de la métamorphose. Les ARNs issus de dix groupes de cinq animaux sauvages stadés au stade pré-pupe blanche ont été extraits toutes les 12h à partir de ce point. Les ARNs ont ensuite été utilisés comme matrices pour effectuer une série de RT-PCR.

On observe tout d'abord une forte induction de *Kr-h α* dans les pré-pupes de 0h et son absence, 12h tard, à la fin du stade pré-pupal (Figure 30) confirmant nos précédentes observations (Pécasse *et al.*, 2000). Entre 12 et 84h après le début du stade pré-pupe, *Kr-h α*

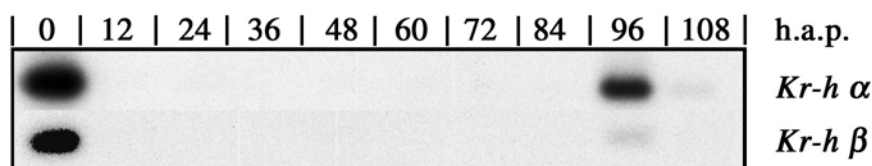


Figure 30: Profils d'expression de *Kr-h α* et *β* au cours de la métamorphose de la drosophile.

n'est pas exprimé, par contre on observe son induction chez les pupes âgées de 96h immédiatement suivit par sa répression chez les pupes de 108h. On observe que l'expression de *Kr-h β* au cours de la métamorphose suit celle de *Kr-h α* bien que son niveau d'expression reste plus modeste que ce dernier.

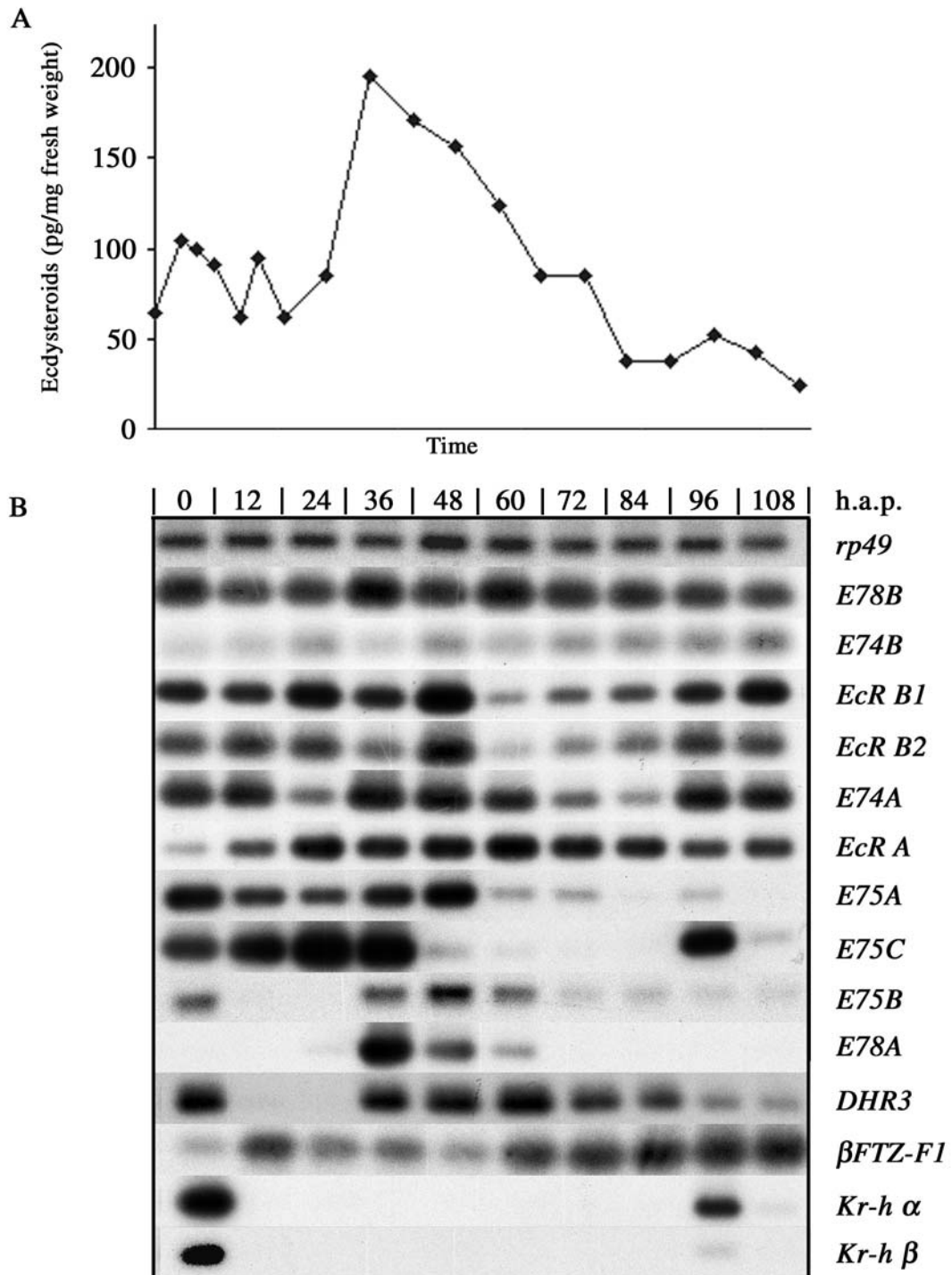


Figure 31: (A) évolution du titre des ecdystéroïdes (Pak et Gilbert, 1987) et (B) profil d'expression des principaux gènes sous contrôle de l'ecdysone au cours de la métamorphose de la drosophile.

Ces résultats laissent penser que la courte induction de *Kr-h* en fin de stade est nécessaire aux dernières étapes du développement et à l'éclosion de l'animal. Nous avons déterminé le profil d'expression au cours de cette période des principaux autres transcrits connus pour être régulés par l'ecdysone au cours des réponses de fin de stades larvaire et préupal (Figure

31B). Pour ce faire nous avons utilisé les mêmes préparations d'ARNs que celles utilisées pour déterminer le profil d'expression de *Kr-h* .

D'un point de vue global, on peut distinguer trois périodes. La première période se situe entre 0 et 12h, on observe alors que *E75B* et *DHR3* sont exprimés à 0h mais réprimés 12h plus tard, alors que *EcRA* faiblement exprimé à l'entrée du stade prépupal commence à être induit 12h plus tard. Comme *EcRA*, *βFTZ-F1* est peu présent à 0h prépupe alors qu'il est induit à 12h, cependant contrairement à *EcRA* dont le niveau d'expression demeure important pendant plusieurs jours, l'expression de *βFTZ-F1* est partiellement réprimé 12h plus tard, c'est à dire un jour après l'entrée dans le stade prépupal.

Une seconde période se situe entre 36 et 72h après le début du stade prépupe. Ainsi à 36h, *E75B*, *E78A*, *DHR3* et dans une moindre mesure *E74A* sont induits. Parallèlement à ces inductions, on observe que *E75C* est réprimé à 48h après puparaison tout comme *EcR1*, *B2* et *E75A* 12h après. Entre 60 et 72h, on assiste à la répression de *E75B* et *E78A* ainsi que de *E74A*, encore une fois dans une moindre mesure. *βFTZ-F1*, quant à lui est réinduit .

La troisième période couvre les dernières 24h de la métamorphose et est centrée sur 96h après le commencement du stade prépupal. *E75C*, tout comme nous l'avons vu pour *Kr-hα* et *β* est induit "ponctuellement" à 96h prépupe. *EcR1* et *B2* sont exprimés de façon plus importante. Enfin, *E74A* est induit à nouveau tandis que *DHR3* est réprimé.

Nous avons essayé de déterminer si les profils d'expression établis au cours de la métamorphose étaient en relation avec les variations du titre d'ecdysone au cours de ce même stade. Pour ce faire nous avons comparé ces profils avec la variation du taux d'ecdystéroïdes tel qu'il a été établi par Pak et Gilbert (1987) (Figure 31A). On peut ainsi constater que l'on peut retrouver les trois périodes que nous avons définies plus haut. La première période s'étalant entre 0 et 12h prépupe est caractérisée par l'existence des deux pics bien référencés, à l'origine des réponses de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal. Entre 36 et 72h, on observe un très important pic d'ecdystéroïdes qui recouvre la seconde période et enfin une plus modeste élévation du titre d'hormones est relevée à la fin du stade pupal couvrant la dernière période que nous avons définie.

Discussion

L'expression au début du stade prépupal de *Kr-h* est nécessaire à la drosophile pour que celle-ci puisse entrer dans le stade pupe (Pécasse *et al.*, 2000). De la même manière, il semble que l'induction de *Kr-h* en fin de stade pupe, dépendant peut-être de l'augmentation d'ecdysone à ce stade, soit nécessaire à l'animal pour terminer son développement et sortir du stade pupal et entrer dans le stade adulte. Les expériences de chocs thermiques effectuées sur des individus homozygotes pour la mutation *Kr-h^l* montrent que 20% des animaux choqués en fin de stade larvaire sont capables d'entrer dans le stade prépupe et de se développer jusqu'à la fin du stade pupal. Cependant ces animaux en l'absence de *Kr-h* semble incapable de poursuivre plus avant leur développement. Pourtant une faible proportion d'animaux est capable de dépasser cette étape pour éclore. Pour ces derniers, on peut se demander si le niveau basal d'expression du transgène *Kr-h α* (Pécasse, 1998) a été suffisant pour leur permettre de poursuivre leur développement.

On peut également s'interroger sur l'induction de *Kr-h* 96h après le début du stade prépupe. En effet, parmi tous les transcrits observés, seul *Kr-h α* et dans une moindre mesure *Kr-h β* montrent un tel profil d'expression qui leur est propre en n'étant présents qu'à 0 et 96h prépupe. Si *E75C* est également induit "ponctuellement" à 96h, il l'est cependant aussi au cours des 36 premières heures de la métamorphose. Le facteur de transcription *E93* montre le même type de profil avec une induction entre la fin du stade prépupal et le début du stade pupal et une seconde induction ponctuelle 96h après l'entrée en stade prépupe (Baehrecke et Thummel, 1995). Pourtant les mutations décrites concernant *E93* provoquent la mort des individus à un stade relativement précoce du développement pupal (Lee *et al.*, 2000), laissant penser que ces létalités sont dues à la mauvaise expression du gène au moment de la transition prépupe-pupe. Ces observations suggèrent l'existence d'une véritable réponse à l'ecdysone telle qu'elle existe à la fin du troisième stade larvaire et qui serait déclenchée par la légère augmentation du titre d'ecdystéroïdes détectée par Pak et Gilbert (1987) à la fin de la métamorphose.

A la fin la métamorphose, pour plusieurs autres gènes connus pour jouer un rôle régulateur lors de la réponse à l'ecdysone de fin de troisième stade larvaire, des mutations ont été isolées aboutissant à une létalité plus ou moins importante. Ainsi Fletcher *et al.* (1995) ont

isolé une mutation dans le gène *E74*, $E74^{P[neo]}$, caractérisée par l'insertion d'un élément P à l'intérieur de la région régulatrice nécessaire à l'expression de l'isoforme A du gène. Fletcher *et al.* décrivent cet allèle comme étant un allèle amorphique de *E74A* et rapportent que 55% des individus trans-hétérozygotes $E74^{P[neo]}$ sur la délétion *Df(3L)st-81k19*, couvrant le locus de *E74*, meurent en fin de stade pupal. De la même façon, les auteurs observent des individus $E74^{P[neo]}$ homozygotes se développant jusqu'à un stade tardif de la métamorphose sans pour autant éclore. Comme c'est le cas pour les animaux *Kr-h^l* homozygotes choqués et se développant jusqu'à la fin du stade pupal, Fletcher *et al.*, n'ont pu relever aucun phénotype particulier chez ces animaux. Cependant une proportion relativement importante des individus trans-hétérozygotes meurent au cours du stade pré-pupal, incapables de former la bulle de gaz nécessaire entre autres à l'éversion de la tête. Ces animaux stoppent leur développement aux stades P3 ou P4 décrits par Bainbridge et Bownes. De la même manière, Fletcher *et al.*, ont également étudié une mutation touchant spécifiquement l'isoforme *E74B* : $E74^{DL-1}$. $E74^{DL-1}$ est caractérisé par une délétion de 14pb qui perturbe le cadre de lecture et introduit un codon stop au milieu du premier exon de *E74B*. Seul 5% des animaux hémizygotés $E74^{DL-1}/Df(3L)st81k19$ parviennent à la fin du stade pupal car la majorité d'entre eux est incapable d'entrer dans le stade pupa et montrent notamment un défaut dans l'éversion de leur tête à la fin du stade pré-pupal, mais comme pour les homozygotes pour la mutation *Kr-h^l*, même si la bulle de gaz se forme, sa translocation n'a pas lieu. 25% de ces trans-hétérozygotes entrent dans le stade pupa mais arrêtent leur développement plus ou moins loin au cours de ce stade.

Ces résultats laissent penser que, tout comme *Kr-h*, la correcte expression de *E74* au cours du stade pupal est nécessaire à l'animal pour que celui-ci parvienne au stade adulte. Les observations concernant les effets de la mutation $E74^{P[neo]}$ sont intéressantes dans la mesure où ils montrent que dans la majorité des cas, si l'animal homozygote ou trans-hétérozygote pour cet allèle parvient à dépasser le stade pré-pupal alors son développement peut se poursuivre jusqu'à un stade tardif du stade pupal. Cette observation est également valable pour les individus *Kr-h^l* homozygotes transgéniques choqués qui, s'ils parviennent à passer la réponse de fin de stade pré-pupal, parviennent alors jusqu'à la fin du stade pupal.

Concernant *DHR3*, Lam *et al.* (1999) ont permis à des animaux trans-hétérozygotes $DHR3^{G60S}/Df(2R)12; P[w^+; hs-DHR3/+]$ mourant normalement au cours de l'embryogenèse lorsqu'ils se développent à 25°C de se développer jusqu'au troisième stade larvaire grâce à une série de chocs thermiques. Ces animaux sauvés montrent alors trois types de phénotypes létaux distincts. Le premier type de phénotype regroupe des individus mourant au cours du

stade prépupe avec un problème dans la translocation de la bulle de gaz. Le second type est constitué de jeunes pupes présentant également un problème au niveau de la translocation de la bulle de gaz ainsi qu'au niveau de l'éversion de la tête. Enfin le troisième type de phénotype est constitué de pupes tardives sans phénotype apparent. Ces trois types de phénotypes létaux constituent respectivement 25, 70 et 5% des individus amenés par chocs thermiques jusqu'au troisième stade larvaire. La même approche utilisant des séries chocs thermiques a permis à des animaux mutants pour *βFTZ-F1* portant un transgène *βFTZ-F1* sous contrôle d'un promoteur de choc thermique de se développer jusqu'à la fin du stade pupal (Yamada *et al.*, 2000). Un choc thermique appliqué au milieu du stade prépupe permet à une fraction de ces animaux de parvenir à un stade relativement avancé de la métamorphose, jusqu'au stade P12. Ceci fait dire aux auteurs de cette expérience que l'expression de *βFTZ-F1* pendant le stade pupal tardif est nécessaire pour le développement pupal tardif.

Certaines mutations du gène *BR-C* peuvent également permettre à l'animal homozygote de se développer jusqu'à un stade pupal tardif (Belyaeva, 1980), ces mutations sont associées à la fonction *broad* de *BR-C* et affectent l'expression des transcrits Z1 du gène (Emery *et al.*, 1994). Il semble cependant que ces mutants arrêtent leur développement un peu plus précocement que ne le font les animaux *Kr-h¹* transgéniques choqués.

L'ensemble de ces résultats penchent en faveur de l'existence d'une réponse à l'ecdysone en fin du stade pupal, réponse au cours de laquelle l'expression correcte d'au moins certains gènes clés des réponses hormonales de fin de stade larvaire ou prépupe est indispensable. Parmi ces gènes clés, on peut recenser *DHR3*, *βFTZ-F1*, *BR-C*, *E74* et *Kr-h*.

Il est important de souligner que notre approche par RT-PCR pour l'étude de l'expression de *Kr-h* au cours de la métamorphose et des autres principaux transcrits contrôlés par l'ecdysone présente deux limites:

D'une part, contrairement à de très nombreuses études s'attardant sur la réponse à l'hormone de fin de troisième stade larvaire, nous n'avons pas utilisé un tissu isolé comme la glande salivaire mais des animaux entiers. Il est ainsi possible que pour un transcrit donné, son profil d'expression soit décalé d'un tissu à l'autre voire même totalement différent. Il faut être alors conscient que ce que nous observons est en fait un profil d'expression général de ces transcrits. Certains tissus peuvent sans doute montrer des profils d'expression tout à fait différents.

D'autre part, il convient de noter que nous avons divisé l'ensemble de la métamorphose en périodes de 12h, ce qui peut éventuellement masquer des variations plus fines dans l'expression des transcrits. Ce problème est particulièrement visible pour les observations faites à 0 et 12h prépupe, en effet ces deux points ne reflètent en rien la complexité qui existe dans l'expression de ces transcrits telle qu'elle a été auparavant décrite entre ces deux points. Il est par conséquent tout à fait possible que l'expression des transcrits observée soit plus complexe que nos résultats ne le laissent penser, notamment au cours des dernières 24 heures précédant l'éclosion de la mouche adulte.

Cependant, l'utilisation de la technique de RT-PCR par opposition à celle du Northern blot généralement utilisée pour les études au cours du stade prépupe a cet avantage d'être beaucoup plus sensible. Ainsi nous avons pu mettre en évidence la faible induction des transcrits *Kr-h β* à la fois à la fin du stade pupal mais aussi au stade prépupe blanche ce qui n'avait pu être détecté dans notre précédente étude réalisée par Northern blot (Pécasse *et al.*, 2000).

Matériels et méthodes

Stocks de Drosophile.

La souche Oregon-R maintenue sur un milieu standard d'agar est utilisée comme souche sauvage. Les conditions normales de culture correspondent à une température de 25°C, dans une atmosphère à 60% d'humidité avec des cycles de 12h de jour et 12h de nuit. Le milieu standard d'agar est élaboré à partir de 20l d'eau chaude, 100g agar, 150g de farine de soja, 270g de levure de bière, 1200g de farine de maïs, 1200g d'extrait de malt, 600g de mélasse, 100 ml d'acide propionique.

La souche transgénique *Kr-h¹/CyO; hs-Kr-h α* a été initialement établie et décrite comme suit par Frédéric Pécasse (Figure 32; Pécasse, 1998) : Un fragment de restriction EcoRI de 1904 pb d'ADN génomique et un fragment de restriction EcoRI-HincII d'ADNc, ont été intégrés dans le vecteur pCaSperR-hs linéarisé par EcoRI et StuI, de manière à reconstituer la séquence de *Kr-h α* sans les 300 dernières paires de bases non traduites mais avec environ 800pb de séquences 5' régulatrices. Le plasmide ainsi obtenu a été introduit par micro injection selon la méthode de Rubin et Spradling (1982), avec le vecteur "helper"

p π 25,7wc (0,1 mg/ml), dans la lignée germinale d'embryons de génotype w^{1118} ; P[ry⁺]/CyO (souche *Kr-h*¹ dans laquelle le chromosome X a été substitué par le chromosome w^{1118} conférant le phénotype ([w⁺] = œil blanc). Le vecteur pCaSpeR-hs possède un mini-gène sauvage [*white*⁺] conférant la couleur orange/rouge aux yeux de tout animal ayant intégré le transgène dans son génome sous forme d'élément P. Le vecteur pCaSpeR-hs possède en 5' de l'insert un promoteur *hsp* inducible par choc thermique et en 3' des séquences *hsp* de terminaison de transcription.

Suite à l'injection de ce transgène dans des embryons et à une série de croisements, une nouvelle souche d'animaux *Kr-h*¹/CyO, homozygotes pour le transgène inséré sur le chromosome III a été obtenue (Pécasse, 1998).

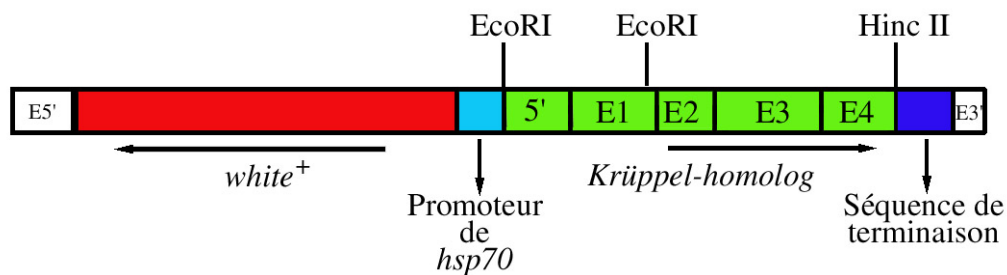


Figure 32. Schéma de la séquence issue du vecteur pCaSpeR-hs contenant la séquence codante de *Kr-h α* . Le transgène *Kr-h* (en vert) est constitué dans sa partie 5' d'un fragment de digestion EcoRI contenant les 800 paires de bases régulatrices (5') en amont de l'exon 1 et la quasi-totalité de l'exon 1 lui-même (E1). Ce fragment de digestion a été obtenu à partir d'ADN génomique. Le transgène *Kr-h* est constitué dans sa partie 3' par un fragment de digestion EcoRI-HincII contenant la fin de l'exon 1 (E1), ainsi que les exons 2 (E2), 3 (E3) et 4 (E4) à qui il manque 300 paires de bases non traduites. Ce fragment de digestion a été obtenu à partir d'ADN complémentaire. La séquence codante de KR-H α est représentée par la flèche horizontale placée sous la séquence. Le transgène *Kr-h* est placé sous le contrôle du promoteur thermosensible du gène *hsp70* (en bleu clair). En aval du transgène *Kr-h* se trouve une séquence de terminaison issue de *hsp70* (en bleu foncé). La séquence insérée contient également le mini-gène *white*⁺ (en rouge) dont la séquence codante est représentée par la flèche horizontale placée sous le gène *white*⁺. A chaque extrémité (5' et 3') de la séquence insérée se trouvent les séquences reconnues par la transposase (en blanc).

Par la suite, afin de faciliter nos observations, le chromosome "balancer" *CyO* a été remplacé par le chromosome "balancer" *CyO*, P{GAL4-Kr.C}DC3, P{UAS-GFP.S65T}DC7. Les individus porteurs de ce chromosome expriment la "Green Fluorescent Protein" (GFP) dès le stade embryonnaire, cependant le tri d'individus exprimant ou non la GFP n'est fiable qu'à partir du premier stade larvaire mais le demeure pour tout le reste du développement. En outre les individus adultes porteurs de ce chromosome présentent le phénotype *Curly* caractérisé par des ailes courbées à leur extrémité.

Chocs thermiques

Des larves errantes de troisième stade larvaire ont été récoltées et placées dans un tube lui-même plongé dans un bain marie de 30°C pendant une période de 3h30. A l'issue du choc thermique, les animaux sont transférés dans des petits tubes de culture et placés dans les conditions standard d'élevage. Le développement de chaque animal est observé quotidiennement, leur génotype est déterminé grâce à l'utilisation de la GFP visualisée grâce à une loupe Leica MZ12. La détection de GFP correspond à des individus hétérozygotes pour la mutation *Kr-h¹* et son absence à des animaux homozygotes pour cette mutation.

RT-PCR

Une population de prépuces Orégon-R a été sélectionnée au stade prépuce blanche correspondant à des prépuces de 0h. Toutes les 12h, 5 animaux sont prélevés, placés dans un tube "Eppendorf" et écrasés avec une aiguille en acier inoxydable. Ensuite les extractions des ARN et les réactions de RT-PCR ont été menées comme décrites par Huet *et al.* (1995). Les ARNs extraits ont été repris dans 60µl d'eau distillée. Les oligonucléotides et les sondes utilisés ont été précédemment publiés (Huet *et al.*, 1993, 1995, Pécasse *et al.*, 2000) à l'exception de *Kr-hβ* pour qui les amorces étaient TCAAGAAATCGGGCACGGAA et TGGTCGTCGCTGTTAGTGGA tandis que la sonde était TCTAGTCAGGCGCAGTTCTG et de *E78A* pour lequel les amorces utilisées étaient GAGTCATCCACATTGAGGGA et CATCTGTTGCGCATCTGAAC la sonde était GCTTGGGAACGCGACCATAA. En ce qui concerne *E78B* la seconde amorce était remplacée par AGAACTCCTCTTCCTTAGCC.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

I. Le mécanisme d'action de *Kr-h*.

Le ou les mécanismes d'action de KR-H restent obscurs. Le fait que *Kr-h* code pour une protéine à huit doigts de zinc laisse raisonnablement penser que KR-H est capable de se fixer sur l'ADN ou l'ARN. A ce jour, nous n'avons pas pu exclure totalement que KR-H ne se fixe pas sur l'ARN. Cependant, nos observations faites sur la fixation de KR-H au niveau des chromosomes polytènes, ne montrent jamais la présence de KR-H au niveau de "puffs" actifs, ce qui peut apparaître comme un argument en faveur du fait que KR-H ne se fixe pas à l'ARN.

Des expériences ayant pour but de déterminer une séquence nucléotidique sur laquelle pourrait se fixer KR-H n'ont pas permis de parvenir à une séquence consensus bien déterminée. En effet, à chacune de nos tentatives des séquences différentes ont été isolées et de plus ces séquences n'ont pas montré leur efficacité dans les expériences réalisées pour les valider. Nous avons utilisé deux séquences protéiques différentes de KR-H fusionnées à la protéine Glutathione S-transferase (GST). Une première séquence incluait l'ensemble des huit doigts de zinc alors que la seconde séquence ne comportait que les doigts de zinc 2 à 5, supposés jouer un rôle plus important dans la fixation à l'ADN (Boehm, communication personnelle; Figure 33).

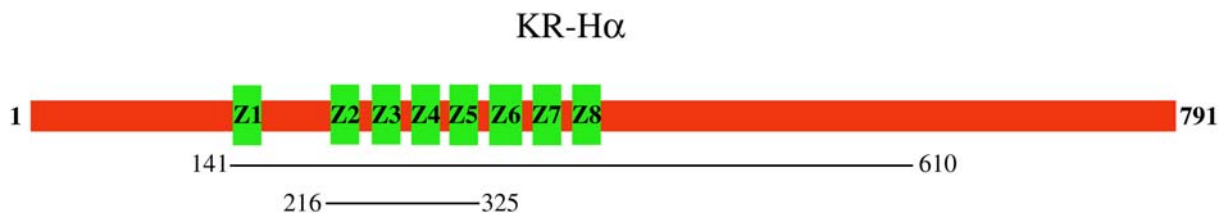


Figure 33. Schéma représentant les deux séquences issues de KR-H fusionnées successivement à la GST. Une séquence inclut l'ensemble du domaine contenant les huit doigts de zinc compris entre les acides aminés 141 et 610. La seconde séquence ne comprend que les doigts de zinc 2 à 5 placés entre les acides aminés 236 et 325. Le numéro des acides aminés est donné par rapport à la séquence de KR-H α (en rouge) comprenant 791 acides aminés. Les différents doigts de zinc sont représentés par des rectangles verts dans lesquels figure le numéro de chaque doigt de zinc (Z1 à Z8).

Au cours des expériences de sélection d'oligonucléotides composés de séquences aléatoires, le résultat le plus significatif obtenu avec l'ensemble des doigts de zinc a été la séquence AAAA tandis que l'utilisation des doigts de zinc 2 à 5 a plutôt isolé la séquence AAAT/A. Cependant la proportion des oligonucléotides contenant effectivement ces séquences à la fin des étapes de sélection restent relativement faible. Au cours de ces

expériences plusieurs paramètres ont été testés, nous avons fait varier la température à laquelle s'effectuait la fixation des protéines sur les oligonucléotides (4°C ou 20°C), la nature et la concentration des sels composant le tampon de fixation (NaCl, 100mM ou KCl, 50mM) et même la technique de sélection (par migration des complexes protéine-oligonucléotide sur gel d'acryl ou par rétention de ces complexes sur une colonne de filtration ou par fixation des complexes sur des billes d'agarose couplées à la glutathione capable de fixer la GST).

Récemment, grâce à la publication de la séquence génomique de *Drosophila pseudoobscura*, nous avons pu comparer les séquences protéiques putatives de KR-H α et β dans ces deux organismes (Figure 34). Il semble que les deux isoformes KR-H α et β soient présentes également chez *Drosophila pseudoobscura* ce qui peut laisser penser que ces deux protéines sont nécessaires et laissent envisager des fonctions au moins partiellement différentes pour KR-H α et β . Nous avons pu constater que l'ensemble du domaine contenant les huit doigts de zinc de KR-H α et β était parfaitement conservé, alors que les domaines qui l'entourent paraissent légèrement moins bien conservés. Ceci est un premier argument allant dans le sens que les huit doigts de zinc subissent une pression de sélection importante reflétant leur importance dans la fonction qu'a à remplir KR-H dans la cellule. Cependant, il ne faut pas perdre de vue les positions relativement proches qu'occupent *Drosophila melanogaster* et *Drosophila pseudoobscura* dans l'évolution, leur divergence est en effet évaluée s'être produite il y a 46 millions d'années (Powell, 1997, Gaunt *et al.*, 2002).

```

A.gam      1  -----
D.pseudo  1  MTESKNDAKTWAATKQIWKDVLHKSGTELVDISKSKPKSGPV-----DSATTNMVYYPAA
D.mel     1  MTESKNDKTSWAPKQIWKDVLHKSGTELVDISKSPAKAVAVKKSAPAKDSATTKVMVYSA

A.gam      1  -----
D.pseudo  55 NQLLIKTEQPAQTQFCLQVPPPLTATP-SAGHGAPLGGQQEHYELLQTPQQRQMLQ--
D.mel     61 NQLLIKTEQSSQAQFCLQVPPPLTATP-TTSVGLGVPSGGQQEHFELLQTPQQRQMLQLQ

A.gam      1  -----
D.pseudo 112 QQQSCEQQQFVSYSYQLALQQ-----QHESITTTTTTTPHAASAAAAAARVKTEP-
D.mel    121 DQHQQEQQQFVSY--QLALQQHQKQQQQQHESITN-----AAPTAAPSARQKTEPV

A.gam      21  GDRGASSSPEQSTYHPVQSGGGASATFVGSKFRCNQCNISFGSKSAHTSHMKSHAKQQQ
D.pseudo 163 ---PPSASYSAAATAOPRRQNG----TKP---QFKCEQCGMTFPGSKSAHTSHTKSHAKNAE
D.mel    172 GGFPAASA---AVVSQVRRPSA----SKP---QFKCDQCGMTFPGSKSAHTSHTKSKNQD

A.gam      81  ASEKLTAAAKLGETTITAS---GGSGGGTGSFAGP--QP-----DPYQDVCVKKTF
D.pseudo 213 MALHGGSGGAPGHASTSPP-TELNEAGLPVGTPKSPTKPLANVAAGADPYQCNVCQKTPA
D.mel    222 LSLNGASGAGVAAPVSTAAIELNDAGLPVGIKPSPTIKPLANVAAGADPYQCNVCQKTPA

A.gam      128 VPARLVRHYRTHTGERPFCEFCCHKMFVSVKENLQVHRRHHTKERPKCEICGRAFEHSGK
D.pseudo 272 VPARLIRHYRTHTGERPFCEFCCHKLFSVKENLQVHRRHHTKERPKCDVCGRAFEHSGK
D.mel    282 VPARLIRHYRTHTGERPFCEFCCHKLFSVKENLQVHRRHHTKERPKCDVCGRAFEHSGK

A.gam      188 LHRHMRHTGERPHKCNVCCKTFIQSGQLVIHMRHTTGEKPKYKCPVCGCGKFTCSKQLK
D.pseudo 332 LHRHMRHTGERPHKCSVCEKTFIQSGQLVIHMRHTTGEKPKYKCPVCGCGKFTCSKQLK
D.mel    342 LHRHMRHTGERPHKCSVCEKTFIQSGQLVIHMRHTTGEKPKYKCPVCGCGKFTCSKQLK

A.gam      248 VHSRTHTGEKPYHCDICFRDFGYNHVLKLRVQHYGAKCYKCTICDETFFKSKKEMEAHIK
D.pseudo 392 VHSRTHTGEKPYHCDICFRDFGYNHVLKLRVQHYGSKCYKCTICDETFFKSKKEMEAHIK
D.mel    402 VHSRTHTGEKPYHCDICFRDFGYNHVLKLRVQHYGSKCYKCTICDETFFKSKKEMEAHIK

A.gam      308 GHANELPDDEEAAAAAAAAADAGGACKLEDVSTSGTEGSIKLSSSALEGGCGSNSNSSSS
D.pseudo 452 GHANEIPDDEEAAAAGATAVGS-----TSAS-----SSS---QGLTNSSESSNN
D.mel    462 GHANEVPDDEEAAAAAAAAAAS-----TSAGS-----SAGSPSLQVSSNSSESSNH

A.gam      368 FDYSS-----
D.pseudo 494 SPPSSPPAVKKPRQPRPRAVK--AAVTGVVLSAPLSPSSPSSTYSPSASSLASPPPSA
D.mel    507 SPPSSPPATKKPRQARQPRVSKTVAAATLSIPT--SSPLSPSSLSSTYSPSASSMASPPPTS

A.gam      373 -----
D.pseudo 552 VQYLPAPVPLDLDALSRDVGSSAQPAPSSVTDDEELPTDLSMQQNQSQSQSQPPAP-----
D.mel    566 AHYLP-VQMEADALSRDVGSSAQPAPHSVTADEE-PTDLSMQQVQGG---LPEST-----

A.gam      394 HFATRKSGLSSPSFAVGANEAGQQRAYGGVAPALLAASIAA AVENGCTEVKYPPELKQ
D.pseudo 607 --MVYQPVAQATPSLV----ELQPOAQPLTINPALLEAASARQ--DEHVV-----N
D.mel    616 --VDV--YQAPPSLL----ELQPQPAGLTINPALLEAASARRHDDNDQOV-----Q

A.gam      454 QRSISPVPQALSITRN---TPPPSSGSSSSSSSSSTSSVLSMTPSGGT-----SSTLL
D.pseudo 650 DEDVHAAAQMMQLRRGHAASPPPEAVPQFQPTPSFC-PTLHVSDLAANYDDTHEATVLI
D.mel    660 DEDVHAAAQMMQLCRGHGSLPTE---QPAPSHQPCVPTLHVSDLAANYDDTHEATVLI

A.gam      505 EPAGSSAPSGPSAGQFVYEPMAIMKHHGYFAPASQITEFRSSSDIVRQVEAAIAGTENLL
D.pseudo 709 E-----HFKRGLARHGLHKGYPVPKYESALPNPDVRRVEAAIGL-----
D.mel    717 E-----HFKRGLARHGLHKGYPVPKYESALPNPDVRRVEAAIGL-----

A.gam      565 TPPRSSPEPDRSSPESDSVLMADRDNNTLPPRRKRLYF-----KbSQHTV
D.pseudo 751 ---RSSTESPERSSPESDSLMMADRNVMTLPLRKRKHMYMKGDTACQADSSNNSQAAL
D.mel    759 ---RSSTESPERSSPESDSLMMADRNVMTLPLRKRKHMYMKGDDG--QVDSKASGDDGT

```

Figure 34. Alignement des séquences protéiques déduites des séquences génomiques de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* et *Anopheles gambiae*. Les acides aminés identiques dans les trois séquences sont notés en blanc sur fond noir et les acides aminés différents mais de nature identique sont notés en noir sur fond gris. Les acides aminés inclus dans un doigt de zinc sont soulignés en jaune. Les 54 acides aminés spécifiques de KR-H β sont soulignés en vert.

Très récemment, l'exploitation des séquences protéiques issues du séquençage du génome d'*Anopheles gambiae* nous a permis d'isoler une séquence présentant un degré d'homologie important avec KR-H au niveau du domaine des doigts de zinc (Figure 34). La divergence entre *Drosophila melanogaster* et *Anopheles gambiae* est estimée s'être produite il y a 250 millions d'années (Powell, 1997, Gaunt *et al.*, 2002). Chez *Anopheles gambiae*, les huit doigts de zinc sont présents et montrent une séquence très bien conservée. On peut

constater entre autres que les espacements respectifs qui existent entre les doigts de zinc 2 à 8 sont parfaitement conservés. Par contre l'espacement plus important que l'on observe entre le premier et deuxième doigt de zinc chez la *D.melanogaster* (60 acides aminés) bien que toujours présents chez *D.pseudoobscura* (59 acides aminés) est moins important chez *A.gambiae* (47 acides aminés). Cependant cet espacement reste tout de même supérieur à celui qui existe entre les autres doigts de zinc et rien ne permet d'assurer que cette différence entre les espèces soit significative d'un point de vue structural. Un autre détail intéressant est que l'on trouve dans les trois séquences une particularité au niveau du doigt de zinc numéro 6. En effet, on note que dans ce doigt de zinc, les deux cystéines participant à la fixation de l'atome de zinc sont séparées par quatre résidus au lieu de deux dans les autres doigts. Ces observations mettent en évidence l'importance des huit doigts de zinc. Enfin dans la partie C-terminale, on note aussi une certaine conservation de la séquence mais aucune fonction n'a pu lui être associée pour le moment. Cependant, en dehors de ces motifs, on trouve très peu d'homologie, rendant particulièrement difficile la détection d'autres domaines remplissant des fonctions particulières. Nous n'avons notamment pas pu mettre en évidence l'existence de deux isoformes distinctes de KR-H chez *A.gambiae*.

Nos tentatives pour trouver d'autres homologues de *Kr-h* dans d'autres génomes sont pour le moment restées sans succès. Nous avons examiné notamment les différentes séquences disponibles de *Caenorhabditis elegans*, de la souris ou de l'Homme.

II. La régulation de *Kr-h*.

Nous n'avons malheureusement que très peu de données concernant la régulation de *Kr-h*. Nous avons pu déterminer par des expériences de culture de glandes salivaires *in vitro* que *Kr-h α* était inductible par l'ecdysone. D'autre part, nous savons que *Kr-h α* n'est pas induit à la fin du troisième stade larvaire chez des mutants *ecd¹* présentant des problèmes dans la synthèse de l'ecdysone confirmant les expériences menées *in vitro*.

Nous avons également observé que chez des individus homozygotes pour l'allèle *npr⁶* de *BR-C*, l'induction de *Kr-h α* en fin de troisième stade larvaire n'avait pas lieu non plus. Cette dernière constatation suggère que l'induction de *Kr-h α* en fin de troisième stade larvaire dépende de la correcte expression de *BR-C*. Un autre argument qui permet de penser que *BR-C* puisse intervenir dans la régulation de *Kr-h* est le fait que des expériences d'immunohistochimie menées sur des chromosomes polytènes de glande salivaire de larve de fin de

troisième stade, ont montré que BR-C pouvait se fixer au niveau du locus 26B contenant *Kr-h* (Gonzy *et al.*, 2002).

Une analyse plus systématique de l'expression de *Kr-h* dans les différents mutants des gènes connus pour leur rôle dans la cascade de régulation de la réponse hormonale pourrait certainement nous en apprendre plus quant à la place de *Kr-h* dans ce réseau et nous renseigner sur l'existence d'éventuels partenaires de *Kr-h*. Les observations faites sur les chromosomes polytènes par différentes équipes n'ont pas permis de mettre en évidence la fixation éventuelle de FTZ-F1, DHR3, E93 et E74A sur le locus renfermant *Kr-h* (Lavorgna *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Urness *et al.*, 1990). Cependant bien sûr, cela n'interdit pas que ces protéines puissent intervenir dans la régulation de l'expression de *Kr-h* à d'autres moments que ceux qui ont été étudiés. Au cours de notre propre étude, nous avons pu mettre en évidence que KR-H est capable de se fixer au niveau du locus renfermant son propre gène. Il est ainsi possible que *Kr-h* participe à sa propre régulation.

III. Le rôle de *Kr-h*.

Tout au long de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que *Kr-h* était un modulateur de la réponse hormonale au cours de la métamorphose (Pecasse *et al.*, 2000). Nous avons également pu apporter des données pouvant laisser envisager l'existence d'une première réponse hormonale au cours de l'embryogenèse. Nos premières observations laissent penser que bon nombre de régulateurs des réponses hormonales de fin stade larvaire et de fin de stade pré-pupal, également exprimés au cours de la vie embryonnaire de la drosophile, pourraient participer à cette réponse hormonale. Nous montrons aussi que *Kr-h* est nécessaire à la correcte expression de plusieurs de ces régulateurs au cours de ce stade.

Il apparaît que les conséquences de la mauvaise expression de *Kr-h* au cours de l'embryogenèse sont du même type que celles qui sont observées au cours de la métamorphose, c'est à dire des modifications dans le niveau d'expression ou lors de l'induction ou la répression de certains régulateurs. Tant au début de la métamorphose que lors de l'embryogenèse, nous ne pouvons que constater la relative modestie des changements observés dans l'expression de ces gènes régulateurs de la réponse hormonale causés par la mauvaise expression de *Kr-h*. Pourtant, les conséquences des différentes mutations sont bien

là, si ces problèmes d'expression pour un gène donné sont discrets, elles aboutissent d'un point de vue global à une complète dérégulation. Il est possible que cette dérégulation se traduise par un déséquilibre important à la fois dans la stœchiométrie et dans la nature des différents facteurs se trouvant dans une cellule à un moment donné. Ce déséquilibre ayant pour conséquence l'incapacité pour l'animal de répondre de manière correcte au stimulus ecdysone et conduisant ainsi à la mort de l'animal.

D'autre part, nous apportons dans cette étude, les premiers éléments montrant la nécessité de *Kr-h* en fin de stade pupal. Contrairement à ce qui avait été observé auparavant, au cours de l'embryogenèse et des réponses hormonales de fin de troisième stade larvaire et de fin de stade prépupal, au cours de ce stade *Kr-h* se distingue des autres régulateurs clés de la réponse hormonale par son profil d'expression. En effet, la majorité des autres gènes observés ont une expression plus étalée dans le temps alors que celle de *Kr-h* apparaît très ponctuelle. On note que *Kr-h* ne répond pas au pic d'ecdysone de fin de stade prépupal, ni à celui plus important de milieu de stade pupal mais seulement à la légère augmentation du titre d'hormone en fin de stade. Il serait certainement intéressant d'analyser plus en détail cette période de la métamorphose s'étalant entre 84 et 108 heures après l'entrée dans le stade prépupe. Peut-être pourrions-nous alors préciser les caractéristiques de cette dernière réponse hormonale de la métamorphose.

Dans un très récent article, Sullivan et Thummel (2003) montrent que de nombreux récepteurs nucléaires connus des études du début de la métamorphose sont également exprimés lors des principaux pics d'ecdysone existants entre l'embryogenèse et la fin du stade prépupal. Ils avancent l'idée que les interactions observées entre certains d'entre eux au cours du stade prépupal, comme *DHR3*, *E75B* et *β FTZ-F1*, pourraient également être mises en jeu à d'autres stades du développement. Ces résultats confortent nos propres observations et alimentent l'hypothèse de l'existence de nouvelles réponses hormonales à l'ecdysone au cours du développement de la drosophile faisant intervenir des gènes déjà décrits pour le rôle au cours des réponses hormonales du début de la métamorphose. Parallèlement à ses données, il serait intéressant de suivre l'expression de *Kr-h* au cours des second et troisième stades larvaires afin de voir si ce dernier à également un rôle.

IV. Conclusion générale.

Au cours de l'ensemble de cette étude, parallèlement aux techniques classiques de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR, immuno-histochimie, ...), j'ai eu l'opportunité d'utiliser des méthodes d'étude découlant de la biologie à grande échelle. On entend par approches dérivées de la biologie à grande échelle, des approches qui exploitent les informations d'un génome entier, voire de plusieurs génomes. Au cours des cinq dernières années, ce type d'approche a été de plus en plus utilisé pour mettre en évidence de nouveaux gènes potentiels ou encore trouver de nouveaux homologues de gènes déjà connus. De la même façon, se sont développées également les puces à ADN permettant de visualiser les différences d'expression de milliers de transcrits en même temps entre deux échantillons. Toutes ces techniques permettent d'avoir une vue plus globale du fonctionnement des cellules et du développement des organismes et de l'évolution en général. Ces approches ont permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche, jusque là non exploitées, de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Une part importante de l'essor de ces nouvelles techniques est la conséquence du développement de la bio-informatique. Le développement par les informaticiens de nouveaux outils capables d'analyser, de comparer et de stocker des quantités d'informations très importantes a permis d'accélérer la recherche et d'ouvrir des voies de recherches encore inenvisageables il y a dix ans.

Cependant, les méthodes d'étude plus traditionnelles de la biologie moléculaire sont toujours indispensables dans la mesure où connaître la séquence d'un gène ne signifie pas connaître le rôle de ce gène, ni les partenaires du produit de l'expression de ce gène ou les conséquences du dysfonctionnement de ce gène. Pour le moment, seules ces techniques permettent d'analyser finement le fonctionnement d'un gène et de ses différentes isoformes qui peuvent avoir des profils d'expression et même des modes d'action différents. De la même manière, la bio-informatique ne peut répondre à toutes les questions. La bio-informatique par définition se base sur des modèles mathématiques et statistiques alors que l'évolution, et plus généralement la vie, obéissent à des schémas moins rigides, et peut-être moins parfaits, dans leurs mécanismes. L'expérience du chercheur, ses interprétations, sa logique et son bon sens sont toujours indispensables pour effectuer les tris qui s'imposent dans les données pré-triées

que lui fournissent les ordinateurs. Cependant le chercheur doit garder à l'esprit que, s'il est capable d'éliminer les mauvaises informations proposées par l'ordinateur, il peut être plus difficile pour lui de trouver les bonnes informations rejetées à tort par la machine et qui ne lui sont pas proposées.

Enfin, s'il est clair que l'alliance de l'informatique et de la biologie moléculaire a permis d'importants progrès, il est certain que d'autres alliances pourraient apporter également beaucoup à l'avancée de nos connaissances. On ne peut que souhaiter que se développent des projets d'études communs entre biologistes moléculaires et biologistes structuralistes, bio-physiciens ou bio-chimistes par exemple. Et pourquoi pas, peut-être que demain ou dans quelques décennies, une découverte importante dans un domaine éloigné de la biologie trouvera des applications qui permettront d'ouvrir de nouvelles portes dans notre exploration des mécanismes de la vie.

REFERENCES

REFERENCES

- Adams M.D. *et al.*, (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195
- Aizenzon M.G., Zhimulev I.F., (1975). Hormonal control of lysis of the salivary gland in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Inst. Cytol. Genetics* 221, 91-93
- Altenburg E., Muller H.J., (1920). The genetic basis of truncated wing. A inconstant and modifiable character in *Drosophila*. *Genetics* 5, 1-59
- Andres A.J., Thummel C.S., (1995). The *Drosophila* 63F early puff contains *E63-1*, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel Ca²⁺-binding protein. *Development* 116, 865-876
- Antoniewski C., Mugat B., Delbac F., Lepesant J.A., (1996). Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Cell. Biol.* 16, 2977-2986
- Arber W., (1974). DNA modification and restriction. *Prog. Nucleic Acid Res.* 14, 1-14
- Ashburner M., (1967). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 21, 298-428
- Ashburner M., (1969). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. II. The X-chromosome puffing patterns of *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Chromosoma* 27, 47-63

Ashburner M., (1972). Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. In Developmental studies on giant chromosomes : Results and problems in cell differentiation (Ed. W. Beermann) 4, 101-151. Springer-Verlag, Berlin

Ashburner M., (1989). *Drosophila*: a laboratory handbook (Ed. M. Ashburner), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G., (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 355-662

Ashburner M., Thompson J.N. Jr., (1978). The laboratory culture of *Drosophila*. In The genetics and biology of *Drosophila* (Eds. M. Ashburner and T.R.F. Wright), 2a, 1-109. Academic Press, London and New-York

Avery, O.T., McLeod, C.M., McCarthy M., (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. J. Exp. Med. 79, 137-158

Baehrecke E.H., Thummel C.S., (1995). The *Drosophila E93* gene from 93F early puff displays stage and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. Dev. Biol. 171, 85-97

Bainbridge S.P., Bownes M., (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morph. 66, 57-80

Balbani E.G., (1881). Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. Zool. Anz. 4, 637-641, 662-666

Ball C.A., Cherry J.M., (2001). Genome comparisons highlight similarity and diversity within the eukaryotic kingdoms. Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 86-89

Baltimore D., (1970). Viral RNA-dependent DNA polymerase. Nature 226, 1209-1211

Bayer C.A., Holley B., Fristrom J.W., (1996). A switch in *Broad-Complex* zinc finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Biol.* 177, 1-14

Becker H.J., (1959). Die puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmasters im Normalstamm und bei zwei mutanten, *giant* und *lethal-giant-larvae*. *Chromosoma* 10, 654-678

Beermann W., (1952). Chromomeren Konstanz und spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organ Differenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5, 139-198

Beermann W., (1972). Chromomeres and genes. In *Developmental studies on giant chromosomes: Results and problems in cell differentiation* (Ed. W. Beermann) 4, 1-33. Springer-Verlag, Berlin

Bender M., Imam F.B., Talbot W.S., Ganetzky B., Hogness D.S., (1997). *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* 91, 777-788

Berg C.A., Spradling A.C., (1991). Studies on the rate and site-specificity of P element transposition. *Genetics* 127, 515 -524

Bier E., (1997). Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction. *Cell* 89, 681-684

Billas I.M.L., Moulinier L., Rochel N., Moras D., (2001). Crystal structure of the ligand-binding domain of the Ultraspiracle protein USP, the ortholog of Retinoid X receptors in insects. *J. Cell. Biol.* 276, 7465-7474

Blattner F.R., Plunkett G. III, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y., (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1474

Brenner S., Jacob F., Meselson M., (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190, 576-581

Bridges C.B., (1935). Salivary chromosome maps: with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* 26, 60-64

Bridges C.B., (1938). A revised map of the salivary gland X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* 29, 11-13

Burtis K.C., Thummel C.S., Jones C.W., Karim F.D., Hogness D.S., (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two *ets*-related proteins. *Cell* 61, 85-99

Butenandt A., Karlson P., (1954). Über die Isolierung eines metamorphose-hormons des insekten in Kristallisierter Form. *Z. Naturforsch B.* 9, 389-391

Campos-Ortega J.A., Hartenstein V., (1985). The embryonic development of the *Drosophila melanogaster*. Berlin, Springer Verlag.

Cherbas L., Lee K., Cherbas P., (1991). Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila Eip28/29* gene. *Genes Dev.* 5, 120-131

Church R.B., Robertson F.W., (1966). A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 162, 337-351

Clayton G.M., Peak-Chew S.Y., Evans R.M., Schwabe J.W.R., (2001). The structure of the *ultraspiracle* ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1549-1554

Clever U., Karlson P., (1960). Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Expl. Cell. Res.* 20, 623-626

Crews S.T., Thomas J.B., Goodman C.S., (1988). The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell* 52, 143-151

DiBello P.R., Withers D.A., Bayer C.A., Fristrom J.W., Guild G.M., (1991). The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* 129, 385-397

Enmark E., Gustafsson J.A., (2001). Comparing nuclear receptors in worms, flies and humans. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 611-615

Farkas R., Mechler B.M., (2000). The timing of *Drosophila* salivary gland apoptosis displays an *l(2)gl*-dose response. *Cell Death Differ.* 7, 89-101

Feigl G., Gram M., Pongs O., (1989). A member of the steroid hormone receptor gene family is expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 75B in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 18, 7167-7178

Feulgen R., Rossenbeck H., (1924). Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nukleinsäure vom typus thymusnukleinsäure und die darauf beruhende elektive fräbung von zellkernen in mikro-skopischen präparaten. *Z. Physiol. Chem.* 135, 203-248

Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M. *et al.*, (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae Rd.* *Science* 25, 496-512

Fletcher J.C., Burtis K.C., Hogness D.S., Thummel C. (1995). The *Drosophila E74* gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development*, 121, 1455-1465

Fletcher J.C., Thummel C.S., (1995a). The ecdysone-inducible *Broad-complex* and *E74* early genes interact to regulate target gene transcription and *Drosophila* metamorphosis. *Genetics* 141, 1025-1035

Fletcher J.C., Thummel C.S., (1995b). The *Drosophila E74* gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development* 121, 1411-1421

Fraenkel G., Bhaskaran G., (1973). Pupariation and pupation in cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 66, 418-422

Fristrom D., Fristrom J.W., (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. In *The development of Drosophila melanogaster* (Eds. Bate M. and Martinez Arias), 2, 843-897. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Garcia-Bellido A., Santamaria P., (1978). Developmental analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 88, 469-486

Garcia-Bellido A., (1979). Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 91, 491-520

Gaunt M.W., Miles M.A., (2002). An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol.* 19, 748-761.

Golic K.G., (1994). Local transposition of P elements in *Drosophila melanogaster* and recombination between duplicated elements using a site-specific recombinase. *Genetics* 137, 551-63

Golic K.G., Lindquist S., (1989). The FLP recombinase of yeast catalyses site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509

Gonzy G., Pokholkova G.V., Peronnet F., Mugat B., Demakova O.V., Kotlikova I.V., Lepesant J.A., Zhimulev I.F., (2002). Isolation and characterisation of novel mutations of the *Broad-complex*, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 32, 121-132

Goodman C.S., Doe C.Q., (1993). Embryonic development of the *Drosophila* CNS. The development of *Drosophila melanogaster*. 2, 1131-1206. Cold Spring Harbor. N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Griffith. F., (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27, 113-159

Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C.G., Risebrough R.W., Watson J.D., (1961). Unstable ribonucleic acid revealed by pulsed labeling of *E. coli*. *Nature* 190, 581-584

Guay P.S., Guild G.M., (1991). The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands: a *Broad-Complex* early gene regulates intermolt and late gene transcription. *Genetics* 129, 169-175

Hartenstein V., (1993). Atlas of *Drosophila* development. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Henrich V.C., Sliter T.J., Lubahn D.B., MacIntyre A., Gilbert L.I., (1990). A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucl. Acids Res.* 18, 4143-4148

Henrich V.C., Szekely A.A., Kim S.J., Brown N.E., Antoniewski C., Hayden M.A., Lepesant J.A., Gilbert L.I., (1994). Expression and function of *ultraspiracle (usp)* gene during development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 165, 38-52

Hock T., Cottril T., Keegan J., Garza D., (2000). The *E23* early gene of *Drosophila* encodes an ecdysone-inducible ATP-binding cassette transporter capable of repressing ecdysone-mediated gene activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 9519-9524

Huber R., Hoppe W., (1965). Zur Chemie des Ecdyans, VII. Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der Automatisierten Faltmolekülmethode. Chem. Ber. 98:2403-2424

Huet F., Ruiz C., Richards G., (1993). Puffs and PCR: the *in vivo* dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. Development 118, 613-627

Huet F., Ruiz C., Richards G., (1995). Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. Development 121, 1195-1204

Ikeshima-Kataoka H., Skeath J.B., Nabeshima Y., Doe C.Q., Matsuzaki F., (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. Nature 390, 625-629

International Human Genome Sequencing Consortium, (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860-921

Janknecht R. Taube W., Lüdecke H.J., Pongs O., (1989). Characterization of a putative transcription factor gene expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 74EF in *Drosophila melanogaster*. Nucl. Acids. Res. 17, 4455-4464

Jiang C., Baehrecke E.H., Thummel C.S., (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. Development 124, 4673-4683

Jiang C., Lamblin A.F., Steller H., Thummel C.S., (2000). Steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. Mol. Cell 5, 445-455

Johnson C.W., (1913). The distribution of some species of *Drosophila*. Psyche 20, 202-204

Karim F.D, Guild G.M., Thummel C.S., (1993). The *Drosophila Broad-Complex* plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* 118, 977-988

Karim F.D., Thummel C.S., (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of *E74A* and *E74B* transcription in *Drosophila*. *Genes Dev.* 5 1067-1079

Karim F.D., Thummel C.S., (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* 11, 4083-4093

Kelley M.R., Kidd S., Berg R.L., Young M.W., (1987). Restriction of P element insertions at the *Notch* locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 7, 1545-1548

Kelly T.J.Jr., Smith H.O., (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* 51, 393-409

Koelle M.R., Segraves W.A., Hogness D.S., (1992). DHR3, a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 6167-6171

Koelle M.R., Talbot W.S., Segraves W.A., Bender M.T., Cherbas P., Hogness D.S., (1991). The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77

Korge G., (1975). Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4550-4554

Kornberg A., (1960). Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131, 1503-1508

Kraminsky, G. P., Clark, W. C., Estelle, M. A., Gietz, R. D., Sage, B. A., O'Connor, J. D., Hodgetts, R. B., 1980. Induction of translatable mRNA for dopa decarboxylase in *Drosophila*: An early response to ecdysterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4175 - 4179

- Lachaise D., Cariou M.L., David J.R., Lemeunier F., Tsacas L, Ashburner M., (1988). Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evol. Biol.* 22, 159-225
- Lam G., Hall B.L., Bender M., Thummel C.S. (1999). *DHR3* is required for the prepupal-pupal transition and differentiation of adult structures during metamorphosis. *Dev. Biol.*, 212, 204-216
- Lam G.T., Jiang C., Thummel C.S., (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769
- Lavorgna G., Karim F.D., Thummel C.S., Wu C., (1993). Potential role for the *FTZ-F1* steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 3004-3008
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J., Wu C., (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu*. *Science* 252, 848-851
- Lee C.-Y., Baehrecke E.H., (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 128, 1443-1455
- Lee C.-Y., Simon C.R., Woodard C.T., Baehrecke E.H., (2002). Genetic mechanism for the stage- and tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 252, 138-148
- Lee C.Y., Wendel D.P., Reid P., Lam G., Thummel C.S., Baehrecke E.H., (2000). *E93* directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 6, 433-443
- Lefevre G., (1976). A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands. In *The genetics and biology of Drosophila* (Eds Ashburner M., Novitski E.), a, 31-66. Academic Press, London, New-York and San Francisco

Leist M., Jäätelä M., (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 1-10

Maxam A.M., Gilbert W., (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564

Meigen J.W., (1830). Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten (Ed. Schulz).

Mendel G., (1865). Versuche über Pflanzen-hybriden. *Verh. d. Naturf. Vereins in Brünn*, IV

Mettling C., Giangrande A., Richards G., (1987). The *Drosophila sgs3* gene: an *in vivo* test of intron function. *J. Mol. Biol.* 196, 223-236

Meyerowitz E.M., Hogness D.S., (1982). Molecular organization of a *Drosophila* puff site that responds to ecdysone. *Cell* 28, 165-176

Miesher J.F., (1871). *Med.-chem. Unters.* pp 441

Morgan T.H., (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32, 120-122

Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B., (1915). The mechanism of mendelian heredity. Henry Hold and Company, New-York

Muller H.J., (1918). Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids in a case of balanced lethal factors. *Genetics* 3, 422-499

Muskavitch M.A.T., Hogness D.S., (1980). Molecular analysis of a gene in a developmentally regulated puff of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 7362-7366

Nicholson D.W., (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042

Nirenberg M.W., (1963). The genetic Code II. Sci. American 216, 80-94

O'Hare K., Driver A., McGrath S., Johnson-Schlitz D.M., (1992). Distribution and structure of cloned P elements from the *Drosophila melanogaster* P strain pi 2. Genet. Res. Camb. 60, 33-41

Ohno C.K., Petkovich M., (1992). FTZ-F1 β , a novel member of the *Drosophila* nuclear receptor family. Mech. Dev. 40, 13-24

Oro A.E., McKeown M., Evans R.M., (1990). Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and vertebrate retinoid X receptor. Nature 347, 298-301

Pak M. M. and Gilbert L. I., (1987). A developmental analysis of ecdysteroids during the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. J. Liquid Chromat. 10, 2591-2611

Palaga T., Osborn B., (2002). The 3D's of apoptosis: death, degradation and Diaps. Nature Cell Biol. 4, E149-E151

Pavan C., Breuer M.E., (1952). Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. J. Hered. 43, 152-157

Pécasse F., Beck Y., Ruiz C., Richards G., (2000). *Krüppel-homolog*, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. Dev. Biol., 211, 53-67

Pécasse F., (1998). Contribution à l'étude de la métamorphose chez *Drosophila melanogaster*: *Krüppel-homolog* est un modulateur stade-spécifique de la réponse pré-pupale à l'ecdysone. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Powell J.R., (1997). Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. 161, 1137-1154, Oxford, Oxford University Press..

- Restifo L.L., Guild G.M., (1986). An ecdysterone-responsive puff site in *Drosophila* contains a cluster of seven differentially regulated genes. *J. Mol. Biol.* 188, 517-528
- Richards G., (1997). The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila*. *Adv. in Dev. Biol.* 5, 81-135
- Riddihough G., Pelham R.B. (1987). An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promoter. *EMBO J.* 6, 3729-3734
- Roberts D.B., (1986). *Drosophila*, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington D.C.
- Robertson C.W., (1936). The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J. Morph.* 59, 351-399
- Rubin G.M. *et al.*, (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215
- Rubin G.M., Spradling A.C., (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353
- Rubin G.M., Spradling A.C., (1983). Vectors for P element mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.*, 11, 6341-6351
- Ryoo H.D., Bergmann A., Gonen H., Ciechanover A., Steller A., (2002). Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by *reaper* and *ubcD1*. *Nat. Cell Biol.* 4, 432-438
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Savill J., (1998). Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392, 442-443

Scalenghe F., Turco E., Edström J.E., Pirrotta V., Melli M., (1981). Microdissection and cloning of DNA from specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 82, 205-216

Schmid K.J, Tautz D., (1997). A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9746-9750

Schuh R., Aicher W., Gaul U., Côté S., Preiss A., Maier D., Seifert E., Nauber U., Schröder C., Kemler R., Jäckle H., (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* 47, 1025-1032

Schweichel J.-U., Merker H.-J., (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266

Segraves W.A., (1988). Molecular and genetic analysis of the *E75* ecdysone-responsive gene of *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, Stanford University, CA

Shea M.J., King D.L., Conboy M.J., Mariani B.D., Kafatos F.C., (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: A new C₂H₂ zinc finger protein and a C₂C₂ steroid receptor-like component. *Genes Dev.* 4, 1128-1140

Shen C.P., Jan L.Y., Jan Y.N., (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 90, 449-458

Skeath J.B., (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* 21, 922-931

Smith H.O., Wilcox K.W., (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51, 379-391

Stone B.L., Thummel C.S., (1993). The *Drosophila* 78C early late puff contains *E78*, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* 75, 307-20

Stowers R.S., Garza D., Rasclé A., Hogness D.S., (2000). The *L63* gene is necessary for the ecdysone-induced 63E late puff and encodes a CDK protein required for *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 221, 23-40

Stowers R.S., Russel S., Garza D., (1999). The 82F late puff contains the *L82* gene, an essential member of a novel gene family. *Dev. Biol.* 213, 116-130

Sullivan, A. A. and Thummel C. S., 2003. Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol. Endocrinol.*

Talbot W.S., Swyryd E.A., Hogness D.S., (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73, 1323-1337

Temin H.M. and Mizutani S., (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous carcinoma virus. *Nature* 226, 1211-1213

The *C. elegans* Sequencing Consortium, (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018

Thomas J.B., Crews S.T., Goodman C.S., (1988). Molecular genetics of the *single-minded* gene locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52, 133-141

Thompson C.B., (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462

Thummel C.S., (1996). Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. Trends Genet. 12, 306-310

Ueda H., Sonoda S., Brown J.L., Scott M.P., Wu C., (1990). A sequence-specific DNA-binding protein that activates *fushi-tarazu* segmentation gene expression. Genes Dev. 4, 624-635

Urness L.D, Thummel C.S., (1990). Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of *Drosophila* ecdysone-inductible E74A protein. Cell 63, 47-61.

Vaskova M., Bentley A.M., Marshall S., Reid P., Thummel C.S., Andres A.J., (2000). Genetic analysis of the *Drosophila* 63F early puff. Characterization of mutations in *E63-1* and *maggie*, a putative Tomm22. Genetics 156, 229-244

Venter J.C. *et al.*, (2001). The sequence of the human genome. Science 291, 1304-1351

Warren J.T., Petryk A., Marques G., Jarcho M., Parvy J.P., Dauphin-Villemant C., O'Connor M.B., Gilbert L.I., (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99, 11043-11048

Watson J.D., Crick F.H.C., (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737-738

Weber J.L., Myers E.W., (1997). Human whole-genome shotgun sequencing. Genome Res. 7, 401-409

Woodard C.T., Baehrecke E.H., Thummel C.S., (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. Cell 79, 607-615

Wright L.G., Chen T., Thummel C.S., Guid G.M., (1996). Molecular characterization of the 71E late puff in *Drosophila melanogaster* reveals a family of novel genes. J. Mol. Bio. 255, 387-400

Yamada M.-A., Murata T., Hirose S., Lavorgna G., Susuki E., Ueda H. (2000). Temporally restricted expression of transcription factor β FTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Development, 127, 5083-5092

Yao T.P., Segraves W.A., Oro A.E., McKeown M., Evans R.M., (1992). *Drosophila* Ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell 71, 63-72

Yokoyama H., Mukae N., Sakahira H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S., (2000). A novel activation mechanism of caspase-activated Dnase from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 275, 12978-12986

Yoo S.J., Huh J.R., Muro I., Yu H., Wang L., Wang S.L., Feldman R.M.R., Clem R.J., Müller H.A.J., Hay B.A., (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. Nat. Cell Biol. 4, 416-424

Zdarek J., Fraenkel G., (1972). The mechanism of puparium formation in flies. J. Exp. Zool. 179, 315-324

Zhimulev I.F., Lychev V.A., (1972). RNA synthesis in the left arm of the third chromosome of *Drosophila melanogaster* in the last five hours of larval development. Ontogenez 3, 289-297