

INSTITUT DE GENETIQUE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

CNRS-INSERM-ULP

BP 10142

67404 ILLKIRCH CEDEX

THESE

Présentée par

Bérénice SCHAERLINGER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur de STRASBOURG

Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Sujet de thèse :

**Rôle de la sérotonine dans le développement embryonnaire précoce de
Drosophila melanogaster :
Etude d'un mutant ponctuel du récepteur 5-HT2Dro**

Soutenue le 21 septembre 2004

Devant la commission d'examen composée de :

Dr. BIRMAN S. (Marseille)	Rapporteur
Pr. POTIER S. (Strasbourg)	Rapporteur
Dr. SANSON B. (Cambridge)	Rapporteur
Dr. MAROTEAUX L. (Strasbourg)	Directeur de thèse

***Se donner du mal pour les petites choses,
c'est parvenir aux grandes,
avec le temps.***

Samuel Beckett

Extrait de Molloy

Remerciements :

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Bénédicte Sanson, Serge Birman et Serge Potier d'avoir jugé mon travail de thèse et de m'avoir mis autant à l'aise au cours de ma soutenance. Un grand merci à Bénédicte Sanson pour ses conseils avisés concernant l'interprétation de certains résultats que j'ai obtenu et sa proposition de collaboration pour l'étude des mutants ponctuels. Merci à Serge Birman pour ses recommandations concernant le manuscrit et à Serge Potier d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse et pour son soutien au cours de cette journée.

Je tiens ensuite à remercier le professeur Pierre Chambon et le Professeur Jean-Louis Mandel pour m'avoir accueilli à l'IGBMC et m'avoir permis de travailler dans un environnement scientifique de premier ordre.

Je remercie aussi Luc Maroteaux de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir laissé autant de libertés dans mon travail.

Merci aux membres de l'équipe de Luc et plus particulièrement à Canan pour nos discussions interminables sur la science ou d'autres sujets aussi passionnants. Tu m'as montrée qu'avec une bonne organisation on pouvait allier travail efficace et vie privée.

Merci à Nelly pour son soutien quotidien au cours de ces 5 années, je n'oublierai pas nos moments de doutes, de joies et surtout ta bonne humeur (si si c'est bien vrai.) Merci aussi pour ton aide et tes petits conseils.

Merci à Pierre pour ses conseils concernant certaines techniques de biologie moléculaire.

Un très grand merci à Malou qui m'a énormément aidée avec les mouches et les bichonnant pendant que j'étais débordée. Tu as toujours eut une oreille attentive pour m'écouter dans mes moments de doute et je te remercie aussi pour cela.

Merci à Jean-Marie Launay pour avoir fait les expériences de pharmacologie.

Merci à Jean-Luc Vonesch qui a développé le logiciel qui m'a permis d'étudier les vitesses de migrations des cellules dans les embryons. Merci aussi à Didier et Marcel pour leur aide en microscopie.

Je remercie aussi tout particulièrement Pascal Heitzler qui m'a appris tout ce que je sais en génétique et m'a transmis la passion des mouches....

Merci à Régine Losson, Margarita et Luc pour leurs conseils techniques pour mon étude double hybride.

Merci aussi à Jean Marie Garnier pour ses conseils pour les clonages récalcitrants.

Je tiens aussi à remercier Claude et Yannick pour leur bonne humeur quotidienne et leur soutien au cours de ma thèse. Un merci particulier à Yannick qui a lu et relu ce long manuscrit sans jamais ce plaindre.

Merci à Perrine qui est venue m'aider pendant un été et même si cette mutagenèse n'a rien donné, c'était un vrai plaisir de travailler avec toi.

Merci à tous mes amis du labo (Fred, Sam, Marie, Régis, Momo....) et en dehors du labo (Delphine, les 2 Sylvie, Christophe, Fred, Anne...) d'avoir toujours été présents pour me changer les idées et me montrer qu'il n'y a pas que le labo dans la vie.

Un merci tout particulier à Dominique pour ton soutien sans faille. Tu m'as apporté un équilibre qui m'a permis d'être plus objective sur mon travail.

Enfin je remercie mes parents sans qui cette thèse n'aurait jamais pu avoir lieu.
Merci pour leur soutien constant pendant ces 5 années (et même bien avant...).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES 9

INTRODUCTION 13

CHAPITRE 1 14

- 1/ LA SÉROTONINE, UNE AMINE BIOGÈNE : 15
 - 1.1/ Biosynthèse de la sérotonine : 15
 - 1.2/ Dégradation de la sérotonine : 17
- 2/ FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA SÉROTONINE: 17
 - 2.1/ Fonctions centrales de la sérotonine : 19
 - 2.2/ Fonctions périphériques de la sérotonine : 19
 - 2.3/ Fonctions embryonnaires de la sérotonine : 20
- 3/ PATHOLOGIES ASSOCIÉES À LA SÉROTONINE : 21
 - 3.1/ Syndrome carcinoïde : 21
 - 3.2/ Migraine :22
 - 3.3/ Hypertension pulmonaire : 22

CHAPITRE 2 23

- 1/ STRUCTURE ET ACTIVATION DES RCPG : 24
 - 1.1/ Structure générale des RCPG : 24
 - 1.2/ Activation des RCPG : 24
 - 1.3/ Voies de signalisation activées par les protéines G : 25
 - 1.4/ Domaines d'interactions protéiques intracellulaires : 27
 - 1.5/ Dimérisation des RCPG :29
 - 1.6/ Désensibilisation et internalisation des RCPG : 31
- 2/ CLASSIFICATION DES RÉCEPTEURS DE LA SÉROTONINE : 33
- 3/ LE RÉCEPTEUR 5-HT2B DE MAMMIFÈRES :37
 - 3.1/ Voies de signalisation : 37
 - 3.2/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans la différenciation cellulaire : 38
 - 3.3/ Expression du récepteur 5-HT2B chez la souris : 38
 - 3.4/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans le développement du coeur : 41
 - 3.5/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans le développement des neurones entériques : 42
 - 3.6/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans l'hypertension pulmonaire : 42
 - 3.7/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans la migraine : 43

CHAPITRE 3 44

- 1 / LA DROSOPHILE : ORGANISME MODÈLE 45
 - 1.1/ Taxinomie de la drosophile : 45
 - 1.2/ Le cycle de vie de la drosophile : 47
 - 1.3/ Le génome de la drosophile : 48
 - 1.4/ Le chromosome balancier : 48
- 2/ LA SEGMENTATION : 48
 - 2.1/ Les gènes maternels : 49

2.2/ Les gènes « gap » :	51
2.3/ Les gènes « pair-rule » :	51
2.4/ Les gènes de polarité segmentaire :	53
2.5/ Les gènes homéotiques :	54
3/ LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA DROSOPHILE :	55
3.1/ De l'ovocyte à la fertilisation :	55
3.2/ Cellularisation :	57
3.2/ La gastrulation :	58

CHAPITRE 4 65

1/ COMPOSITION ET SÉCRÉTION DE LA CUTICULE LARVAIRE :	66
1.1/ L'épiderme :	66
1.2/ Composition de la cuticule :	68
1.3/ Sécrétion de la cuticule larvaire :	69
1.4/ Formation des limites segmentaires :	69
2/ LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA FORMATION DE LA CUTICULE :	71
2.1/ Les voies Wingless :	71
2.2/ Voie Hedgehog :	77
2.3/ Voie des « Epidermal Growth Factor » (EGF) :	80
3/ DÉTERMINATION DES STRUCTURES CUTICULAIRES DANS UN SEGMENT :	83
3.1/ Mise en place des voies de signalisation :	84
3.2/ Wingless, Hedgehog et Spitz sécrétés, forment des gradients :	86
3.3/ Détermination de la cuticule nue et des denticules :	86

CHAPITRE 5 88

1/ STRUCTURE DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO :	89
2/ EXPRESSION DU 5-HT2DRO :	89
3/ ETUDE D'UNE SOUCHE DÉFICIENTE DANS LA RÉGION CHROMOSOMIQUE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO :	92
3.1/ Localisation de la déficience :	92
3.2/ Défaut de gastrulation observé dans les embryons homozygotes pour Df(3R)HTRI :	94
3.3/ Phénotype cuticulaire de la souche Df(3R)HTRI :	96
4/ ETUDE D'UNE SOUCHE TRANSGÉNIQUE KRÜPPEL-GAL 4 / UAS-5-HT2DRO :	98

MATERIEL ET METHODES 100

RESULTATS 144

CHAPITRE 1 145

1/ MISE EN ÉVIDENCE D'UNE MUTATION PONCTUELLE DANS LE GÈNE DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO :	147
1.1/ Caractérisation génétique de mutants potentiels dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :	147

1.2/ Mise en évidence d'une mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :	149
1.3/ La mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro change ses propriétés pharmacologiques :	151
2/ PHÉNOTYPE CUTICULAIRE DE LA SOUCHE M51 :	152
2.1/ Phénotype cuticulaire de la souche M51 :	152
2.2/ Etude de l'extension de la bandelette germinative des embryons M51 :	154
2.3/ L'expression des gènes wingless et engrailed est normale :	157
3/ ETUDE DU PHÉNOTYPE DE LA SOUCHE L(3R)4830B :	157
3.2/ Les embryons homozygotes l(3R)4830b présentent une expression ectopique de Wingless :	161
3.3/ Les embryons de la souche l(3R)4830b présentent un défaut de gastrulation :	164
4/ RECHERCHE D'UNE INTERACTION POTENTIELLE ENTRE HAIRY ET LE RÉCEPTEUR 5-HT2DRO :	166
4.1/ La mutation hairy 1 (h1) peut présenter un phénotype « A4 sans denticule » :	166
4.2/ Le phénotype « A4 sans denticule » n'est pas la conséquence d'une interaction entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro :	167
5/ LE BRAS GAUCHE DU CHROMOSOME 3 DE LA SOUCHE L(3R)4830B CONTIENT UNE MUTATION LÉTALE :	169
5.1/ Mise en évidence d'une mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b :	169
5.2/ Localisation de la mutation létale dans la région 67A2-67D13 du chromosome 3 :	171
5.3/ Phénotype cuticulaire de souches contenant la mutation dans la région 67A2-67D13 (h1-m) :	173

CHAPITRE 2 176

RECHERCHE DES EFFECTEURS SECONDAIRES DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO PAR LA TECHNIQUE DU DOUBLE-HYBRIDE 176

1/ PRINCIPE DE L'EXPÉRIENCE DE DOUBLE HYBRIDE :	177
2/ RÉSULTATS DU CRIBLE DE LA BANQUE EMBRYONNAIRE DE DROSOPHILE AVEC LE DOMAINE C-TERMINAL DU RÉCEPTEUR HT2DRO :	179

DISCUSSION 183

CHAPITRE 1 184

1/ LE DOMAINE N-TERMINAL DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO EST NÉCESSAIRE À LA RÉGULATION DE L'INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR : 185

1.1/ Comparaison des affinités du récepteur 5-HT2Dro sauvage, muté ou sans domaine N-terminal: 185

1.2/ Etude des domaines N-terminaux des RCPG de drosophile : 186

1.3/ Modèle d'interaction entre la sérotonine et le récepteur 5-HT2Dro : 190

2/ RÔLE DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO AU COURS DE L'EXTENSION DE LA BANDELETTE GERMINATIVE : 191

2.1/ Comparaison de la gastrulation des embryons l(3R)4830b et M51 : 191

2.2/ Comparaison de la gastrulation des embryons Df(3R)HTRI et M51 : 192

2.3/ Comparaison des souches mutantes avec la souche Kr-5-HT2Dro :	196
2.4/ Rôles possibles du récepteur 5-HT2Dro au cours de la gastrulation :	197
3/ RÔLE DU RÉCEPTEUR 5-HT2DRO DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE WINGLESS :	199
3.1/ Comparaison des cuticules des souches M51, l(3R)4830b et Df(3R)HTRI :	199
3.2/ Etude de l'interaction potentielle entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro :	201
4/ RECHERCHE DE LA MUTATION MISE EN ÉVIDENCE SUR LE BRAS GAUCHE DU CHROMOSOME 3 DE LA SOUCHE L(3R)4830B :	210

CHAPITRE 2 213

1/ STRUCTURE DE LA PROTÉINE KINASE A (PKA) :	214
2/ ACTIVATION DE LA PKA PAR LES RCPG :	214
3/ RÔLE DE LA PKA DANS LA VOIE HEDGEHOG :	216
4/ RÔLE DE LA PKA-R1 DANS LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DE LA DROSOPHILE :	216
5/ IMPLICATIONS D'UNE INTERACTION PKA-R1/5-HT2DRO :	217

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Voie de biosynthèse et dégradation de la sérotonine	15
Figure 2 : Fonctions biologiques de la sérotonine chez les mammifères	17
Figure 3 : Pathologies associées à la sérotonine chez les mammifères	17
Figure 4 : Structure générale des RCPG	24
Figure 5 : Activation des protéines G	25
Figure 6 : Voies des protéines $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha q}$	27
Figure 7 : Domaines d'interactions protéine-protéine	29
Figure 8 : Désensibilisation et internalisation des RCPG par l'intermédiaire des vésicules de Clathrine	31
Figure 9 : Classification des récepteurs de la sérotonine	33
Tableau 1 : Présentation des récepteurs sérotoninergiques de mammifères	34
Figure 10 : Voies de signalisation du récepteur 5-HT _{2B}	38
Figure 11 : Rôle du récepteur 5-HT _{2B} dans l'apoptose	39
Figure 12 : Phénotypes cardiaques observés après invalidation ou surexpression du récepteur 5-HT _{2B}	41
Tableau 2 : Taxinomie de <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Figure 13 : Cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
Figure 14 : Cascade des gènes de segmentation	49
Figure 15 : Correspondance de la segmentation de l'embryon et de la drosophile adulte	49
Figure 16 : Développement précoce de <i>Drosophila melanogaster</i>	55
Figure 17 : Carte des domaines présomptifs	58
Figure 18 : Principe de l'intercalation cellulaire	60
Figure 19 : Polarisation cellulaire de Slam, Bazooka et la Myosine II au cours de l'intercalation cellulaire	62
Figure 20 : Vue d'ensemble de la cuticule larvaire	66
Figure 21 : Composition des différentes couches de la cuticule	67
Figure 22 : Formation des sillons segmentaux	69

Figure 23 : Voie Wingless des β -caténines et voie Wingless calcique	73
Figure 24 : Rôle de Wingless dans la polarité planaire	75
Figure 25 : Voie Hedgehog	78
Figure 26 : Voies EGF	81
Figure 27 : Formation du motif à l'intérieur d'un segment	84
Figure 28 : Structure du récepteur 5-HT2Dro	89
Figure 29 : Expression du récepteur 5-HT2Dro dans un embryon sauvage et différents mutants pour les gènes de segmentation	90
Figure 30 : Région chromosomique du récepteur 5-HT2Dro	92
Figure 31 : Chronologie de la gastrulation d'embryons sauvages et déficients	94
Figure 32 : Etude d'enregistrements vidéo pendant la gastrulation d'embryons sauvages et déficients	95
Figure 33 : Phénotypes cuticulaires des embryons homozygotes Df(3R)HTRI	96
Figure 34 : Chronologie de la gastrulation d'embryons sauvages et Kr-5-HT2Dro	98
Figure 35 : Etude d'enregistrements vidéo pendant la gastrulation d'embryons sauvages et Kr-5-HT2Dro	98
Tableau 3 : Conditions de PCR pour un tube	113
Figure 36 : Principe de déroulages des time lapse	123
Tableau 4 : Composition des mélanges de transfection pour chaque boîte	125
Figure 37 : Vecteur pBTM116 et construction de l'appât	129
Tableau 5 : Concentrations des acides aminés à ajouter dans le milieu SD	130
Figure 38 : Vecteur pASV4 et construction de la banque	133
Tableau 6 : Composition des tubes de PCR pour amplifier l'ADN de mouches, les phages ou la banque purifiée	135
Figure 39 : Carte de la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro	147
Figure 40 : Séquence primaire du récepteur 5-HT2Dro	149
Tableau 7 : Expérience de pharmacologie	150
Figure 41 : Phénotype cuticulaire de la souche M51	152
Tableau 8 : Répartition des classes phénotypiques cuticulaires de la souche M51	153
Figure 42 : Etude de l'extension de la bandelette germinative des embryons M51	154

Tableau 9 : Mesure des vitesses de cellules ectodermiques au cours de la gastrulation	155
Figure 43 : Expression des protéines Wingless et Engrailed dans des embryons de stade 9	157
Tableau 10 : Répartition des classes phénotypiques cuticulaires de la souche M51, l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c	158
Figure 44 : Phénotypes cuticulaires de la souche l(3R)4830b contenant la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro	159
Figure 45 : La souche l(3R)4830b présente une expression ectopique de Wingless	161
Figure 46 : Expression de Wingless à différents stades chez les embryons homozygotes l(3R)4830b	162
Tableau 11 : Mesure des vitesses de cellules ectodermiques au cours de la gastrulation	150
Figure 47 : Etude de l'extension de la bandelette germinative de la souche l(3R)4830b	164
Figure 48 : Génotype des souches utilisées lors de la recombinaison permettant la construction de la souche h1-M51	167
Figure 49 : Répartition des phénotypes cuticulaires de la souche M51, l(3R)4830b, h1 et h1-M51	167
Tableau 12 : Répartition des différentes classes phénotypiques cuticulaires de la souche M51, l(3R)4830b, h1 et h1-M51	168
Figure 50 : Génotype des souches recombinées dans la partie gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b	169
Figure 51 : Carte de la région mutée sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b	171
Figure 52 : Génotype et phénotype des souches ru ^h ⁻ -M51	173
Tableau 13 : Répartition des phénotypes cuticulaires de la souche M51, l(3R)4830b, h1-m et h1-m-M51	174
Figure 53 : Principe du double hybride	177
Figure 54 : Schématisation des parites utilisées comme appât lors de l'expérience de double hybride	179

Tableau 14 : Nature des protéines traduites par les ADN mis en évidence par analyse double hybride	180
Figure 55 : Activité spécifique	181
Tableau 15 : Comparaison de l'affinité de certains composés chimiques pour les récepteur 5-HT2Drosauvage, M51 et 5-HT2Dro N	184
Figure 56 : Activation des récepteurs à long domaine N-terminal	186
Tableau 16 : Récepteurs des amines biogènes de drosophiles aux domaines N-terminaux longs	187
Figure 57 : Modèle théorique du rôle du domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro	188
Figure 58 : Mise en évidence de l'invagination du mésoderme sur les enregistrements vidéos	192
Figure 59 : Synthèse de la sérotonine dans les embryons de drosophile	194
Figure 60 : Correspondance entre la segmentation de l'embryon, l'expression de Wingless, de Hairy et du récepteur 5-HT2Dro	193
Figure 61 : L'expression ectopique de Wingless dans la souche l(3R)4830b induit la formation de cuticule nue dans le segment A4	204
Figure 62 : Régulation de Wingless au cours du temps dans l'embryon de drosophile	206
Figure 63 : Cartographie de la région 67A2-67D11-13	210
Figure 64 : Activation de la PKA par les récepteurs couplés aux protéines G	215

INTRODUCTION

Chapitre 1

Synthèse et rôles de la sérotonine

En 1935, Erspamer montre l'existence d'une substance extraite de l'intestin capable de contracter les muscles lisses. Cette substance fut appelée entéramine. Le nom de sérotonine, dérivé de séro (serum) et tonin (tonus), a été donné par M.M. Rapport et ses collègues en 1947 après avoir suggéré l'existence d'une telle molécule dans le sérum. Par la suite, ils ont identifié cette molécule comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT). En 1953, Twarog et Page démontrent que cette amine biogène joue aussi le rôle de neurotransmetteur dans le cerveau des mammifères.

1/ La sérotonine, une amine biogène :

1.1/ Biosynthèse de la sérotonine :

La sérotonine est une amine biogène dérivée du tryptophane. La synthèse de la sérotonine a été étudiée pour la première fois par Hamlin et Fisher en 1951 et ils ont montré que le tryptophane subit successivement une hydroxylation et une décarboxylation pour donner la 5-hydroxytryptamine. Cette voie de synthèse a par la suite été mise en évidence chez la drosophile par Livingstone et Tempel en 1983 (figure 1).

La tryptophane hydroxylase effectue la première étape de la synthèse de la sérotonine qui est la phase limitante. En effet, cette enzyme nécessite l'intervention de plusieurs co-facteurs comme la tetrahydrobioptérine (BH4), le fer ou l'oxygène. Chez la drosophile, il existe 2 hydroxylases d'acides aminés, la tyrosine hydroxylase (DTH) responsable de la synthèse du précurseur de la dopamine à partir de la tyrosine (Birman et al. 1994) et la tryptophane hydroxylase (DTPH) qui hydroxyle non seulement le tryptophane, mais aussi la phénylalanine, précurseur de la tyrosine (Neckameyer and White 1992). Il existe 2 isoformes de la tyrosine hydroxylase résultant d'un épissage alternatif, l'une est exprimée dans le système nerveux de la drosophile et l'autre, dans l'épiderme, joue un rôle dans la synthèse de la cuticule au moment des mues à tous les stades de la vie de l'insecte. La production des catécholamines est en effet, nécessaire au durcissement de la cuticule (Friggi-Grelin et al. 2003).

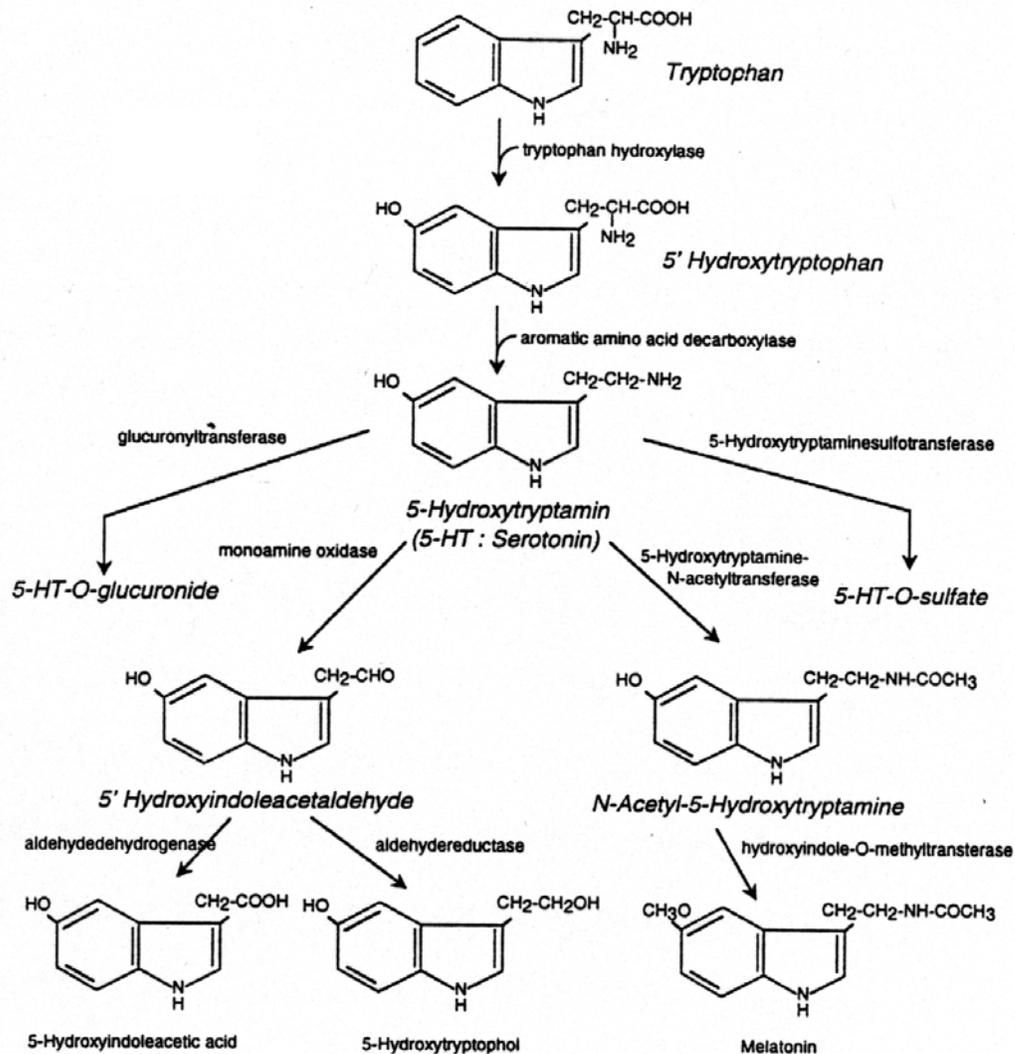


Figure 1 : Voie de biosynthèse et de dégradation de la sérotonine.

Le tryptophane subit successivement une hydroxylation et une décarboxylation pour donner la 5-hydroxytryptamine. La sérotonine peut être dégradée de plusieurs manières.

Dans un deuxième temps, le 5-hydroxytryptophane, produit de l'hydroxylation du tryptophane, est décarboxylé par la Dopa décarboxylase (Ddc). Cette enzyme est commune à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine (Livingstone and Tempel 1983). Comme la tyrosine hydroxylase, elle est exprimée dans le système nerveux et l'épiderme de la drosophile au moment de la mue (Konrad and Marsh 1987).

1.2/ Dégradation de la sérotonine :

Plusieurs voies de dégradation de la sérotonine peuvent être mises en place. Ainsi, les monoamines oxydases (MOA) provoquent une désamination oxydative de la sérotonine. Le produit de cette réaction enzymatique est ensuite oxydé pour donner l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) qui sera éliminé dans les urines (figure 1).

Une autre voie catabolique produit la mélatonine, elle existe notamment dans l'épiphyse, au niveau des os. La sérotonine est d'abord acétylée par la N-acétyltransférase, enzyme dont l'activité dépend étroitement de la photopériode. La N-acétylsérotonine ainsi produite est ensuite méthylée et forme la N-acétyl 5-méthoxytryptamine, encore appelée mélatonine (Dewhurst et al. 1972) (figure 1).

Enfin, la dernière voie de catabolisme de la sérotonine est la sulfoconjugaïson, impliquée dans la formation et le durcissement de la cuticule.

2/ Fonctions biologiques de la sérotonine:

La sérotonine est synthétisée dans le système nerveux central où elle joue un rôle de neurotransmetteur mais également au niveau périphérique. Elle active un grand nombre de récepteurs qui transmettent le signal à différentes voies de transductions impliquées dans des fonctions différentes (voir chapitre 2). Ainsi, la sérotonine a des rôles variés résumés dans la figure 2.

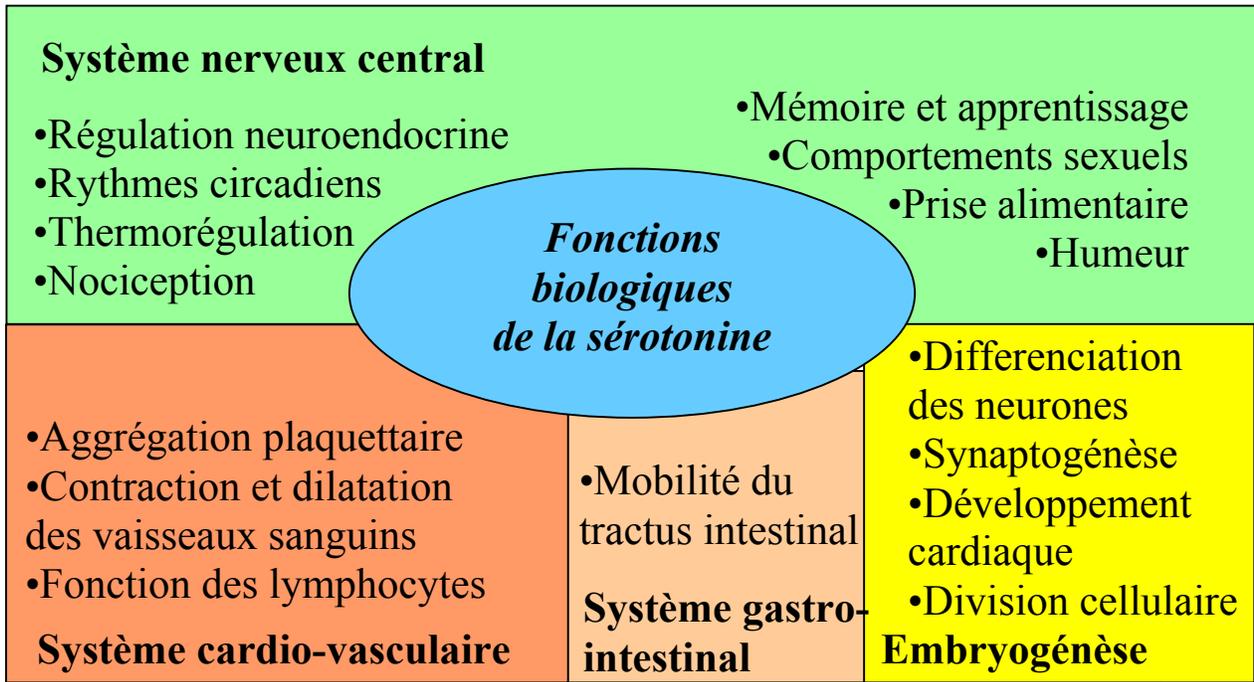


Figure 2 : Fonctions biologiques de la sérotonine chez les mammifères.

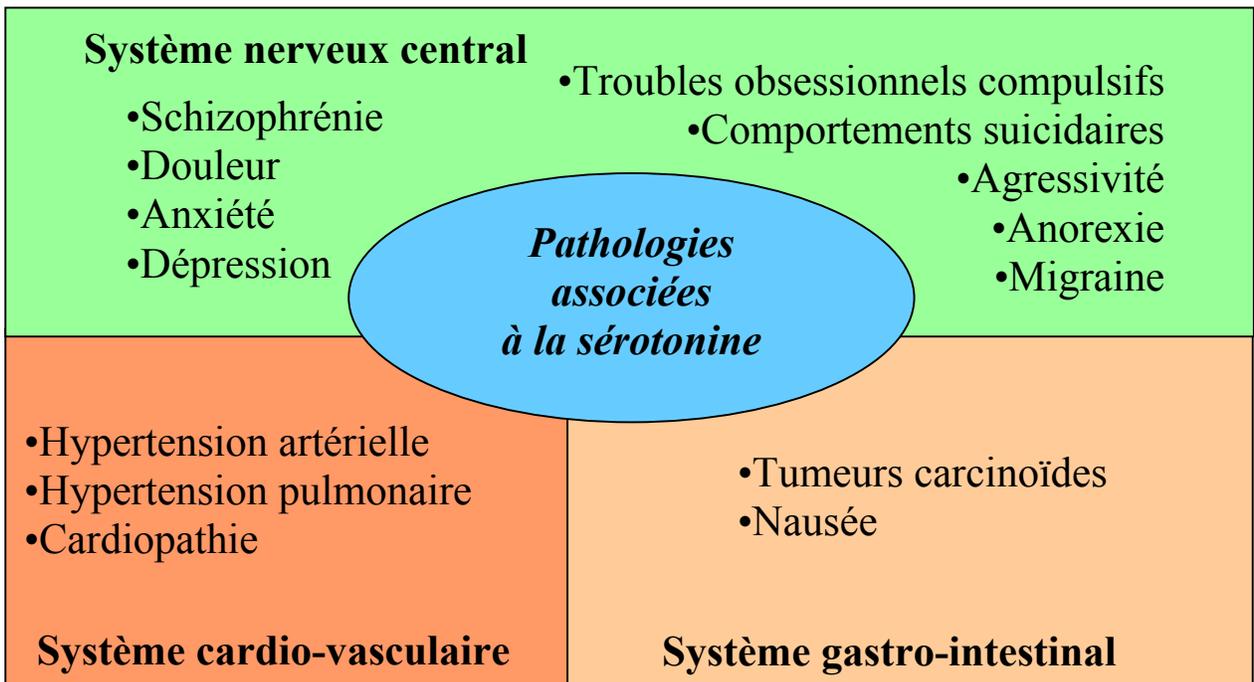


Figure 3 : Pathologies associées à la sérotonine chez les mammifères.

2.1/ Fonctions centrales de la sérotonine :

Les effets de la sérotonine dans le système nerveux central sont nombreux et complexes. Elle participe non seulement à la mise en place des rythmes circadiens en modulant la sensibilité de l'individu à la lumière (Morin 1999), mais aussi à la thermorégulation de l'individu en adaptant la libération de certaines hormones endocrines en réponse à une exposition au froid (Arancibia et al. 1996) ou encore à la nociception. En effet, l'administration de tryptophane, le précurseur de la sérotonine, diminue la perception de la douleur chez l'homme (Haze 1991).

La sérotonine régule aussi certains comportements comme le contrôle de l'appétit car la réduction de la concentration de la sérotonine dans le cerveau conduit à une augmentation de la prise alimentaire (Steiger 2004). Elle peut aussi réguler l'humeur car il a été montré que des variabilités génétiques dans l'expression des gènes de synthèse de la sérotonine peuvent être associées à certains comportements agressifs (Lesch and Merschdorf 2000).

2.2/ Fonctions périphériques de la sérotonine :

Les vaisseaux sanguins, constitués d'un endothélium entouré de muscles lisses expriment des récepteurs à la sérotonine dans ces 2 tissus. La sérotonine peut donc activer différents récepteurs qui, dans les vaisseaux, sont répartis différemment en fonction des tissus et des organes irrigués. Alors que la sérotonine a un rôle dans la relaxation dans les vaisseaux sanguins de la circulation systémique, elle est par contre importante dans la contraction des vaisseaux pulmonaires (Watts and Cohen 1999). Cette différence de réponse dépend de la nature des récepteurs activés. De plus, dans le sang, les plaquettes sanguines constituent une réserve de sérotonine, synthétisée par les cellules entérochromaffines, la sérotonine est notamment utilisée au moment de l'agrégation plaquettaire (Shore et al. 1956).

La sérotonine est aussi importante dans la régulation du système immunitaire. Elle est rapidement libérée par les plaquettes sanguines lors d'une réponse immunitaire et

induit notamment la sécrétion de molécules chemoattractantes pour les lymphocytes ou influence la coordination de l'action des monocytes et des macrophages (Mossner and Lesch 1998).

Enfin, la sérotonine, synthétisée dans le système gastro-intestinal par les cellules entérochromaffines, permet la contraction des muscles lisses qui entourent le tube digestif et permettent les mouvements péristaltiques du tractus intestinal (Talley 2001).

2.3/ Fonctions embryonnaires de la sérotonine :

Pendant le développement du cerveau des mammifères ou des insectes, la sérotonine régule la croissance axonale ou la différenciation de certains neurones (Gaspar et al. 2003).

Elle est très importante pour le développement morphologique de la région céphalique, du tube neural et la migration des cellules de la crête neurale (Shuey et al. 1993) ou lors du développement précoce du coeur où elle agit sur la prolifération cellulaire (Yavarone et al. 1993). Le rôle de la sérotonine dans le développement cardiaque sera détaillé dans le chapitre 2.

Enfin il a été rapporté par Buznikov et ses collègues que la sérotonine est très importante au moment de l'embryogenèse précoce chez l'oursin. En effet, elle a non seulement la capacité de contrôler le clivage des cellules lors de la première étape du développement, mais aussi la transition blastulaire qui correspond aux premières transcriptions zygotiques dans l'embryon d'oursin. Si la synthèse de la sérotonine est inhibée, la transcription zygotique ne se fait pas correctement (Buznikov et al. 2001). La sérotonine agit aussi sur la migration des cellules au cours de la gastrulation de l'oursin, du poulet ou de la drosophile (chapitre 5).

Enfin, les femmes enceintes qui souffrent de la phénylcétonurie et ne suivent pas de régime adapté, risquent de graves malformations de leur foetus. Il a été rapporté que ces malformations sont la conséquence d'un manque de sérotonine chez le foetus. En effet, le fort taux de phénylalanine dû à une mutation dans la Phénylalanine hydroxylase

chez les patientes, inhibe la TH et la TPH. Ceci entraîne une baisse de la synthèse de la sérotonine dans le sang qui passe dans le placenta et irrigue le fœtus (Roux et al. 1995).

Il est donc à noter que la sérotonine, bien connue pour son rôle complexe de neurotransmetteur au niveau central ou sa fonction dans le système cardio-vasculaire, est aussi impliquée chez l'embryon au cours du développement précoce, parfois même avant toute différenciation cellulaire. Ce travail de thèse porte sur l'influence de la sérotonine au cours du développement précoce de la drosophile.

3/ Pathologies associées à la sérotonine :

Du fait de la grande diversité des voies cellulaires mises en oeuvre lors de l'activation des récepteurs sérotoninergiques et leurs larges domaines d'expression, de nombreuses pathologies accompagnent des défauts de signalisation, de synthèse ou de dégradation de la sérotonine (figure 3) dont certaines sont décrites ci-dessous. Elles mettent notamment en jeu le récepteur 5-HT_{2B} (chapitre 2).

3.1/ Syndrome carcinoïde :

Les tumeurs carcinoïdes touchent environ 1 personne sur 12500. Elles ont pour origine les cellules neuroendocrines et sont principalement localisées dans les poumons ou le système gastro-intestinal. Elles sont caractérisées par de petites cellules aux noyaux ronds et réguliers et présentent, au microscope électronique, de nombreuses granules sécrétrices à la membrane.

Ces granules libèrent dans la circulation sanguine plusieurs hormones et amines biogènes, dont la sérotonine. Cette forte libération est responsable du syndrome carcinoïde dont les manifestations sont des rougeurs, un cornage (bruit anormal accompagnant la respiration), des diarrhées et même des maladies cardiaques. La sérotonine est par la suite dégradée par la monoamine oxydase en 5-HIAA éliminé dans les urines. Il a été montré que les patients présentant des maladies cardiaques associées

aux tumeurs carcinoïdes ont une forte concentration de 5-HIAA dans les urines (Kulke and Mayer 1999).

3.2/ Migraine :

Une des causes de la migraine est la vasodilatation des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau et l'hyperactivation concomitante des neurones sensoriels afférents trigéminiaux qui transmettent la douleur dans le crâne. Il a été montré que la concentration sanguine de sérotonine et de ses métabolites augmente au début des attaques migraineuses. Certains anti-migraineux reconnus ciblent des récepteurs sérotoninergiques impliqués soit dans la vasoconstriction des vaisseaux, soit dans l'inhibition des innervations trigéminales (Hamel 1999; Schaerlinger et al. 2003).

3.3/ Hypertension pulmonaire :

L'hypertension pulmonaire peut avoir plusieurs causes comme une augmentation progressive de la pression artérielle due à un dysfonctionnement de l'oreillette gauche du coeur dans laquelle passe le sang revenant des poumons, une occlusion veinale ou une augmentation consécutive du flux sanguin dans les artéioles pulmonaires. Il en résulte une mauvaise oxygénation des vaisseaux pulmonaires.

Les cellules soumises à un milieu hypoxique synthétisent de la sérotonine, dont la concentration sanguine augmente fortement. La sérotonine joue alors un rôle dans la prolifération des muscles lisses des vaisseaux sanguins. Cette prolifération cellulaire participe au remodelage du vaisseau qui s'épaissit et se rigidifie. Cette hypertrophie aggrave l'hypertension pulmonaire et peut être la cause de complications de la maladie pouvant entraîner la mort du patient (Egermayer et al. 1999).

Chapitre 2

Les récepteurs de la sérotonine

*La majorité des récepteurs de la sérotonine appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cette famille de récepteurs est non seulement exprimée chez les animaux supérieurs mais aussi chez les plantes, les levures, les animaux diploblastiques et même les protozoaires. On compte près de 1000 RCPG chez *C. Elegans* et entre 1000 et 2000 chez les vertébrés. Les RCPG sont impliqués dans la reconnaissance et la transduction du signal de molécules aussi diverses que des photons, du calcium, des dérivés d'acides aminés (comme la sérotonine), des nucléotides, des peptides et même des protéines.*

Après avoir présenté la structure et les voies de signalisation des RCPG, nous découvrirons la diversité des récepteurs de la sérotonine, puis plus précisément le récepteur 5-HT_{2B}, orthologue du récepteur 5-HT_{2Dro} chez la souris.

1/ Structure et activation des RCPG :

1.1/ Structure générale des RCPG :

Les RCPG ont une structure générale caractéristique avec 7 domaines transmembranaires formés par des hélices α , un domaine N-terminal extracellulaire, 3 boucles extra cytoplasmiques, un domaine C-terminal intracellulaire et 3 boucles intra cytoplasmiques (figure 4). Certaines études ont montré que le noyau formé par les hélices transmembranaires est maintenu par des liaisons hydrogènes. Ce noyau ne forme pas de poche hydrophile comme il a été longtemps communément admis (Ji et al. 1998).

1.2/ Activation des RCPG :

D'une manière générale, après leur activation par le ligand, les RCPG subissent un changement de conformation qui passe par les hélices transmembranaires et se répercute sur le domaine C-terminal et les boucles intracellulaires, relais de la transduction du signal. Cependant, malgré des structures tridimensionnelles proches, les RCPG n'ont pas tous le même site de liaison au ligand ou la même succession de

changements conformationnels au moment de leur activation. En effet, certains ligands peuvent se lier soit au domaine N-terminal, soit aux boucles extracellulaires, soit au noyau formé par les hélices transmembranaires (Gether and Kobilka 1998).

Ainsi, il est à noter que les amines biogènes comme la sérotonine qui se lient aux RCPG entrent dans le noyau formé par les hélices transmembranaires et interagissent directement avec les hélices par des liaisons hydrogènes. Elles modifient alors la structure tridimensionnelle du récepteur. Les domaines transmembranaires vont alors bouger les uns par rapport aux autres et transmettre le signal aux domaines intracellulaires du récepteur (Ji et al. 1998; Bockaert and Pin 1999).

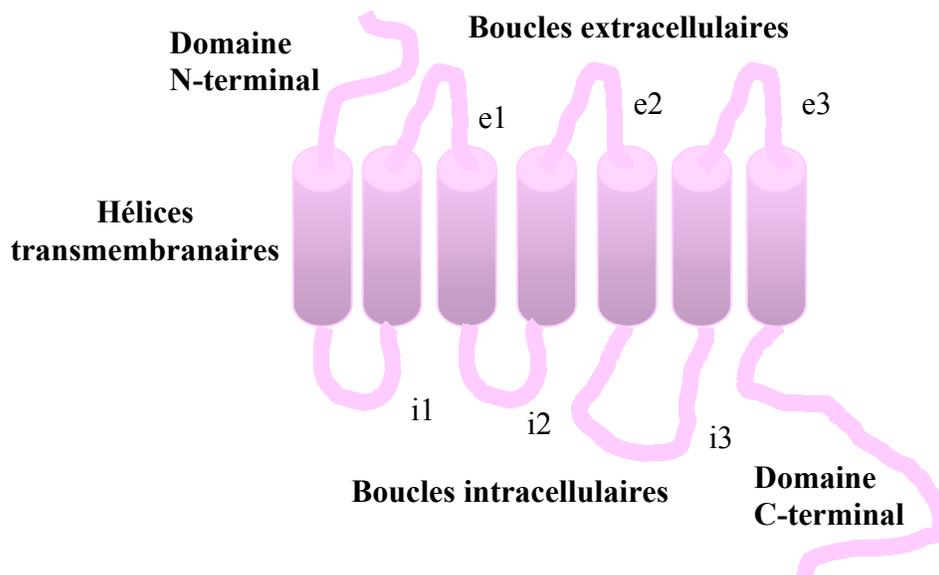


Figure 4 : Structure générale des RCPG :

1.3/ Voies de signalisation activées par les protéines G :

Les RCPG activent des complexes hétérotrimériques composés de protéines $G\alpha$ liées à une molécule de GDP, $G\beta$ et $G\gamma$. Lorsque le récepteur est inactif, le complexe des protéines G est lié à la troisième boucle intracellulaire (i3 sur la figure 4), le changement

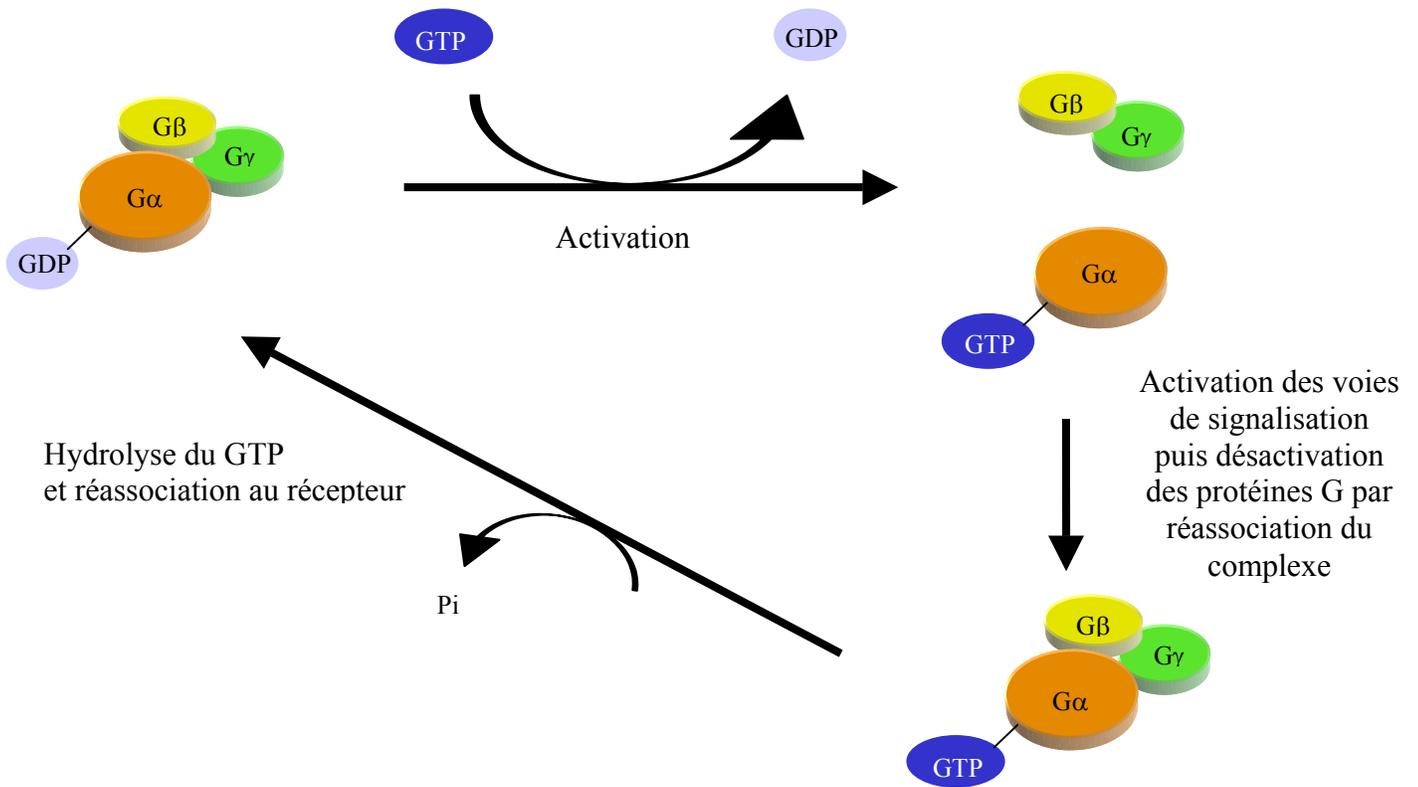


Figure 5 : Activation des protéines G.

Après activation du récepteur, la molécule de GDP associée à la protéine $G\alpha$ est remplacée par une molécule de GTP. Le complexe des protéines G se dissocie, la protéine $G\alpha$ et le complexe $G\beta\gamma$ activent des voies de signalisation indépendantes. La réassociation du complexe $G\alpha\beta\gamma$ désactive les protéines G. Il s'ensuit une hydrolyse de GTP en GDP et la réassociation du complexe à un nouveau RCPG.

de conformation du récepteur consécutif à son activation entraîne l'échange du GDP en GTP et la dissociation du complexe en sous unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Chacune des sous unités ainsi activées transmettent alors le signal aux autres protéines des voies de transduction. L'état actif de la protéine $G\alpha$ -GTP est ensuite progressivement annulé par sa réassociation avec le complexe $G\beta\gamma$ et l'hydrolyse subséquente du GTP en GDP, directement catalysé par l'activité GTPase de la protéine $G\alpha$. Le complexe hétérotrimérique interagit à nouveau avec le récepteur (figure 5).

A ce jour, 16 protéines $G\alpha$, 4 β et 5 γ ont été caractérisées. Chaque complexe $\beta\gamma$ et chaque protéine $G\alpha$ activent une voie de signalisation spécifique. Ainsi, la protéine $G_{\alpha s}$ stimule l'adénylate cyclase et donc la production d'AMP cyclique (AMPc) qui active la dissociation des sous unités régulatrices et catalytiques de la protéine kinase A (PKA). Les sous unités catalytiques de la PKA phosphorylent alors leurs protéines cibles comme le facteur de transcription CREB qui induit l'initiation de l'expression des gènes cibles. En revanche, les protéines $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha o}$ inhibent l'adénylate cyclase et donc la voie de l'AMPc (figure 6).

Enfin, les protéines $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 11}$ activent la phospholipase C ce qui permet la formation d'inositol-triphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG). La production d'IP3 induit la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. Le calcium active par la suite la Calmoduline et d'autres kinases. De même, la production de DAG active la protéine kinase C (PKC) (figure 6).

1.4/ Domaines d'interactions protéiques intracellulaires :

Les chercheurs ont longtemps pensé que les voies de signalisation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires étaient uniquement transmises par l'intermédiaire des complexes hétérotrimériques de protéines G.

Cependant, depuis quelques années, la prolifération des techniques de détection des interactions protéine-protéine comme le double hybride a permis de mettre en évidence de nouvelles voies de transduction des RCPG.

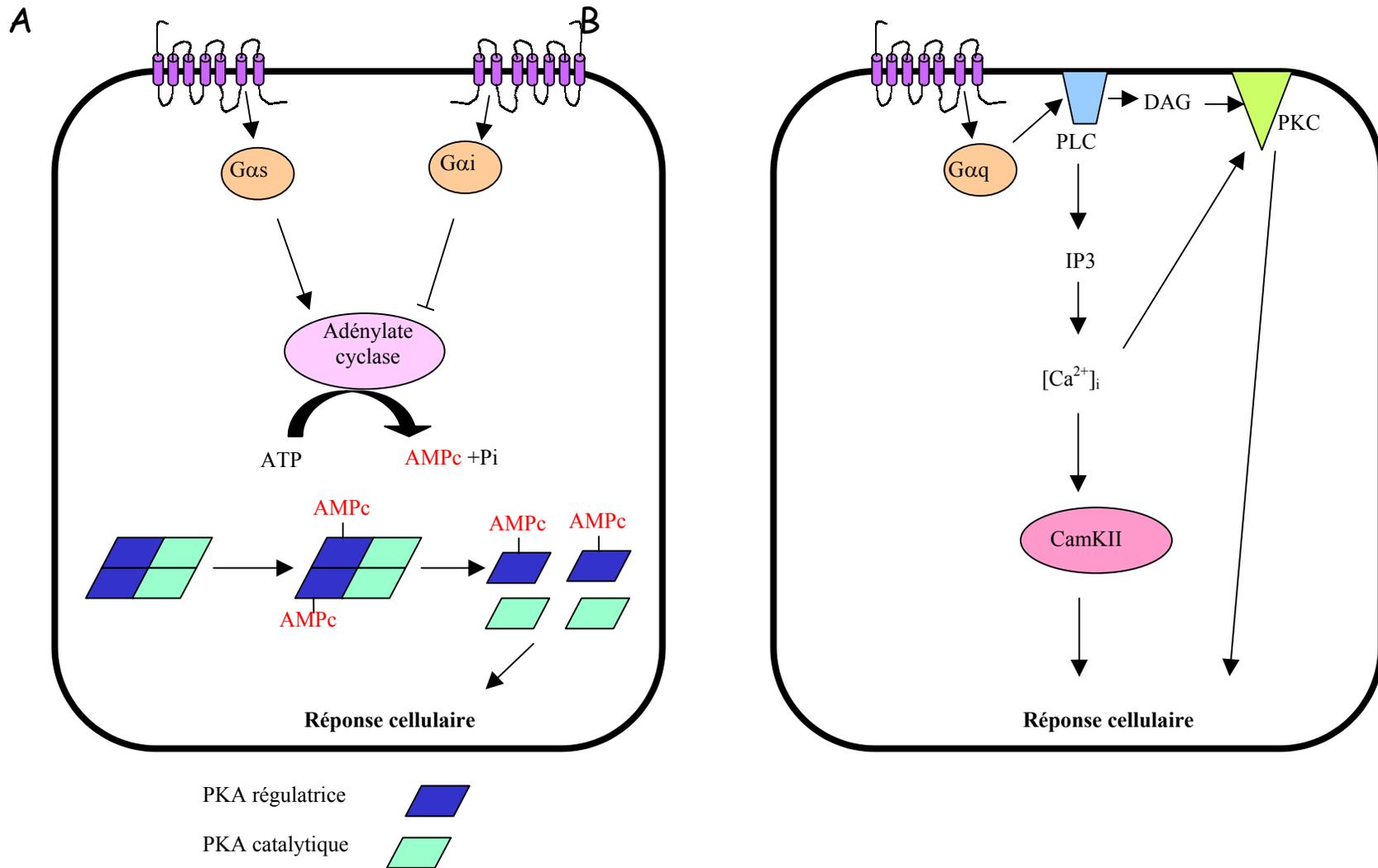


Figure 6 : Voies des protéines G α s, G α i et G α q.

Par exemple, au moment de la désensibilisation des RCPG, les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) phosphorylent les RCPG permettant la liaison de l'Arrestine β avec la troisième boucle intracellulaire et le domaine C-terminal des RCPG. L'Arrestine β induit alors la désensibilisation des RCPG (voir paragraphe 1.5). La β -Arrestine peut aussi jouer le rôle d'adaptateur entre les RCPG et la protéine tyrosine kinase Src et activer la voie de transduction des MAP kinases. De même, les petites protéines G comme Ras, Rho ou Rac peuvent interagir directement avec le domaine C-terminal des RCPG et activer la phospholipase D (Hall et al. 1999).

Enfin, il a été montré que plusieurs protéines contenant le domaine d'interaction PDZ peuvent interagir directement avec la partie distale du domaine C-terminal des RCPG. C'est le cas du facteur régulateur de l'échangeur Na^+/H^+ (NHEF) qui peut se lier au récepteur β_2 -adrénergique et contrôler la régulation rénale de l'échange Na^+/H^+ *in vivo*. De même les NO synthases qui produisent le monoxyde d'azote (NO), un vasodilatateur puissant, peuvent être activées ou inhibées par les RCPG en interagissant avec leur domaine PDZ.

Il apparaît donc que les récepteurs couplés aux protéines G activent non seulement les voies de signalisation des protéines G qui sont communes à la plupart des RCPG, mais aussi d'autres voies de transduction propres à chaque récepteur via une interaction directe entre leurs domaines intracellulaires et des effecteurs secondaires (voir figure 7) (Hall et al. 1999).

1.5/ Dimérisation des RCPG :

Depuis quelques années, un nouveau champ d'investigation a été ouvert sur la dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, des études *in vitro* de co-immunoprécipitation ou par « fluorescence resonance energy transfer » (FRET) ont montré des interactions directes entre des RCPG identiques (homodimères) ou non (hétérodimères). Certaines études indiquent que la formation d'hétérodimères présente non seulement une pharmacologie et/ou une fonction différente par rapport aux récepteurs seuls ou aux homodimères mais aussi une régulation de la cinétique de

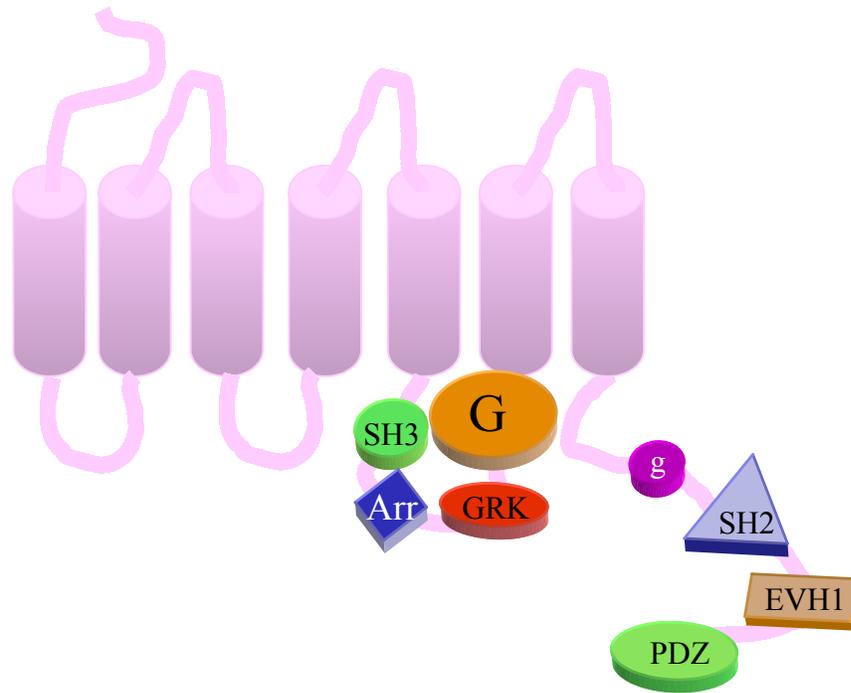


Figure 7 : Domaines d'interactions protéine-protéine (D'après Hall et al. 1999).

Domaines d'interactions de l'Arrestine β (Arr), des kinases GRK, des complexes hétérotrimériques des protéines G (G), des petites protéines g (g), de la famille des protéines Homer (EVH1) ou des protéines à domaine d'interaction protéine-protéine PDZ, SH2 ou SH3.

désensibilisation différente. En effet, la co-expression d'un RCPG internalisé lentement peut limiter l'internalisation d'un second récepteur qui est, normalement, désensibilisé rapidement.

La dimérisation des RCPG est faite par l'intermédiaire des hélices transmembranaires et peut être mise en place au cours de la biosynthèse des récepteurs dans le réticulum endoplasmique. Par exemple, la grande majorité des récepteurs GABA_BR1 exprimés seuls dans des cellules sont retenus dans le réticulum endoplasmique alors que leur co-expression avec le récepteur GABA_BR2 permet au dimère d'atteindre la membrane plasmique. D'autre part, l'action du ligand sur la dimérisation des récepteurs semble controversée. En effet, des études contradictoires ont montré que la liaison des mêmes ligands aux mêmes récepteurs peut soit induire l'association soit la dissociation des dimères (Milligan et al. 2003).

Bien que plusieurs études *in vitro* convaincantes dans des cellules transfectées aient montré la possibilité pour des RCPG de former des dimères, aucune étude *in vivo* dans des organismes modèles n'a confirmé l'existence de telles interactions dans la nature.

1.6/ Désensibilisation et internalisation des RCPG :

Après leur activation, les RCPG peuvent être internalisés par deux mécanismes indépendants. Ils peuvent notamment être localisés et concentrés dans des parties précises de la membrane plasmique appelées cavéoles. Les cavéoles, tapissées par la Cavéoline, concentrent beaucoup de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation comme des RCPG, des récepteurs tyrosine kinase, la PKC α ou les NO synthases. Après stimulation d'un récepteur les cavéoles peuvent s'invaginer et internaliser les récepteurs qui sont, soit dégradés dans les lysosomes, soit recyclés à la membrane.

Une deuxième voie de désensibilisation de certains RCPG implique leur phosphorylation par les GRK. Ils sont alors reconnus par l'Arrestine β qui interagit avec la troisième boucle intracytoplasmique du récepteur et empêche la liaison des protéines G au récepteur. Ce processus est appelé désensibilisation et peut être suivi par

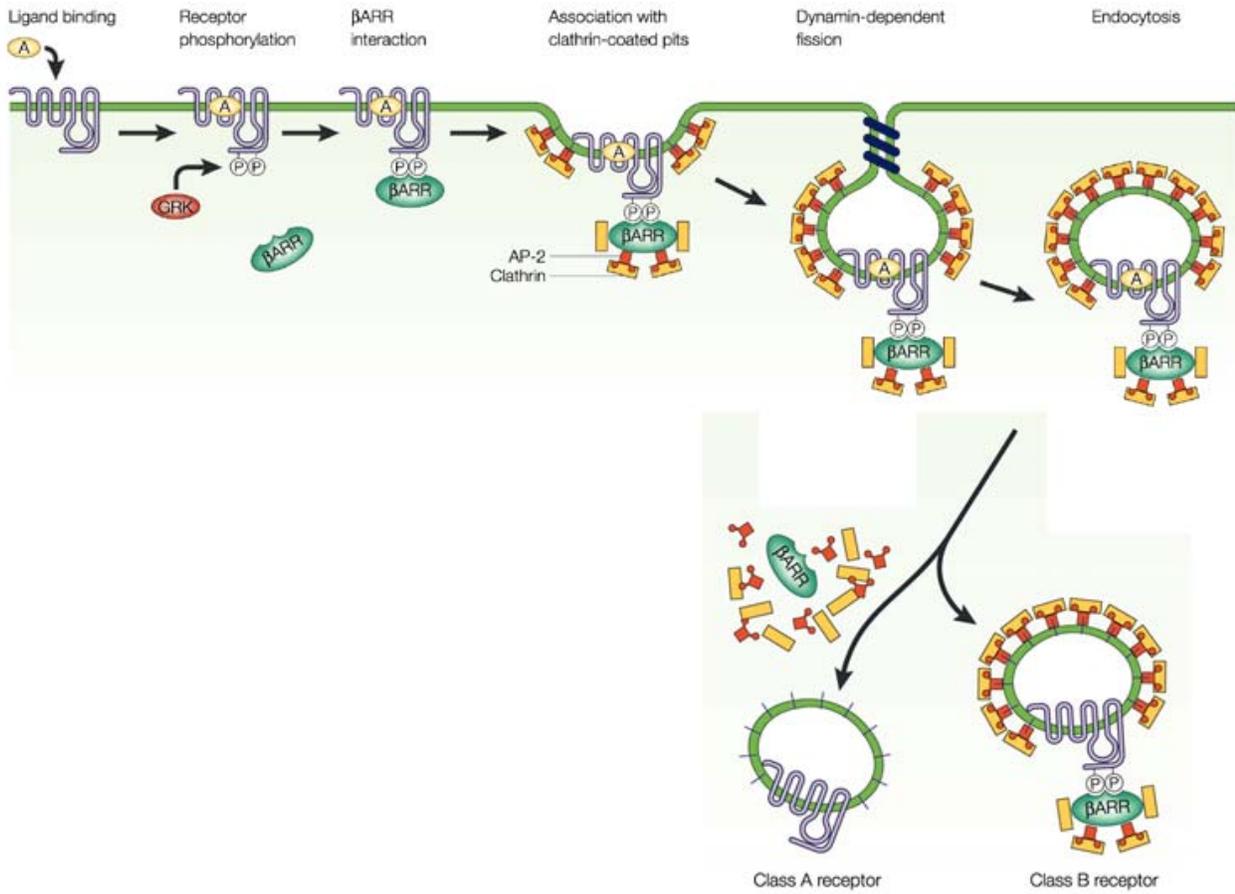


Figure 8 : Désensibilisation et internalisation des RCPG par l'intermédiaire des vésicules de Clathrine (D'après (Pierce and Lefkowitz 2001)).

l'internalisation du récepteur dans une vésicule. Pour ce faire, l'Arrestine β (β Arr sur la figure 8) recrute des Adaptines qui forment le complexe AP2 et des molécules de Clathrine. Les récepteurs sont alors internalisés dans des vésicules acides avec ou sans Arrestine β selon la classe du récepteur (respectivement B et A de la figure 8). Les RCPG sont alors soit déphosphorylés et recyclés à la membrane plasmique, soit dégradés dans les lysosomes dans un processus de dérégulation (Pierce and Lefkowitz 2001).

2/ Classification des récepteurs de la sérotonine :

Chez les mammifères, on compte 16 gènes codant pour des récepteurs de la sérotonine. A l'exception des récepteurs 5-HT3 qui sont des canaux ioniques, tous les récepteurs de la sérotonine appartiennent à la famille des RCPG et sont classés en 6 familles selon la nature de la protéine $G\alpha$ activée, les homologies de leurs séquences protéiques et leurs propriétés pharmacologiques (voir figure 9). Ainsi, les récepteurs 5-HT1 sont couplés aux protéines $G\alpha i/o$ et inhibent l'adénylate cyclase, les récepteurs 5-HT2 couplés aux protéines $G\alpha q/11$ augmentent la concentration de calcium intracellulaire et enfin les récepteurs 5-HT4, 5-HT6 et 5-HT7 sont couplés aux protéines $G\alpha s$ et activent la production d'AMPC mais présentent moins de 35% d'homologies entre eux (Hoyer et al. 2002).

On peut ajouter à la grande diversité des gènes des récepteurs de la sérotonine des modifications transcriptionnelles comme l'épissage alternatif ou l'édition de certains gènes codant alors pour plusieurs isoformes d'un récepteur à partir du même gène. Ainsi, le gène des récepteurs 5-HT4 subit des épissages alternatifs dans la partie codant pour le domaine C-terminal ce qui conduit à la formation de 8 récepteurs appelés 5-HT4A-H. De même, le gène du récepteur 5-HT2C subit une édition de l'ARN messager qui remplace une ou plusieurs adenines en inosines qui sont par la suite reconnues comme étant des guanines et changent la nature des acides aminés incorporés dans la protéines. Ainsi, on compte 14 isoformes du récepteur 5-HT2C.

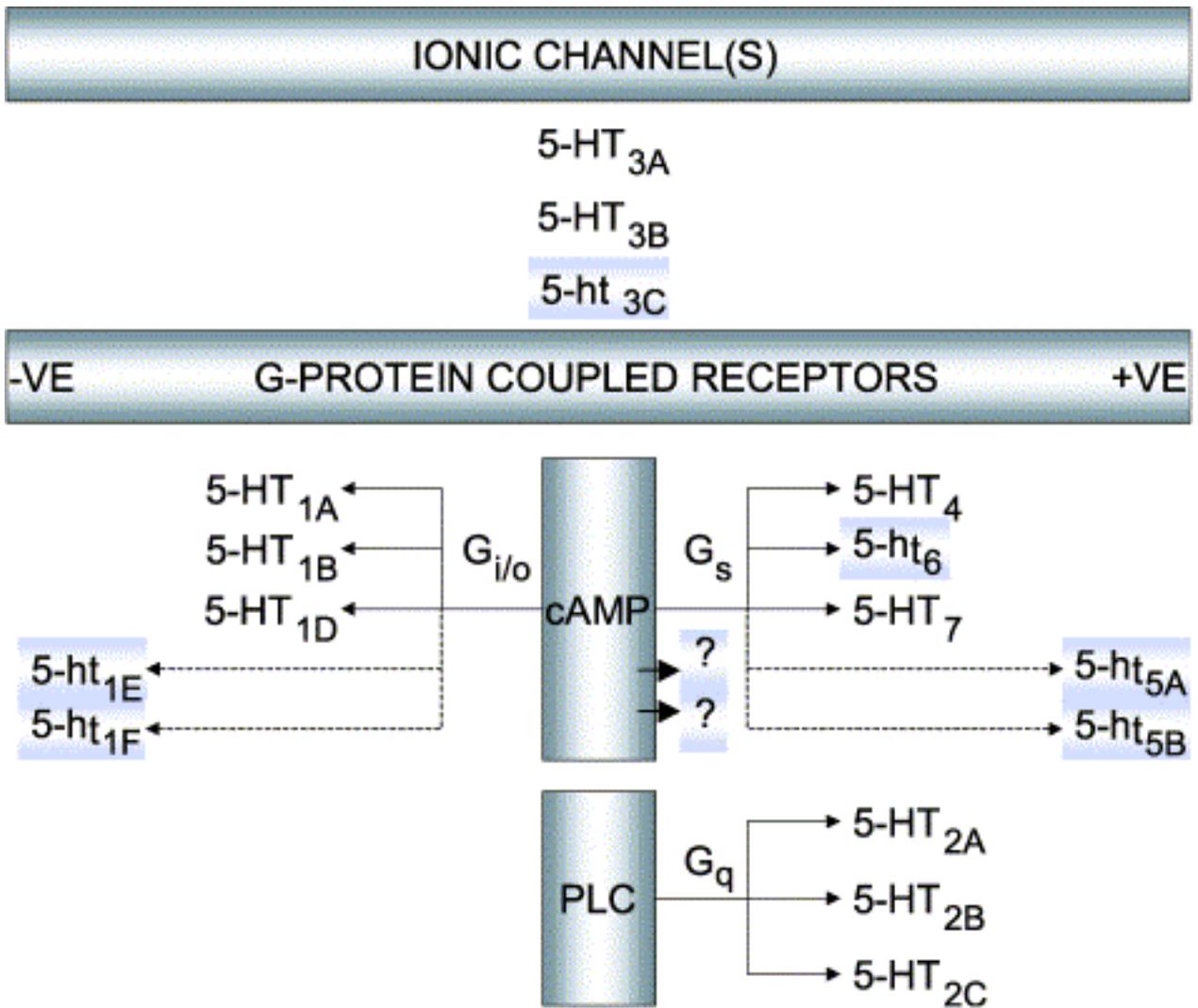


Figure 9 : Classification des récepteurs de la sérotonine (Hoyer et al. 2002)

La distribution des différents récepteurs de la sérotonine dans les organes des mammifères, leurs rôles et les maladies pour lesquelles certains de ces récepteurs représentent des cibles thérapeutiques reconnues sont présentés dans le tableau 1 (Hoyer et al. 2002).

Nom	Localisation	Rôle	Traitement
5-HT1			
5-HT1A	Système nerveux central (SNC) Système gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Autorécepteur modulant la libération de sérotonine dans le SNC • Stimulation neuroendocrine • Hypothermie • Régulation nerveuse de la pression sanguine et du rythme cardiaque • Locomotion • Régulation du tractus intestinal 	Anxiété Dépression
5-HT1B	SNC Système vasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Autorécepteur modulant la libération de sérotonine dans le SNC • Inhibition de la libération de noradrénaline dans la veine cave • Contraction de la veine caudale (rat) • Extravasation dans les ganglions trigéméniaux 	Migraine Douleur Les souris knock-out sont utilisées comme modèle d'alcoolisme
5-HT1D	SNC Coeur	<ul style="list-style-type: none"> • Autorécepteur modulant la libération de sérotonine dans le SNC • Régulation de la libération de sérotonine dans le coeur 	Migraine Douleur
5-HT1E	SNC	• Inconnu	Non impliqué dans un traitement
5-HT1F	SNC Utérus Mésentère	<ul style="list-style-type: none"> • Possible rôle d'autorécepteur • Extravasation dans les ganglions trigéméniaux 	Migraine Douleur
5-HT2			
5-HT2A	SNC Système vasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Contraction des muscles lisses • Agrégation plaquettaire • Stimulation des sécrétions 	Hypertension Schizophrénie Anti-psychotique

		hormonales	Certaines drogues hallucinogènes comme le LSD ciblent 5-HT2A
5-HT2B	SNC Système gastro-intestinal Reins Poumons Système cardio-vasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Vasorelaxation • Stimulation de la prise alimentaire • Anxiété • Développement cardiaque • Développement des neurones entériques 	Prophylaxie de la migraine
5-HT2C (ancien 5-HT1C)	SNC	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoactivité • Inhibition de la prise alimentaire • Comportements suicidaires • Dyskinésie orale 	Anxiété Problèmes d'alimentation (anorexie, boulimie)
5-HT3	SNC Système nerveux périphérique (SNP) Système gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Mobilité du tractus intestinal • Stimulation des sécrétions intestinales • Vomissement (au cours d'un traitement de chimio ou radiothérapie) 	Mémoire
5-HT4	SNC Système gastro-intestinal Coeur	<ul style="list-style-type: none"> • Contraction de l'oesophage et du côlon • Stimulation des sécrétions intestinales • Modulation de la libération des neurotransmetteurs dans le SNC • Stimulation du rythme cardiaque 	Arythmie cardiaque Incontinence urinaire Constipation
5-HT5	SNC (dans les astrocytes)	<ul style="list-style-type: none"> • Adaptation au stress 	Non impliqué dans un traitement
5-HT6	SNC (dans les neurones)	<ul style="list-style-type: none"> • Comportement (bâillement, étirement, mastication) • Inhibition de la prise alimentaire • Mémoire 	Dépression Anti-psychotique
5-HT7	SNC Système vasculaire Muscles lisses non vasculaires	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation • Hypothermie • Sommeil 	Relaxation des vaisseaux sanguins Hypothermie

Tableau 1 : Présentation des récepteurs sérotoninergiques de mammifères.

3/ Le récepteur 5-HT2B de mammifères :

Le récepteur 5-HT2B de souris a été cloné au laboratoire en 1992 (Loric, Launay et al. 1992). Depuis, plusieurs études ont montré le rôle majeur de ce récepteur dans la différenciation et la prolifération des cellules ou son effet anti-apoptotique au cours du développement du coeur ou des neurones entériques.

Les récepteurs 5-HT2 sont les orthologues chez les mammifères du récepteur de la drosophile 5-HT2Dro. Cependant, parmi les récepteur 5-HT2, le récepteur 5-HT2B présente les mêmes caractéristiques pharmacologiques que le récepteur 5-HT2Dro et joue un rôle important au cours du développement embryonnaire de la souris comme le récepteur 5-HT2Dro chez la drosophile. Il est donc important de comprendre le rôle du récepteur 5-HT2B.

3.1/ Voies de signalisation :

Comme les autres récepteurs 5-HT2, le récepteur 5-HT2B active la protéine $G\alpha_q$ et la libération de calcium du réticulum endoplasmique (Loric et al. 1995). Cependant, il a aussi été montré que le récepteur 5-HT2B peut activer la phospholipase A2 et la production d'acide arachidonique (Tournois et al. 1998) ou la synthèse de NO, en interagissant avec la NO synthase via son domaine PDZ C-terminal (Manivet et al. 2000).

Enfin, il a été montré que l'activation du récepteur 5-HT2B peut permettre aux cellules leur entrée dans le cycle cellulaire via la transactivation du récepteur tyrosine kinase (PDGFR). L'activation subséquente de la voie des MAP kinases puis des cyclines D1 et E permet la phosphorylation de la protéine Rb responsable de l'entrée des cellules en phase S (Nebigil 2000) (figure 10A).

La sérotonine, par l'intermédiaire du récepteur 5-HT2B peut inhiber le processus d'apoptose dans des cardiomyocytes en culture (Nebigil 2003a). En effet, en absence de sérotonine, les protéines actives Bax et ANT1, situées dans la membrane des mitochondries, permettent la sortie de cytochrome C (Cyto C) des mitochondries vers le cytoplasme (figure 11). Le cytochrome C va alors activer le clivage des caspases 3 et 9 et

donc induire l'apoptose des cellules. Après avoir été activé, le récepteur 5-HT2B inhibe les protéines Bax et ANT1 via la voie des MAP kinases (ERK1/2) et l'activation de la kinase PI3K/Akt (figure 11).

L'activation du récepteur 5-HT2B peut donc avoir à la fois un effet mitogène et un effet anti-apoptotique dans des cellules en culture.

3.2/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans la différenciation cellulaire :

La lignée 1C11 de cellules immortalisées de carcinomes ont la capacité de se différencier en cellules sérotoninergiques après un traitement à l'AMPc. Il a été montré que les cellules 1C11 transformées vont d'abord synthétiser de la sérotonine et exprimer le transporteur de la sérotonine puis elles vont séquentiellement exprimer les récepteurs 5-HT1B/1D et 5-HT2B 2 jours après le début du traitement puis les récepteur 5-HT2A 4 jours après le début de traitement des cellules (Kellermann et al. 1998).

Lorsqu'il est exprimé, le récepteur 5-HT2B stimule la libération d'acide arachidonique via la voie de la phospholipase A2 et inhibe la libération d'AMPc induite par l'activation des récepteurs 5-HT1B/1D. Cette inhibition est nécessaire à la différenciation cellulaire. Au bout de 4 jours, la voie de signalisation du récepteur 5-HT2A interfère avec celle du 5-HT2B et lève l'inhibition de la libération d'AMPc (Tournois et al. 1998) (figure 10B).

La sérotonine a donc la capacité de contrôler la différenciation de ces cellules 1C11 en culture transformées par l'intermédiaire du récepteur 5-HT2B .

3.3/ Expression du récepteur 5-HT2B chez la souris :

Le récepteur 5-HT2B est exprimé dans certaines zones du cerveau comme le cerebellum, le cortex ou l'hippocampe mais c'est surtout au niveau périphérique qu'il

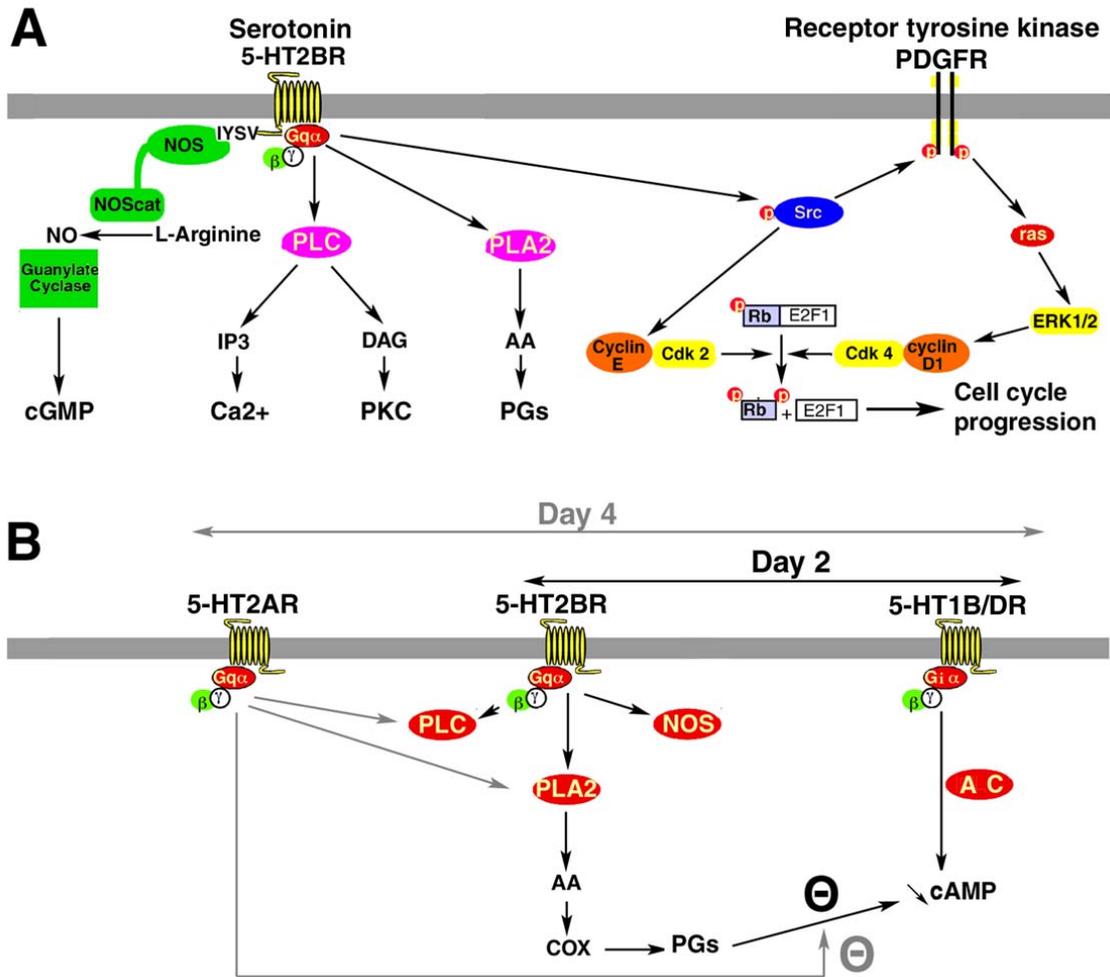


Figure 10 : Voies de signalisation du récepteur 5-HT2B (Nebigil et al. 2001).

joue un rôle important. En effet, on le retrouve dans le système gastro-intestinal et le système cardio-vasculaire chez l'adulte, plus précisément dans l'estomac, les intestins, les muscles lisses des poumons, les cellules endothéliales des poumons, les vaisseaux sanguins ainsi que les cardiomyocytes (Choi and Maroteaux 1996).

Au cours de l'embryogenèse de la souris, un pic d'expression du récepteur 5-HT2B a été observé 8,5 jours après la fécondation dans les cellules de la crête neurale, le coeur et les somites (Choi et al. 1997).

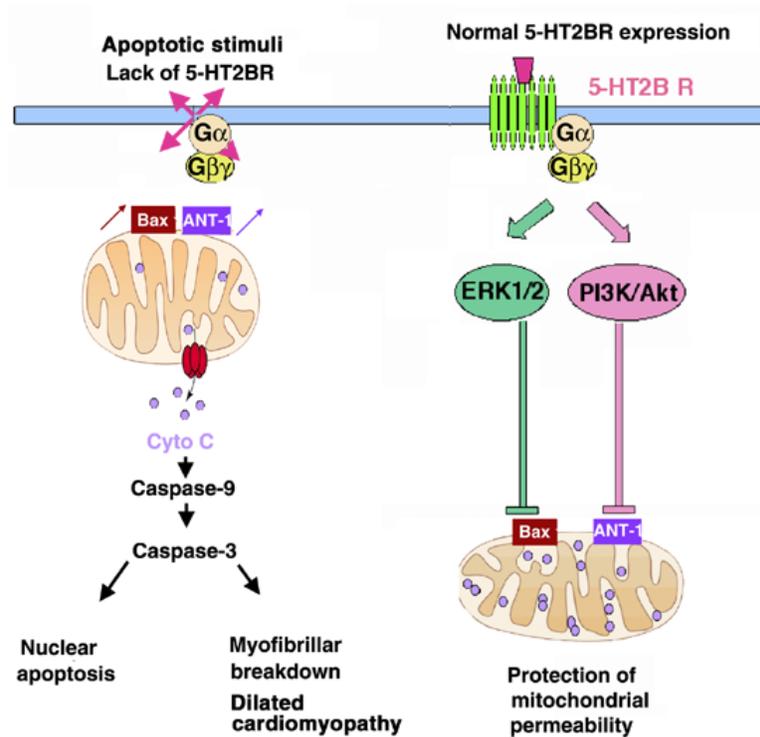


Figure 11 : Rôle du récepteur 5-HT2B dans l'apoptose (Nebigil et al. 2003).

3.4/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans le développement du coeur :

De premières études de cultures d'embryons de souris *ex utero* dans un milieu contenant un antagoniste spécifique pour le récepteur 5-HT2B, la ritansérine, huit jours et demi après la fécondation, ont montré que ces embryons présentent un défaut dans la première étape du développement cardiaque : la trabéculatation (Choi, et al. 1997). Ce défaut a été confirmé plus tard par l'étude de souris invalidées pour le gène du récepteur 5-HT2B (KO) (Nebigil, et al. 2000). En effet, les souris KO présentent deux stades de létalité, le premier au cours du développement embryonnaire et le deuxième à la naissance, même si environ 50% des souris survivent à ces deux étapes critiques. Les embryons présentent un défaut de trabéculatation et une différenciation prématurée des cardiomyocytes, suggérant un rôle de la sérotonine via le récepteur 5-HT2B dans la différenciation et la prolifération des cellules cardiaques. Les souris qui naissent présentent un phénotype cardiaque de cardiomyopathie dilatée caractérisé par un gros coeur avec une paroi fine par rapport au coeur d'une souris sauvage (figure 12) dû aux défauts de trabéculatation embryonnaires. Les souris invalidées pour le gène du récepteur 5-HT2B représentent ainsi un bon modèle d'étude pour certaines malformations congénitales cardiaques (Nebigil, et al. 2001).

En revanche, l'étude de souris transgéniques chez lesquelles on surexprime le gène du récepteur 5-HT2B dans le coeur (TG) présentent une hypertrophie cardiaque (voir figure 12) accompagnée d'une altération de la structure du cytosquelette des cardiomyocytes. De plus, la fonction des mitochondries, impliquées dans l'apoptose des cellules, semble être altérée (Nebigil et al. 2003).

Au cours du développement cardiaque, la sérotonine et le récepteur 5-HT2B sont donc indispensables au contrôle de l'équilibre qui existe entre prolifération, différenciation et apoptose dans les cardiomyocytes.

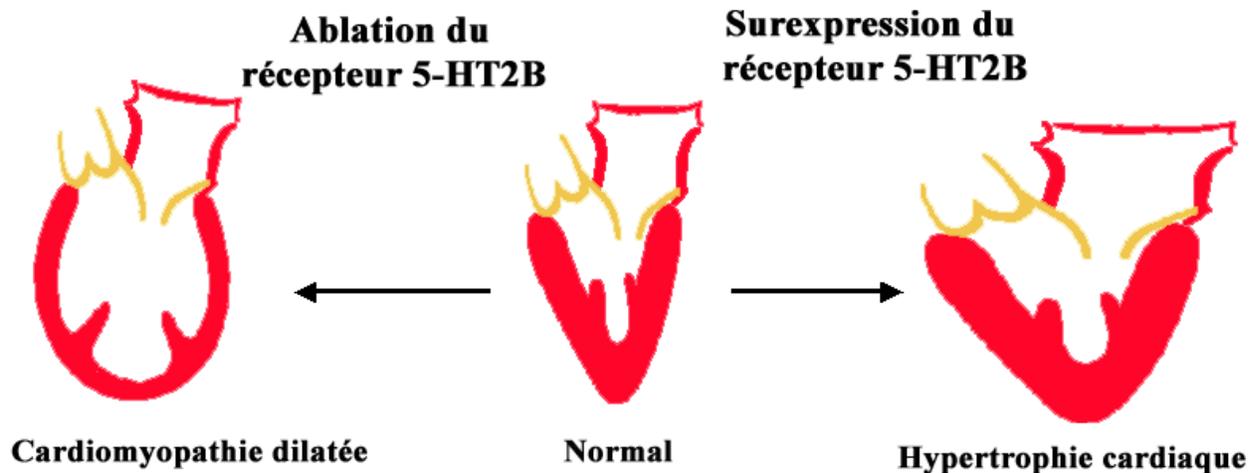


Figure 12 : Phénotypes cardiaques observés après invalidation ou surexpression du récepteur 5-HT2B.

3.5/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans le développement des neurones entériques :

Au cours du développement embryonnaire, les cellules du système nerveux entérique répondent à un grand nombre de facteurs trophiques. On distingue 2 lignées de cellules qui se différencient successivement, les cellules sous la dépendance de *mash1* et celles indépendantes de *mash1*. Au cours de la deuxième phase, certains neurones expriment transitoirement le récepteur 5-HT2B. Ces cellules répondent alors à la sérotonine libérée par les cellules entérochromaffines dans le milieu extérieur. Après stimulation du récepteur 5-HT2B par la sérotonine, l'activation de la voie de transduction des MAP kinases permet la prolifération et la différenciation des neurones entériques (Fiorica-Howell, et al. 2000).

3.6/ Rôle du récepteur 5-HT2B dans l'hypertension pulmonaire :

Il a été montré que la dexfenfluramine, longtemps utilisée comme coupe-faim augmente le risque d'hypertension pulmonaire. La dexfenfluramine, qui est un inhibiteur du transporteur de la sérotonine (5-HTT), inhibe le recaptage de la sérotonine dans le milieu extérieur des cellules.

De plus, la nordexfenfluramine, produit du métabolisme de la dexfenfluramine agit comme agoniste du récepteur 5-HT_{2B}. L'activation du récepteur 5-HT_{2B} entraîne dans un contexte hypoxique non seulement une vasoconstriction des vaisseaux sanguins mais aussi une prolifération des cellules des vaisseaux et la production d'Elastase et de « Transforming growth factor β » (TGF β). L'Elastase est un marqueur du remodelage des tissus vasculaires responsable de l'aggravation du risque d'hypertension pulmonaire (Launay et al. 2002).

3.7/ Rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans la migraine :

L'une des causes de la migraine est la dilatation des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau. La dihydroergotamine (DHE) est un anti-migraineux reconnu pour son action agoniste sur les récepteurs 5-HT_{1B/1D} et α adrénergiques. Il a récemment été montré que la 8'OH-DHE, produit du métabolisme de la DHE, est un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. La 8'OH-DHE est très stable et son action sur les récepteurs 5-HT_{2C} et surtout 5-HT_{2B} permet une inhibition prolongée de la dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui explique l'effet à long terme d'un traitement à la DHE. Comme il a été montré que le récepteur 5-HT_{2B} peut activer la NO synthase, le mécanisme moléculaire mis en jeu pourrait être l'inhibition de la NO synthase et donc de la production de NO, responsable de la dilatation des vaisseaux sanguins (Schaerlinger et al. 2003).

Chapitre 3

Développement embryonnaire de *Drosophila melanogaster*

Cette étude a porté sur l'influence de la sérotonine sur le développement précoce de la drosophile. Dans ce chapitre, après une présentation de cet organisme modèle, nous découvrirons le rôle majeur de la segmentation pendant l'embryogenèse de la drosophile et enfin les différentes étapes de son développement embryonnaire.

1 / La drosophile : organisme modèle

La drosophile a été utilisée comme organisme modèle pour la recherche depuis presque un siècle et c'est riche de ce passé que plusieurs milliers de scientifiques travaillent aujourd'hui sur de multiples aspects de sa biologie. Après Thomas Hunt Morgan en 1933, ce sont trois drosophilistes (E.B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus) qui furent récompensés du Prix Nobel de Médecine en 1995 pour leurs travaux sur le contrôle génétique du développement embryonnaire précoce de la drosophile, ce qui témoigne de l'importance de la drosophile comme organisme modèle. A l'origine, cet organisme était principalement étudié en génétique pour comprendre les règles de l'hérédité des caractères. Aujourd'hui, elle est essentiellement utilisée en biologie du développement, pour comprendre comment un organisme complexe se forme à partir d'un oeuf fertilisé.

Cet animal est facile et économique à élever en laboratoire. Son cycle de vie est court (10 jours) et une progéniture importante disponible à chaque génération permet aux scientifiques d'étudier facilement les étapes du développement embryonnaire, qui se fait en 24 heures, sur un échantillon important d'animaux.

De plus, un grand nombre d'outils sont disponibles pour étudier la biologie de la drosophile (chromosome balancier, transposons utilisés en génétique, séquençage complet du génome, transgénèse, ARN interférence et les chromosomes polytènes pour les cartographies chromosomiques).

1.1/ Taxinomie de la drosophile :

Les drosophiles sont des animaux faisant partie du phylum des arthropodes et plus précisément de la classe des insectes. Elles appartiennent à l'ordre des diptères (ou mouches vraies) caractérisés par la présence d'haltères sur le troisième segment thoracique indispensables

à la stabilisation du vol. Cet ordre contient les mouches, moucherons et moustiques. Concernant la superfamille des drosophilidae, on compte près de 3000 espèces qui ont colonisé tous les types d'environnement.

rang	nom	définition	nom commun
super règne	Eukaryota	cellule contenant un noyau	Eucaryotes
règne	Metazoa	animal constitué de plusieurs couches cellulaires	Métazoaires
phylum	Arthropoda	présence d'un squelette externe	
superclasse	Hexapoda	3 paires de pattes	
classe	Insecta	présence d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen distincts	insectes
sous-classe	Neoptera	capacité de replier ses ailes	
infra-classe	Endopterygota (holométabole)	stades larvaires, pupaux et adultes différents	
ordre	Diptera	présence d'haltères sur le troisième segment thoracique	Mouches
sous-ordre	Brachycera	antennes courtes	
infra-ordre	Muscomorpha	3 stades larvaires	
superfamille	Ephydroidea		
famille	Drosophilidae		
genre	Drosophila		
espèce	Drosophila melanogaster		mouche du vinaigre

Tableau 2: Taxinomie de *Drosophila melanogaster*.

1.2/ Le cycle de vie de la drosophile :

La drosophile est un animal endoptérygote, c'est-à-dire que son développement comprend un stade embryonnaire, trois stades larvaires, un stade pupal avant éclosion de la mouche adulte. Ainsi, après la fertilisation de l'ovocyte (AF), l'embryon, d'une taille de 500 μm , va se développer pendant 20 à 22 heures avant d'éclore et donner une larve de premier stade. La larve va se nourrir et grandir continuellement. Elle subira 2 mues successives pour donner le deuxième (2 jours AF) puis le troisième stade larvaire (4 jours AF). Enfin, à 6 jours AF la larve s'immobilise et forme une prépupe. Ce stade prépupal dure environ 12 heures pendant lesquels de nombreux organes larvaires sont hystolysés avant le stade pupal qui se poursuit alors pendant 6 jours et est caractérisé par la formation des organes adultes de la drosophile qui va éclore 10 jours AF. Ces jeunes mouches seront fertiles 6 heures après leur éclosion. Les durées indiquées pour ce cycle sont valables pour un développement à 25°C mais à 18°C, la durée de chaque étape du cycle de vie est doublée.

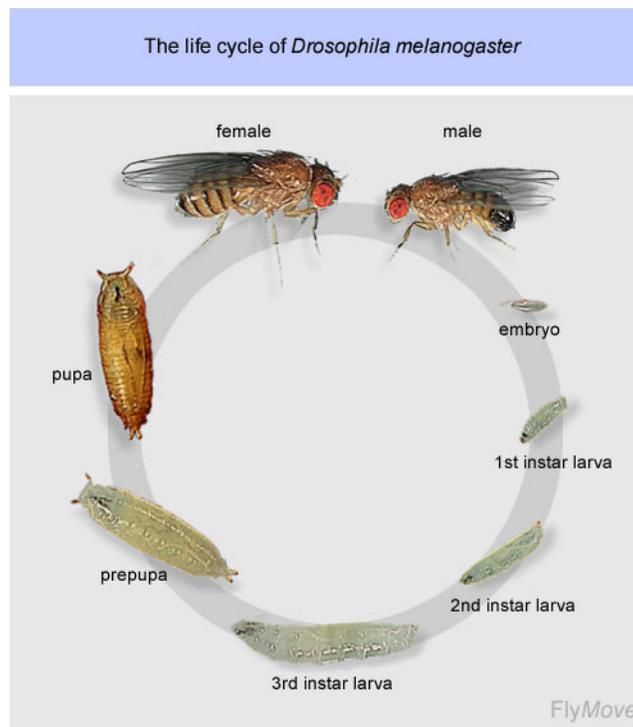


Figure 13 : cycle de vie de *Drosophila melanogaster*.

1.3/ Le génome de la drosophile :

Drosophila melanogaster possède 4 paires de chromosome : les chromosomes sexuels XY et trois paires d'autosomes (appelés 2,3 et 4). Le chromosome 4 est petit et peu étudié. Le génome contient 165 millions de paires de base contenant environ 14000 gènes. En comparaison, le génome humain d'une taille de 3,3 milliards de paires de bases contient 30000 gènes et celui de la levure faisant 13,5 millions de paires de bases a environ 5800 gènes. La séquence complète du génome de la drosophile a été publiée en 2000 (Adams et al. 2000).

1.4/ Le chromosome balancier :

Lorsqu'une mutation récessive confère à la mouche une létalité au cours de son développement ou une stérilité, il est nécessaire de pouvoir élever les drosophiles à l'état hétérozygote. Pour ce faire, on utilise un chromosome remanié : le chromosome balancier. C'est un chromosome sauvage dont l'ADN a subi des inversions de sorte que tous les gènes du chromosome sont présents mais dans un ordre différent que sur le chromosome sauvage. Ainsi, les recombinaisons qui ont lieu au cours des méioses ne sont pas possibles et la souche peut être conservée à l'état hétérozygote sans perte de la mutation récessive. Souvent, les embryons homozygotes pour le chromosome balancier meurent au cours du développement embryonnaire car la plupart des chromosomes balanciers portent une mutation récessive létale.

2/ La segmentation :

La segmentation est caractérisée par la répétition d'un motif le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal. Chez des animaux primitifs comme les annélides, le corps est composé d'un grand nombre de métamères ayant une structure identique à leurs voisins. Les métamères sont des segments contenant chacun un ganglion nerveux, un système excrétoire et des muscles striés développés selon les mêmes critères.

Au cours du développement embryonnaire des insectes, des segments identiques sont définis et se spécialisent chez l'adulte. On distingue les parasegments qui sont définis pendant le

développement précoce et les segments séparés par des insertions musculaires et qui se spécialisent chez l'adulte et deviennent spécifiques de la tête, du thorax ou de l'abdomen (figure 15).

Enfin, chez les vertébrés supérieurs, la manifestation de la segmentation se retrouve dans les somites qui vont former le squelette axial, les muscles lisses, le système nerveux périphérique et le derme, et dans les rhombomères au niveau du système nerveux central (Pick 1998).

Chez la drosophile, des gènes régulant la segmentation ont été mis en évidence lors d'une expérience pendant laquelle le génome a été saturé par des mutations (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). On distingue ainsi une cascade moléculaire impliquant successivement les gènes maternels, les gènes « gap », les gènes « pair-rule », les gènes de polarité segmentaire et les gènes homéotiques participant à la définition des différents segments.

2.1/ Les gènes maternels :

Chez la drosophile, la caractérisation des axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont contrôlés par les gènes maternels. Ces gènes sont transcrits par la mère et déposés dans l'ovocyte par les cellules folliculaires avant la fécondation. Le long de l'axe antéro-postérieur, on distingue *bicoïd* et *hunchback* dans la partie antérieure qui déterminent la tête et le thorax et *nanos* et *caudal* dans la partie postérieure déterminant l'abdomen. Après leur traduction, les protéines diffusent vers la partie centrale de l'embryon, forment un gradient et répriment l'expression des gènes ayant un gradient réciproque. Par exemple *nanos* et *bicoïd* répriment mutuellement leur traduction. Les protéines traduites sont des facteurs de transcription et activent la transcription des gènes « gap » (Jäckle 1993) (figure 14).

Les régions terminales sont aussi déterminées par des gènes maternels qui sont impliqués dans la voie intracellulaire du récepteur tyrosine kinase Torso. Torso est exprimé à la périphérie de l'embryon et est activé localement par son ligand. La stimulation de cette voie de transduction conduit à l'activation de facteurs de transcription dont l'identité n'est pas encore connue, puis à la transcription de gènes zygotiques comme *huckebein* ou *tailless* (Baek and Lee 1999).

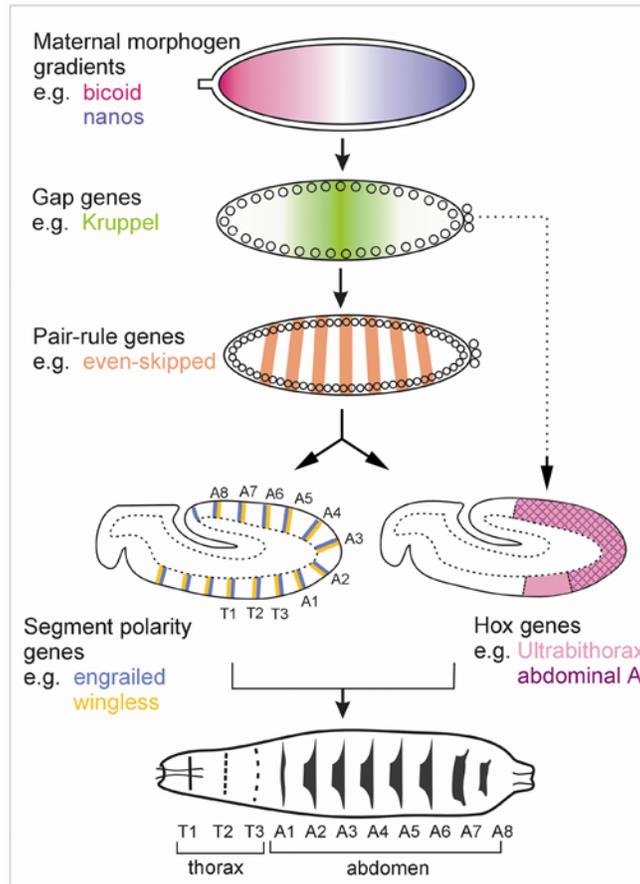


Figure14 : Cascade des gènes de segmentation (Sanson 2001).

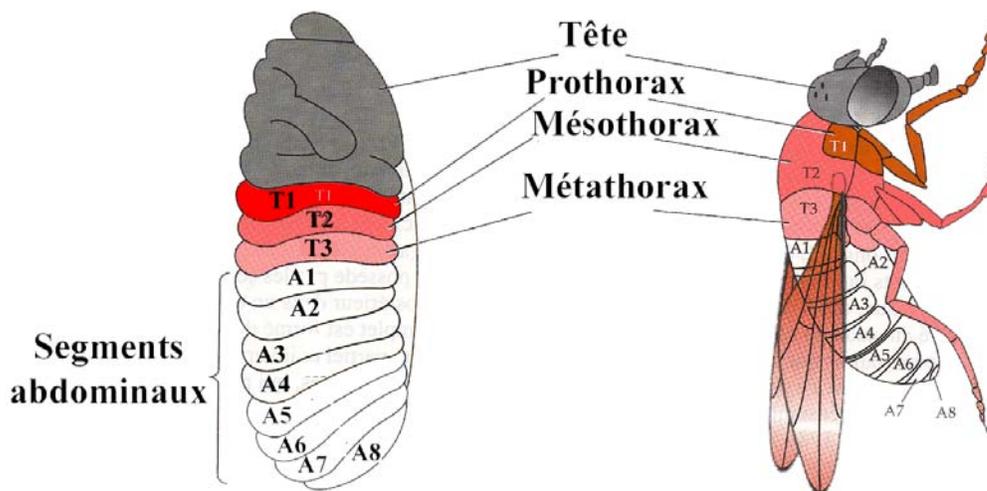


Figure 15 : Correspondance de la segmentation de l'embryon et de la drosophile adulte.

2.2/ Les gènes « gap » :

Les gènes « gap » sont les premiers gènes zygotiques nécessaires à la segmentation à être transcrits pendant la division des noyaux et avant la cellularisation. Chacun de ces gènes est exprimé dans une large bande transversale. On distingue les gènes « gap » antérieurs comme *orthodenticle (otd)*, *empty spiracle (ems)* *button head (btd)* dans la tête de l'embryon, *hunchback* zygotique (*hb*) dans le segment gnathal et les segments thoraciques, *krüppel (kr)* dans le thorax et les premiers segments abdominaux, *knirps (kni)* dans l'abdomen et *giant (gt)* exprimé dans la tête et la partie postérieure de l'abdomen. Dans les parties terminales les gènes « gap » exprimés sont *huckebein (hkb)* et *tailless (tll)*.

D'une manière générale, l'expression des gènes « gap » est activée directement par les facteurs de transcription maternels. Cette activation dépend de la concentration locale des protéines maternelles (figure 14). Seuls *knirps* et *giant* sont activés par une protéine encore inconnue et exprimée ubiquitairement dans l'embryon.

La répression des gènes « gap » est d'abord sous le contrôle des gènes maternels. Ainsi, les gènes « gap » antérieurs comme *hunchback* zygotique semblent être réprimés dans la partie la plus antérieure de l'embryon par les gènes maternels terminaux. Les gènes « gap » adjacents se répriment ensuite entre eux et affinent les limites des domaines d'expression des gènes les entourant (Jäckle 1993) (figure 14).

2.3/ Les gènes « pair-rule » :

2.3.1/ Généralités :

Les gènes « pair-rule » sont exprimés en sept bandes transversales le long de l'axe antéro-postérieur dans le tronc de l'embryon (figure 14). Ces gènes agissent directement sur le développement et la différenciation des parasegments et lorsqu'ils sont mutés, provoquent un phénotype caractéristique où un segment sur deux disparaît dans le tronc

de l'embryon. L'expression des gènes « pair-rule » commence peu avant la cellularisation et continue pendant l'extension de la bandelette germinative.

On distingue les gènes « pair-rule » primaires comme *hairy* (*h*), *runt* (*run*) et *even-skipped* (*eve*) qui sont sous le contrôle direct des gènes maternels et des gènes « gap » et les gènes « pair-rule » secondaires (*fushi-tarazu* (*ftz*), *paired* (*prd*), *odd-skipped* (*odd*) et *sloppy-paired* (*slp*)) dont l'expression dépend non seulement des gènes maternels et « gap », mais surtout des gènes « pair-rule » primaires.

2.3.2/ Exemple de *hairy* :

Le facteur de transcription Hairy est codé par un gène « pair-rule » primaire. La régulation de l'expression de *hairy* est indépendante dans chaque bande. Ainsi, le promoteur de *hairy* est organisé en boîtes indépendantes régulant chaque bande. Par exemple, l'expression de la bande 6 est contrôlée par une région du promoteur de 500 paires de bases (Howard and Struhl 1990; Pankratz et al. 1990; Riddihough and Ish-Horowicz 1991) à laquelle les facteurs de transcription Giant et Knirps se lient et activent la transcription de *hairy* dans la bande 6 (Pankratz et al. 1990; Riddihough and Ish-Horowicz 1991). La répression de la transcription de *hairy* et la formation des bordures antérieure et postérieure de la bande 6 sont respectivement sous la dépendance de *krüppel* et *tailless*. De même, la bande 7 de *hairy* est, dans un premier temps, activée par la combinaison des produits des gènes maternels *caudal* et *bicoïd* (La Rosee et al. 1997), puis réprimée dans la partie antérieure par *Krüppel* (La Rosee et al. 1997).

Hairy est un facteur de transcription de la famille des « basic-helix-loop-helix » (bHLH) et est structuralement relié à d'autres facteurs de transcription comme Enhancer of split et Deadpan. Les facteurs de transcription bHLH forment des homo et hétérodimères et peuvent indifféremment activer ou réprimer l'expression du gène cible. *Hairy* est classé dans le groupe des gènes « pair-rule » au cours de la segmentation et est aussi impliqué dans la formation des soies chez l'adulte. Hairy est un répresseur de la transcription et peut directement se lier au promoteur du gène réprimé. Cependant il peut interagir avec le cofacteur Groucho déposé maternellement (Paroush et al 1994). La régulation de la transcription des gènes cibles se fait en 3 étapes : dans un premier temps,

Hairy se lie au promoteur du gène cible, il recrute ensuite Groucho par l'intermédiaire d'un domaine de liaison protéine-protéine (WRPW) et enfin, Groucho réprime la transcription de gènes cibles comme *fushi-tarazu* par exemple (Poortinga et al. 1998).

2.3.3/ Exemple de *fushi-tarazu* :

Le gène *fushi-tarazu* est un gène « pair-rule » secondaire dont l'expression ne dépend pas seulement des gènes maternels et « gap » mais aussi des autres gènes « pair-rule ». Le mode de régulation transcriptionnelle des gènes « pair-rule » secondaires est différent de celui des primaires. Ainsi, l'expression de *fushi-tarazu* est d'abord activée uniformément dans l'embryon par un activateur encore inconnu, puis réprimée aux pôles probablement par les produits des gènes maternels terminaux. Enfin, l'établissement de la périodicité des bandes le long de l'embryon dépend majoritairement de *hairy* mais aussi de *runt* et *even-skipped*. Ces gènes « pair-rule » primaires répriment l'expression de *fushi-tarazu* qui est alors exprimé en 7 bandes transversales le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (figure 14).

Fushi-tarazu est un facteur de transcription à homéodomains qui reconnaissent le site ATTA sur le promoteur du gène cible. Il a une faible spécificité pour son domaine de liaison et peut donc activer un très grand nombre de gènes cibles. Au cours du développement embryonnaire, le co-facteur FTZ-F1 de la famille des récepteurs nucléaires des hormones, déposé maternellement, interagit directement avec Fushi-tarazu et module la spécificité du facteur de transcription (Florence et al. 1997).

2.4/ Les gènes de polarité segmentaire :

Au cours de la vie de la drosophile, on distingue deux unités de segmentation qui se chevauchent : les segments et les parasegments. Les segments correspondent aux unités observées chez l'adulte, 3 segments composent la tête, 3 le thorax et 9 l'abdomen (figure 15). Chez la larve de drosophile, les parasegments sont délimités par des

épaississements mésodermiques et des replis ectodermiques, la partie postérieure de chaque parasegment correspond à la partie antérieure d'un segment.

Peu après la cellularisation, les gènes de polarité segmentaire sont exprimés et divisent les domaines des gènes « pair-rule » en 2, formant 14 bandes de 1 à 2 cellules chacune le long de l'axe antéro-postérieur. Les gènes exprimés dans des cellules voisines interagissent entre elles et définissent les compartiments antérieur et postérieur de chaque segment. Lorsque les gènes de polarité segmentaire sont mutés, un des compartiments du segment (antérieur ou postérieur) disparaît et est remplacé par une duplication en miroir de la partie restante. Ce phénotype est visible sur la cuticule larvaire de la drosophile.

La transcription des gènes de polarité segmentaire est régulée par une combinaison de gènes « pair-rule » qui jouent le rôle d'activateur ou de répresseur. Ainsi, l'expression de *wingless* est activée par *odd-paired* et réprimée par *fushi-tarazu* et *even-skipped*.

L'action des gènes de polarité segmentaire et plus particulièrement *engrailed* et *wingless* sera détaillée dans le chapitre 4.

2.5/ Les gènes homéotiques :

Après l'établissement des limites segmentaires, on assiste à la caractérisation de l'identité des segments. Cette caractérisation est réalisée par les gènes homéotiques.

Sur le chromosome 3 de la drosophile, on distingue deux régions regroupant les gènes homéotiques : il y a d'une part le complexe Antennapedia qui comprend les gènes *labial*, *antennapedia*, *sex comb reduced*, *deformed* et *proboscipedia* qui participent à la spécification de l'identité des segments céphaliques et thoraciques, et d'autre part le complexe Bithorax avec les gènes *ultrabithorax*, *abdominal A* et *abdominal B*, impliqués dans la détermination de l'identité du troisième segment thoracique et de l'abdomen (figure 14).

L'expression des gènes homéotiques est présente dans des segments contigus et est régulée, dans un premier temps, par les gènes « gap » et « pair-rule », puis par les gènes homéotiques qui leur sont postérieurs. Par exemple, l'induction du gène

antennapedia est faite par *fushi-tarazu* et *krüppel*, puis le gène « gap » *knirps* réprime son expression antérieurement. Plus tard, cette répression implique *ultrabithorax* qui est exprimé dans les segments postérieurs à *antennapedia*.

3/ Le développement embryonnaire de la drosophile :

Le développement embryonnaire précoce est décrit dans la figure 16.

3.1/ De l'ovocyte à la fertilisation :

Les organes génitaux des femelles sont composés de deux ovaires divisés en 16 ovarioles. Chaque ovariole contient 6 à 7 chambres à oeuf en maturation. Chacune de ces chambres à oeuf est constituée d'un ovocyte et de 15 cellules nourricières entourées de cellules folliculaires. Au cours de la migration de la chambre à oeuf dans l'ovariole, cette dernière subit une maturation, l'ovogenèse qui peut être subdivisée selon des critères morphologiques en 14 étapes. Au cours de l'ovogenèse, la chambre à oeuf subit des divisions asymétriques, puis la différenciation de l'ovocyte et des 15 cellules nourricières. L'ovocyte mature poursuit sa migration le long de l'oviducte jusqu'à l'utérus (c'est l'ovulation) où il sera fécondé. Les ovocytes non matures dégénèrent et sont éliminés au cours de l'ovogenèse (Bloch Qazi et al. 2003).

Au cours de la copulation, les spermatozoïdes sont stockés dans les deux spermathèques et le réceptacle séminal localisés à proximité de l'utérus. La femelle peut ainsi stocker les spermatozoïdes de plusieurs mâles. Dans l'utérus, l'ovocyte est ensuite fertilisé et la femelle le dépose sur un milieu riche et favorable à la larve.

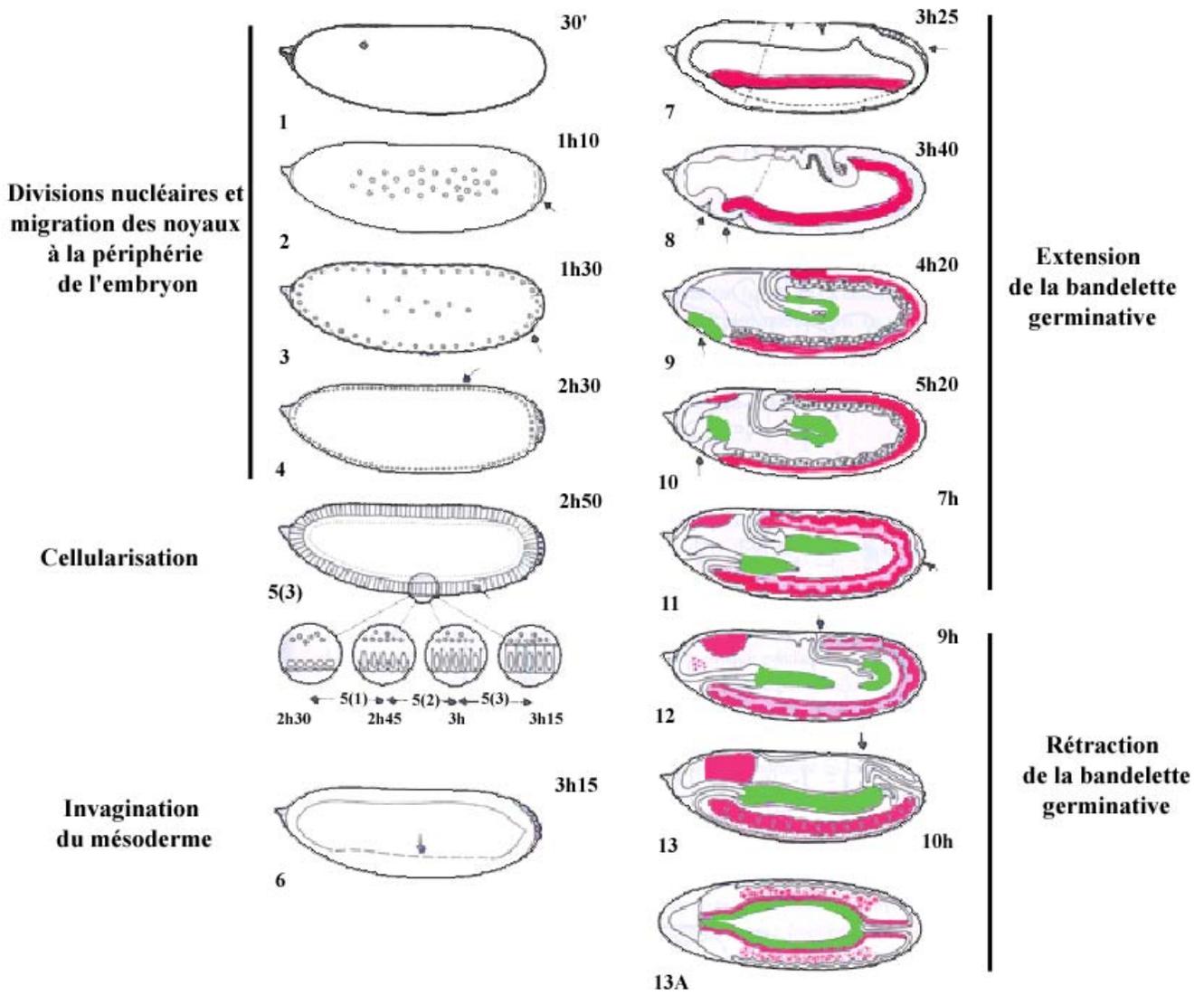


Figure 16 : Développement précoce de *Drosophila melanogaster*.

3.2/ Cellularisation :

3.2.1/ Mécanisme cellulaire :

Après la fécondation, l'embryon est composé d'un syncytium comprenant le vitellus, le cytoplasme et les noyaux en division. Le développement embryonnaire de la drosophile débute par les 13 divisions des noyaux dans le syncytium. A la huitième division, les noyaux commencent à migrer à la périphérie de l'embryon et continuent leurs divisions. Après la neuvième division, la formation du bouton polaire dans la partie postérieure de l'embryon préfigure la formation des 12 à 14 cellules polaires (figure 16).

Environ 140 minutes après la fécondation, la cellularisation commence. Elle peut être subdivisée en deux phases : une première phase lente d'invagination de la membrane plasmique, puis une phase rapide au cours de laquelle la membrane plasmique s'allonge perpendiculairement à la périphérie de l'embryon sur une longueur de 30 μm . Enfin la membrane se referme dans la partie basale des cellules qui restent attachées au vitellus sous-jacent par des ponts membranaires (Jäckle 1993).

Le processus de cellularisation dure 40 minutes au bout desquelles l'embryon est composé d'un épithélium de 6000 cellules parfaitement identiques entourant le vitellus.

3.2.2/ Mécanisme moléculaire :

La coordination et l'organisation de la cellularisation est contrôlée par le cytosquelette. Il a en effet été montré que l'Actine suivait la progression de la bicouche lipidique qui forme le sillon de clivage. Elle forme avec la Myosine (localisée à la pointe des sillons de clivage) un réseau dit hexagonal dont la contraction semble être l'élément moteur de la cellularisation (Warn and Magrath 1983; Schejter and Wieschaus 1993). Des protéines de structure comme la Spectrine βH relie le cytosquelette aux protéines d'adhésion qui jouent le rôle de « velcro » entre deux cellules voisines au cours de la cellularisation. D'autres gènes comme *nullo* ou plus récemment *flightless I* codant pour la Gelsoline sont importants pour le maintien du réseau d'Actine (Straub et al. 1996).

Bottleneck exprimé zygotiquement pendant la cellularisation est nécessaire quant à lui pour la constriction finale de la cellule (Schweisguth et al. 1990).

3.2/ La gastrulation :

La gastrulation correspond à la première manifestation du destin cellulaire et du programme de différenciation cellulaire au cours de la vie. Au début de ce processus, il est possible de faire une carte présomptive des destins cellulaires (figure 17). L'embryon est d'abord divisé en trois domaines présomptifs qui sont programmés pour donner des organes spécifiques : l'ectoderme donnera le système nerveux et l'épiderme, le mésoderme donnera les muscles, les tissus interstitiels et certains organes, enfin l'endoderme correspond au futur système digestif. Au cours de la gastrulation, la monocouche cellulaire formée après cellularisation va se mettre en mouvement pour former les trois feuillets embryonnaires.

Plusieurs types de mouvements cellulaires sont mis en place pendant la gastrulation comme l'invagination, l'extension convergente, l'épibolie et les repliements cellulaires. Ces mouvements cellulaires sont reproduits lors de la gastrulation de tous les animaux, mais du fait de la simplicité de l'embryon de drosophile, ils sont particulièrement faciles à suivre dans cet organisme. De plus, il est possible de pratiquer des mutations dans les gènes impliqués dans le processus de gastrulation, puis des analyses génétiques.

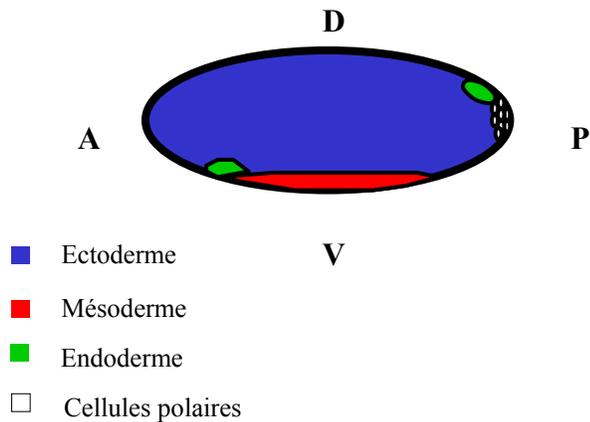


Figure 17 : Carte des domaines présomptifs.

Lors de la gastrulation de la drosophile, on distingue plusieurs étapes détaillées ci-dessous.

3.2.1/ Invagination du mésoderme et formation du sillon céphalique :

3.2.1.1/ Mécanisme cellulaire :

Dans un premier temps, 3 heures après la fertilisation, l'ensemble des cellules mésodermiques situées dans la partie ventrale de l'embryon vont s'invaginer sur 86 % de la longueur de l'embryon. Les cellules commencent par s'aplatir le long d'une ligne médiane, puis elles subissent une constriction et enfin s'invaginent pour former un tube ventral (figure 16). Le tube mésodermique va ensuite se désagréger et chaque cellule va se diviser et migrer le long de l'ectoderme pour former une couche unicellulaire (Jäckle 1993).

Dans le même temps, le sillon céphalique séparant la tête du reste du corps est formé. Tout d'abord, les noyaux des cellules migrent basalement, puis les cellules s'invaginent, entraînant avec elles leurs voisines. Le sillon s'approfondit pendant 45 minutes jusqu'à la fin de l'extension de la bandelette germinative. D'autres mécanismes sont mis en place plus tard et permettent aux cellules de participer à la formation de l'ectoderme.

3.2.1.2/ Mécanisme moléculaire :

L'invagination du mésoderme est sous la dépendance des gènes maternels impliqués dans la formation de l'axe dorso-ventral comme *dorsal*. La cascade de régulation faisant intervenir les gènes maternels induit l'expression des facteurs de transcription zygotiques *snail* et *twist*.

Snail est un répresseur de la transcription qui inhibe le devenir neuroectodermal des cellules ventrales. Lorsque Snail interagit avec Twist, un facteur de transcription à domaine bHLH, ils activent la transcription de *folded gastrulation* qui coordonne les changements de forme cellulaire et la répression de gènes susceptibles d'interférer avec l'invagination du mésoderme. Pour ce faire, *Folded gastrulation* active *Concertina* (une protéine G α) qui, par la voie Rho/RhoGEF2, module le réarrangement du réseau d'actine/myosine dans les cellules mésodermiques (Jäckle 1993).

3.2.2/ Extension de la bandelette germinative :

3.2.2.1/ Mécanisme cellulaire :

La bandelette germinative est composée des cellules neuroectodermiques dans la partie postérieure du sillon céphalique. Au cours de son extension, la bandelette germinative va s'allonger le long de l'axe antéro-postérieur, doubler sa longueur et diminuer sa largeur de deux fois. Ce phénomène commence 3 heures après la fécondation et comporte deux phases : une première phase rapide qui dure 30 minutes au bout desquelles la bandelette germinative s'est allongée sur 61% de la longueur de l'embryon et une phase lente où elle continue son élongation jusqu'à 73% de la longueur de l'embryon pendant 40 à 70 minutes. Au cours de cette période, le tube mésodermique précédemment formé suit l'élongation de la bandelette germinative (figure 16).

On distingue deux types de cellules impliquées dans l'extension de la bandelette germinative, les cellules épidermiques qui commencent à se diviser avant ce processus et arrêtent à la fin de la phase rapide et les cellules neurogéniques qui ne se divisent pas,

mais s'agrandissent. Seulement, ni la division des cellules ectodermiques, ni l'allongement des cellules neurogéniques n'expliquent complètement une telle extension. Il apparaît que la phase rapide de l'extension de la bandelette germinative est amorcée par une poussée des cellules dorsales de l'embryon sur le sillon céphalique, puis le phénomène d'intercalation cellulaire prend le relais. Au cours de ce processus, les cellules neurectodermiques les plus dorsales vont migrer entre leurs voisines ventrales (Irvine and Wieschaus 1994) (figure 18).

L'intercalation cellulaire est aussi mise en place plus tard au cours du développement de la drosophile, dans les disques imaginaux (Friston and Friston 1975) ou chez d'autres animaux comme le poisson-zébre ou le xénope durant l'extension convergente qui gouverne l'accumulation dorsale de cellules mésodermiques et ectodermiques dans la gastrula. Il en résulte une élongation de l'embryon le long de son axe antéro-postérieur (extension) et son raccourcissement dans le sens médio-latéral (convergence) et la création des axes embryonnaires (Keller et al. 2000).

Enfin, le rôle de l'extension de la bandelette germinative chez la drosophile n'est pas encore bien défini. Il pourrait s'agir d'augmenter rapidement le nombre de cellules le long de l'axe antéro-postérieur sans division cellulaire ou d'acheminer rapidement les cellules à une nouvelle localisation pour leur assigner un devenir cellulaire plus précis.

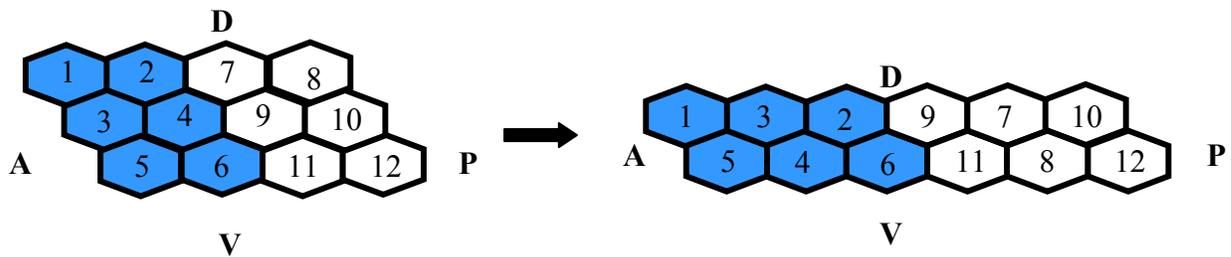


Figure 18 : Principe de l'intercalation cellulaire.

3.2.2.2/ Mécanisme moléculaire :

La triple mutation des gènes maternels *bicoid*, *nanos* et *torso like* qui enlèvent l'axe antéro-postérieur de l'embryon présentent un défaut de l'extension de la bandelette germinative. Il en est de même pour le mutant pour les quatre gènes « gap » *knirps*, *hunchback*, *forkhead* et *tailless* qui présente une réduction drastique de l'intercalation cellulaire au cours de ce processus. Enfin les gènes « pair-rule » *even-skipped* ou *runt* sont essentiels pour l'extension de la bandelette germinative (Irvine and Wieschaus 1994).

Une étude récente (Zallen and Wieschaus 2004) a montré que *slam*, *bazooka* et la *myosine II* présentent une polarité dans leur distribution au sein des cellules ectodermiques. En effet, avant le début de l'extension de la bandelette germinative, toutes les cellules expriment ces trois protéines tout autour de leur membrane. Au cours de l'intercalation cellulaire, Slam et la Myosine II sont concentrées le long des membranes perpendiculaires à l'axe antéro-postérieur de l'embryon. De même, Bazooka est localisé le long des membranes perpendiculaires à l'axe dorso-ventral de l'embryon. Ces trois protéines se trouvent dans la partie apicale des cellules, au niveau des jonctions adhérentes. Cette polarisation de Slam, Bazooka et de la Myosine II est totalement inhibée chez le triple mutant de gènes maternels, le quadruple mutant de gènes « gap » et les mutants *even-skipped*, et altérée chez les mutants *runt*.

Le modèle d'intercalation cellulaire d'Eric Wieschaus (Irvine and Wieschaus 1994) propose que l'expression en bandes des gènes « pair-rule » tels que *even-skipped* ou *runt* module la force d'adhésion des protéines de surface des cellules dans lesquels ils sont exprimés. Les cellules des bandes *even-skipped* et *runt* n'ont donc pas la même force d'adhésion et tendent à bouger et minimiser la surface de contact entre les cellules venant de bandes différentes. La segmentation semble donc indispensable à l'alternance de cellules de forces d'adhésion différentes. La différence entre les forces d'adhésions de 2 bandes adjacentes est importante pour l'intercalation cellulaire.

Il est possible que ce phénomène soit la conséquence de la polarité cellulaire de certaines protéines telles que Slam, Bazooka ou la Myosine II. En effet, leur niveau d'expression est encore plus intense au niveau des membranes qui touchent les cellules

exprimant un autre gène « pair rule » (figure 19). De plus, il a été montré que Bazooka influence la localisation apico-basale d'Armadillo, impliqué dans l'adhésion des cellules ectodermiques (Muller and Wieschaus 1996).

Un défaut de synthèse de la sérotonine ou d'expression du récepteur 5-HT2Dro conduit à un défaut d'intercalation cellulaire pendant l'extension de la bandelette germinative (chapitre 5).

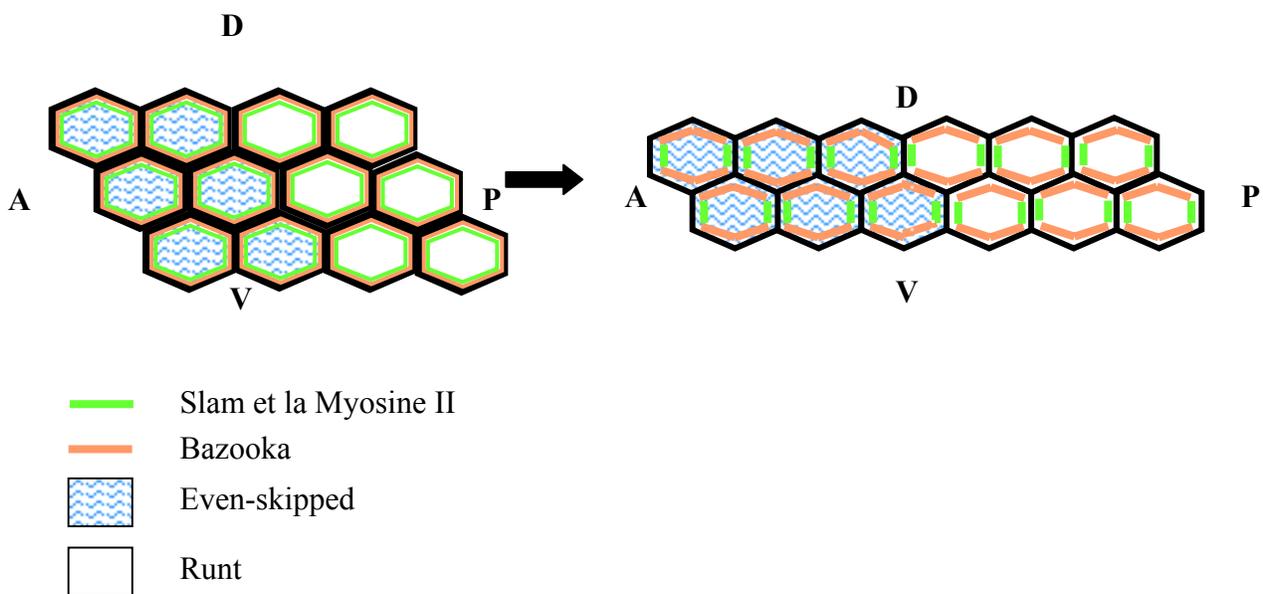


Figure 19 : Polarisation cellulaire de Slam, Bazooka et la Myosine II au cours de l'intercalation cellulaire.

3.2.3/ Rétraction de la bandelette germinative :

3.2.3.1/ Mécanisme cellulaire :

La rétraction de la bandelette germinative commence 7 heures 20 minutes après la fertilisation et dure 2 heures. Pendant ce processus, la partie caudale de la bandelette germinative étendue retourne dans la partie postérieure de l'embryon et s'élargie le long

de l'axe dorso-ventral. Les mécanismes cellulaires impliqués dans ce phénomène n'ont pas encore été bien étudiés. Il apparaît que les cellules n'inversent pas les mouvements subits pendant l'extension de la bandelette germinative, mais changent de forme et subissent des divisions cellulaires. De plus, les sillons ectodermiques délimitant les parasegments sont mis en place à cette étape

A la fin de la rétraction de la bandelette germinative, l'amnioséreuse, située initialement dans la partie dorsale de l'embryon, recouvre dorsalement tout le sac vitellin et se déplace sur les parties latérales de l'embryon. Dans un premier temps, elle semble jouer un rôle passif dans la rétraction de la bandelette germinative puis sa contraction permettrait de repousser les cellules de la bandelette germinative et la rétraction des derniers segments postérieurs de l'embryon (Schock and Perrimon 2003).

Enfin, l'ectoderme recouvre la partie dorsale de l'embryon : c'est la fermeture dorsale au cours de laquelle les sillons parasegmentaux disparaissent. Ainsi, le rôle des sillons des parasegments pourrait être comparable aux soufflets d'un accordéon, formant une réserve de cellules pendant la rétraction de la bandelette germinative et les restituant lors de la fermeture dorsale.

3.2.3.2/ Mécanisme moléculaire :

Il a été montré par R. Goldman-Lévi et ses collègues (1996) que la rétraction de la bandelette germinative dépend non seulement de sa propre activité, mais aussi de l'amnioséreuse (dans la partie dorsale de l'embryon). Les produits des gènes *u-shaped*, *serpent*, *hind sight* et *tail up* sont les composants d'au moins deux voies interdépendantes qui déterminent la différenciation ou le maintien de l'amnioséreuse ainsi que la rétraction de la bandelette germinative. Dans le même temps, la voie *Drosophila EGF receptor/faint little ball* est la seule voie impliquée directement et uniquement dans la rétraction de la bandelette germinative à ce moment (Clifford and Schupbach 1992).

L'action de l'amnioséreuse à la fin de la rétraction de la bandelette germinative semble impliquer les interactions intégrines/matrice extracellulaire et donc l'adhésion des cellules de l'amnioséreuse au sac vitellin sous-jacent (Schock and Perrimon 2003).

Chapitre 4

Mise en place de la cuticule de *Drosophila melanogaster*

Les arthropodes sont caractérisés par la présence d'un exosquelette sclérotique très dur chez l'adulte qui protège l'animal non seulement de son environnement mais aussi de la dessiccation. L'exosquelette est recouvert de soies qui donnent des informations sensorielles à l'animal. Au cours du développement embryonnaire, les cellules ectodermiques sécrètent une cuticule plus fine que chez l'adulte, facilitant les mouvements de la larve.

A ce stade, la cuticule a une structure particulière avec une alternance de denticules et de cuticule nue dans la partie ventrale de chaque segment (figure 20). Ces structures sont utilisées par les scientifiques comme des marqueurs indélébiles du destin des cellules ectodermiques et ont été largement employées pour mettre en évidence les gènes de segmentation (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la régulation de la formation de la cuticule larvaire au cours du développement embryonnaire de la drosophile.

1/ Composition et sécrétion de la cuticule larvaire :

1.1/ L'épiderme :

L'épiderme est constitué de cellules sécrétrices et organisé selon un modèle reproductible dans chaque segment de cellules de tailles et formes différentes. Dans la partie ventrale de chaque segment, il est possible de distinguer les 8 rangées de cellules produisant des denticules qui sont allongées sur l'axe dorso-ventral et paraissent ramassées sur le côté ventral de l'embryon alors que les 6 rangées de cellules qui forment de la cuticule nue sont plus larges et ont une forme régulière. Dans les parties latérales et dorsale de l'embryon, les cellules qui sécrètent des soies sensorielles présentent aussi un arrangement spécifique (Martinez-Arias 1993).

Une étude montre que les cellules épidermiques communiquent entre elles à l'intérieur d'un segment par l'intermédiaire des jonctions « gap ». Cette communication est restreinte au niveau des limites du segment (Ruangvoravat and Lo 1992). Ainsi, l'arrangement caractéristique des cellules au sein d'un segment semble être la conséquence d'échange d'informations de positions entre elles.

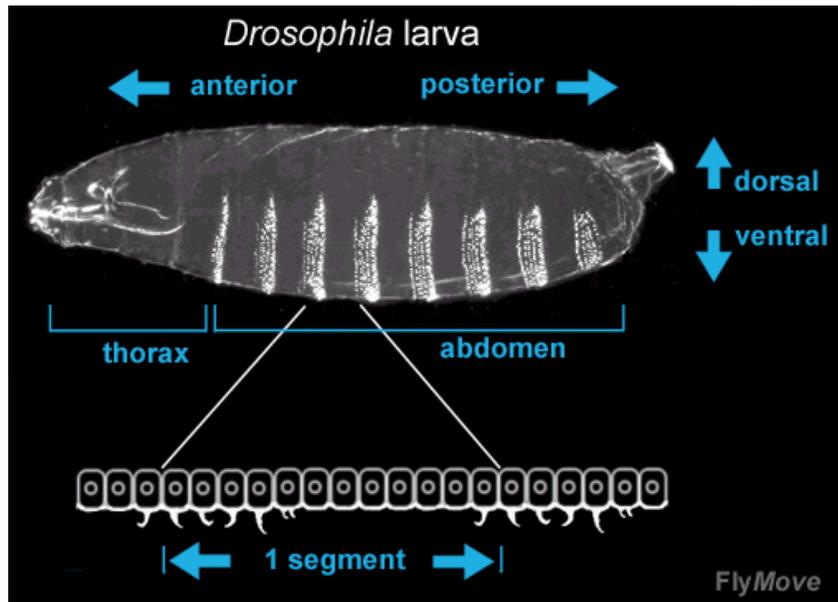


Figure 20 : Vue d'ensemble de la cuticule larvaire.

Dans la partie ventrale de la larve, on peut observer une alternance de denticules et de cuticule nue.

1.2/ Composition de la cuticule :

Comme chez tous les arthropodes, la structure et la composition biochimique de la cuticule de drosophile est spécifique de chaque stade de la vie de l'animal. A l'éclosion de la larve, la cuticule est formée de 3 couches : l'épicuticule externe composée de Cuticuline et d'hydro-carbones disposés en structure trilamellaire très fines (12-20 nm), une couche plus épaisse d'épicuticule (150-600 nm) (dite épicuticule interne) et enfin l'endocuticule. L'endocuticule est composée de polymères de β 1-4 N-actetyl-D-glucosamine interagissant avec des fibrilles de chitine. Ces complexes sont empaquetés dans une matrice protéique et lipidique (Cohen 1987) (figure 21).

La pigmentation et le durcissement de la cuticule larvaire au niveau des denticules impliquent le produit du gène *yellow* (Walter et al. 1991) ou la synthèse des catécholamines comme la mélatonine, produit de la dégradation de la dopamine et de la sérotonine. Des pics d'expression des enzymes de synthèse DTH, DTPH et *ddc* sont observés au moment des mues (chapitre 1).

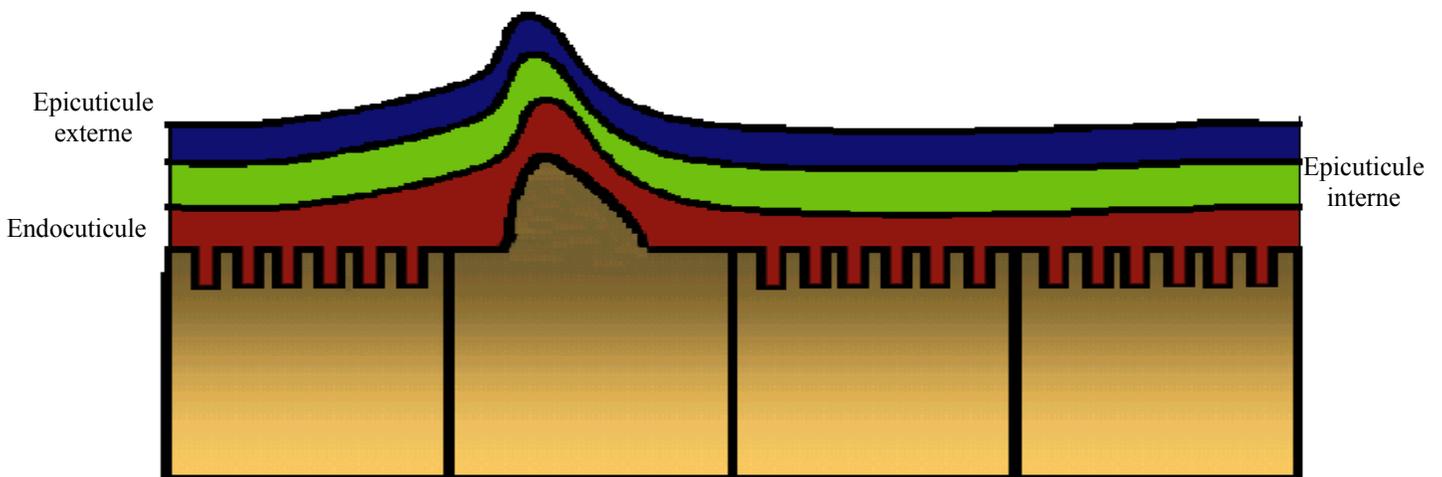


Figure 21 : Composition des différentes couches de la cuticule.

1.3/ Sécrétion de la cuticule larvaire :

1.3.1/ Sécrétion de la cuticule nue :

La sécrétion de la cuticule nue commence 12 heures après la fertilisation. Les protéines sont synthétisées par les cellules ectodermiques puis sécrétées. La membrane apicale des cellules ectodermiques forme d'abord des microvillosités et les cellules commencent à sécréter une double couche de cuticuline puis l'endocuticule 13 heures après la fécondation. Le processus de déposition continue jusqu'à 15 heures après la fertilisation, la cuticule s'épaissit et devient plus dense aux électrons. Puis la cuticule durcit et les microvillosités sur la membrane apicale des cellules ectodermiques disparaissent (Martinez-Arias 1993).

1.3.2/ Sécrétion des denticules :

La sécrétion des denticules est faite par certaines cellules ectodermiques et commence 14 heures après la fécondation. Dans un premier temps, le cytosquelette des cellules ectodermiques les plus antérieures de chaque segment subit un réarrangement et déforme la membrane apicale (Pesacreta et al. 1989). Ces cellules ne présentent pas de microvillosités mais un renflement de leur partie apicale qui devient dense aux électrons du fait de la sécrétion de la cuticule. Selon leur localisation antéro-postérieure, les cellules ont une polarité différente et forment des denticules de taille et d'orientation différentes. Environ 16 heures après la fécondation, on observe la rétraction de la membrane plasmique coïncidant avec la sécrétion d'une épicuticule épaisse et très dure.

1.4/ Formation des limites segmentaires :

Au cours de la gastrulation, on distingue successivement des parasegments puis des segments qui sont délimités par des sillons visibles transitoirement. La formation

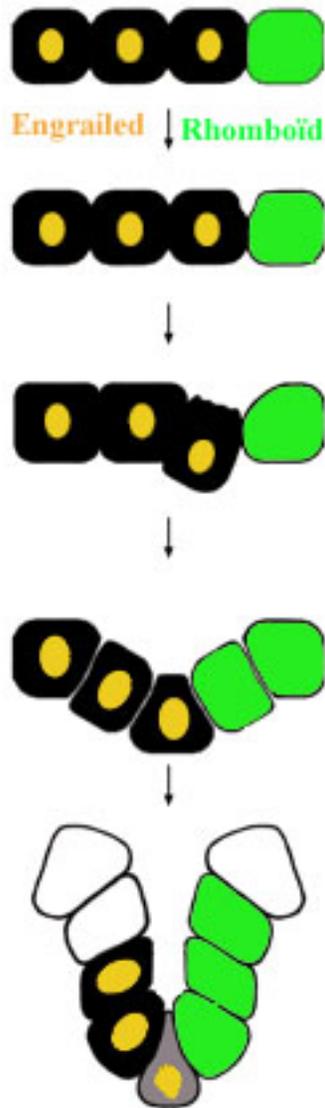


Figure 22 : Formation des sillons segmentaux (D'après Larsen et al. 2003)

des limites des parasegments commence au début de la rétraction de la bandelette germinative. Elles sont délimitées par des cellules qui expriment antérieurement au sillon le gène de polarité segmentaire *engrailed* et postérieurement *rhomboid*.

Dans un premier temps une incision est observée à la périphérie de l'embryon entre la cellule exprimant *Engrailed* et celle directement postérieure. Ce sont les cellules fondatrices de la frontière parasegmentale. Ces cellules fondatrices perdent alors leur adhérence dans la partie apicale et un sillon se forme entre elles. Les cellules antérieures à ce sillon commencent ensuite à migrer vers l'intérieur de l'embryon, entraînant avec elles les cellules voisines antérieures. La cellule exprimant *Engrailed* migre jusqu'à une profondeur comparable au diamètre de 3 cellules et reste en place jusqu'à la fin de l'extension de la bandelette germinative. Enfin, le sillon régresse jusqu'à disparaître (Larsen et al. 2003) (figure 22).

Ainsi, la formation des sillons des segments coïncide avec la rétraction de la bandelette germinative et leur régression avec la fermeture dorsale de l'épiderme. Il est donc possible que ces sillons soient une réserve de cellules comme un accordéon que l'on replie puis déplie (voir chapitre 3 paragraphe 3.2.3). La localisation antéro-postérieure de ces limites dépend des interactions entre certains gènes de polarité segmentaire et notamment *engrailed*, *hedgehog* et *wingless*.

2/ Les voies de signalisation impliquées dans la formation de la cuticule :

La détermination du destin de chaque cellule est importante pour l'alternance des denticules et de la cuticule nue dans la partie ventrale de l'embryon. Cette alternance dépend essentiellement de la régulation de 3 voies de signalisation : Wingless, Hedgehog et EGF.

2.1/ Les voies Wingless :

2.1.1/ Rôles de Wingless :

Wingless fait partie des gènes de polarité segmentaire et est exprimé pendant l'extension de la bandelette germinative en 14 bandes transversales dans l'ectoderme. A

ce stade, Wingless est nécessaire à la formation de la cuticule nue dans la partie postérieure de chaque segment. Ainsi, les embryons mutants dans le gène *wingless* présentent un phénotype cuticulaire caractéristique avec la partie ventrale de l'embryon entièrement couverte de denticules.

Chez la larve, Wingless joue aussi un rôle important pendant la détermination de la limite dorso-ventrale des disques imaginaux. En effet, le sélecteur dorsal *apterous* active la transcription de Wingless à la frontière entre les compartiments dorsal et ventral. Wingless est un morphogène à courte distance qui détermine le devenir ventral des cellules situées dans le compartiment opposé à celui d'*apterous* (Blair 1995).

Enfin, alors que la plupart des cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale, elles ont aussi, parfois, une polarité selon un axe schématiquement perpendiculaire à l'axe apico-basal. Cette seconde polarité, appelée polarité planaire, décrit l'orientation vectorielle d'une cellule épithéliale (Schweisguth 2004). Il a été montré que Frizzled, le récepteur de Wingless est important lors de la polarisation des cellules épithéliales.

Wingless est important dans la détermination des axes embryonnaires chez les vertébrés. Chez les mammifères, de nombreux cancers sont la conséquence de mutations dans les gènes de la voie Wingless.

2.1.2/ Nature de Wingless :

Les protéine Wints (Wnts) forment une famille de glycoprotéines très conservées pendant l'évolution. On compte 7 membres de cette famille chez la drosophile (*Wingless*, *Dwnt2*, *Dwnt3/5*, *Dwnt4*, *Dwnt6*, *Dwnt8* et *Dwnt10*) dont le plus étudié est *Wingless*.

Le gène *wingless* code pour une protéine riche en cystéine qui comprend un domaine N-terminal hydrophobe, caractéristique des séquences signal et peut être glycosilé (Rijsewijk et al. 1987).

Wingless comme les autres membres de la famille Wnt est sécrété par les cellules et active des récepteurs présents sur les cellules avoisinantes. Son domaine d'activation ne dépasse pas 4 ou 5 cellules autour de son lieu de sécrétion.

2.1.3/ Voie de la β -caténine :

Le rôle de Wingless au cours la formation de la cuticule nue de l'embryon implique une voie de signalisation qui a largement été étudiée. Cette voie de transduction est aussi impliquée lors de la formation de l'axe dorso-ventrale chez le xénope. En effet, l'injection de Wnt1 dans la partie ventrale de la zone marginale de l'embryon de xénope induit une duplication de l'axe dorso-ventral. Chez les mammifères, de nombreuses mutations dans les gènes des effecteurs de cette voie de signalisation conduisent à la formation de certains cancers.

Une fois Wingless sécrété, il se lie au récepteur à 7 domaines transmembranaires Frizzled (fz). Une étude récente (Tolwinski et al. 2003) a montré que la protéine transmembranaire Arrow (arr) interagit avec Frizzled en présence de Wingless (figure 23A). La voie de signalisation activée inhibe la dégradation d'Armadillo (arm), l'orthologue de la β -caténine chez la drosophile par l'intermédiaire de Dishevelled (dsh). Armadillo entre alors dans le noyau et se lie au facteur de transcription dTCF/LEF pour activer la transcription des gènes cibles.

En l'absence de Wingless, Armadillo est présent soit libre dans le cytoplasme, soit lié aux cadhérines au niveau des jonctions adhérentes. Un complexe protéique composé des 2 protéines chaperonnes APC et Axine permet le rapprochement puis la phosphorylation d'Armadillo par la kinase Zw3/GSK3 β (figure23A). Armadillo phosphorylé est reconnu par Slimb/ β Trep puis dégradé par le protéasome.

Longtemps, l'inhibition de Zw3/GSK3 β et l'accumulation subséquente d'Armadillo étaient considérées comme la conséquence directe de l'activation de la voie Wingless. Cependant, le mécanisme cellulaire inhibant Zw3/GSK3 β mis en place après activation de la voie Wingless n'est pas encore élucidé. Tolwinski et ses collègues (2003) ont montré que la voie Wingless n'agit pas directement sur l'activité de Zw3/GSK3 β mais plutôt sur la stabilité de l'Axine. En effet, il apparaît que l'activation du complexe Arrow-Frizzled par Wingless promouvoit la dégradation de l'Axine, elle ne joue plus alors son rôle essentiel de protéine chaperonne dans le complexe formé avec APC et Zw3/GSK3 β , la phosphorylation d'Armadillo puis sa dégradation ne sont plus effectuées.

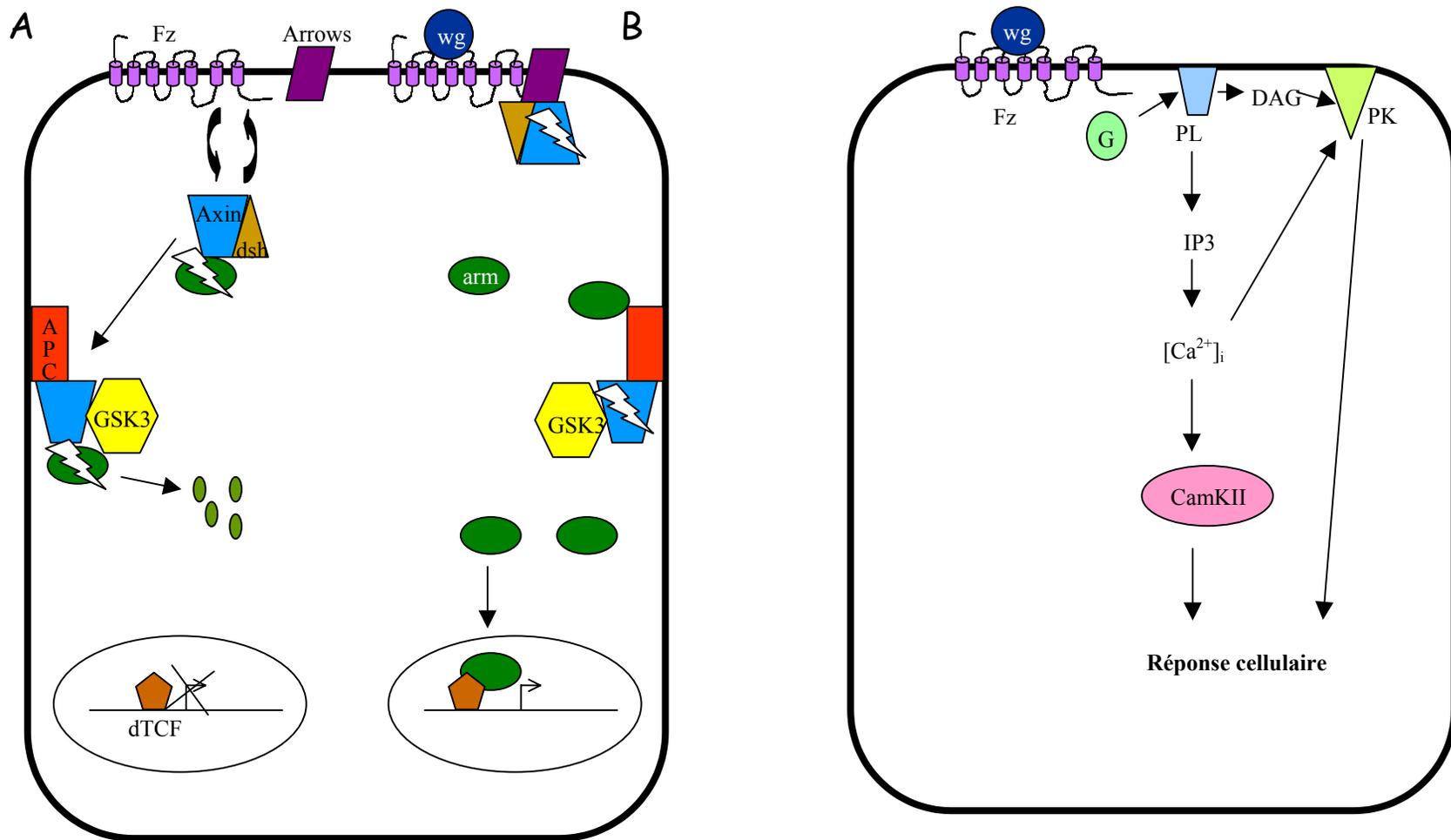


Figure 23: Voie Wingless des β-caténines (A), vois Wingless calcique (B).

2.1.4/ La voie calcique :

Dans certains cas, comme pendant les mouvements morphogénétiques de la gastrulation chez les xénope, Wingless active une voie de signalisation différente. Cette deuxième voie de transduction induit la libération de calcium du réticulum endoplasmique (Ault et al. 1996; Slusarski, Corces et al. 1997; Slusarski et al. 1997).

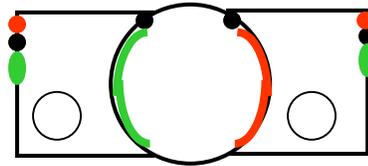
Après l'activation de Frizzled par Wingless, le récepteur semble activer directement ou indirectement des protéines $G\beta\gamma$ qui, par l'intermédiaire de la Phospholipase C vont induire la formation de diacylglycerol (DAG) et d'inositol-triphosphate (IP3). IP3 permet la libération du calcium intracellulaire stocké dans le réticulum endoplasmique qui va activer la kinase calmoduline dépendante de la concentration cytoplasmique du calcium (CamKII). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui, avec la coopération de l'activité de la CamKII induira la réponse cellulaire adéquate (figure 23B).

2.1.5/ Wingless et la polarité planaire :

Au cours de la puparaison, les cellules épidermiques subissent des divisions dans le plan de l'épithélium mais de manière aléatoire si on considère les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Cependant, sur le thorax, les cellules précurseurs des organes sensoriels (appelées pI) se divisent toujours parallèlement à l'axe antéro-postérieur pour donner une cellule pIIa postérieure et une cellule pIIb antérieure. Ces cellules vont alors se diviser à nouveau selon des axes définis et donner les cellules des organes sensoriels. Frizzled, le récepteur de Wingless, joue un rôle dans la polarisation de la cellule pI (Bellaïche et al. 2001).

La cellule pI contient un certain nombre de marqueurs qui sont localisés soit au niveau de la membrane antérieure comme Partner of inscuteable (Pins), Disc larged (Dlg), Numb ou Partner of Numb (Pon), soit à la membrane postérieure comme Bazooka, DaPKC ou DmPAR6.

A



B

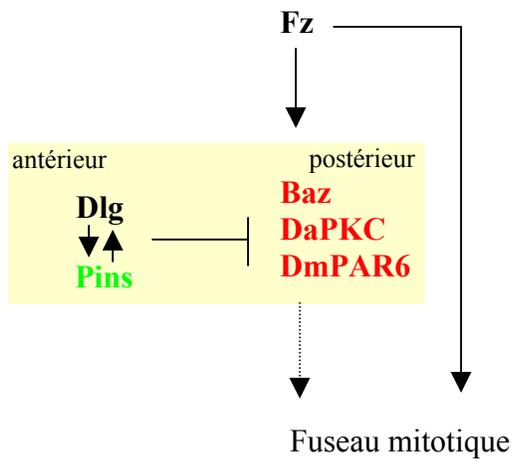


Figure 24 : Rôle de Frizzled dans la polarité planaire : (A) Polarité et localisation des complexes Dlg-Pins et Bazooka-DAPKC-DmPAR6, (B) Interactions moléculaires mises en place dans ce processus (Bellaïche et al. 2001).

Il a été montré par Y. Bellaïche et ses collègues (2001) que l'activation de Frizzled dans les cellules pI est non seulement indispensable à la localisation de Pins et Bazooka respectivement au niveau du cortex antérieur et postérieur mais aussi à l'orientation du fuseau mitotique le long de l'axe antéro-postérieur. La voie de signalisation impliquée est encore mal connue. Il apparaît cependant que Pins pourrait coopérer avec Frizzled et exclure Bazooka de la partie antérieure de la cellule. Comme Pins a la capacité de lier les protéines G α i qui sont aussi localisées au niveau du cortex antérieur, une hypothèse serait que l'action de Frizzled sur Pins soit faite via les protéines G (Bellaïche et al. 2001). Dans les mutants Frizzled, la localisation intracellulaire de Numb et Pon est diffuse le long de la membrane plasmique et le fuseau mitotique se place aléatoirement dans l'axe antéro-postérieur. Il apparaît donc que l'activation de Frizzled est importante pour la polarité des cellules pI (Bellaïche et al. 2001).

2.2/ Voie Hedgehog :

2.2.1/ Rôles de Hedgehog :

Chez la drosophile, Hedgehog fait partie des gènes de polarité segmentaire et est donc exprimé au cours de la gastrulation. Pendant cette période, il est exprimé à la frontière parasegmentale et est nécessaire au maintien de celle-ci en jouant le rôle de morphogène à courte distance. Plus tard, Hedgehog est exprimé dans le compartiment postérieur des disques imaginaux et est indispensable à la détermination de leur frontière antéro-postérieure. En effet, il active la transcription de Decapentaplegic (dpp) dans le compartiment antérieur des disques, qui relaiera alors le signal de Hedgehog sur une plus longue distance (Diaz-Benjumea and Cohen 1993).

Chez les mammifères, il existe 3 orthologues de Hedgehog. Sonic hedgehog est exprimé dans la notochorde où il est un inducteur du tube nerveux et des somites (Pourquie et al. 1993). Il est aussi impliqué dans le développement du cerveau et des membres (Chiang, Y. et al. 1996). Indian hedgehog régule la différenciation de la moelle osseuse pendant la croissance des os longs (Vortkamp et al. 1996). Enfin, Desert

hedgehog joue un rôle prédominant dans les lignées germinales, les cellules de Schwann et le système nerveux périphérique (Bitgood et al. 1996; Mirsky et al. 1999).

Chez l'Homme, plusieurs mutations situées dans les gènes de la voie de signalisation des molécules de la famille Hedgehog conduisent à des syndromes ou des tumeurs (Bale 2002).

2.2.2/ Structure de Hedgehog :

Le gène *hedgehog* code pour une protéine de 45 kDa qui subit plusieurs modifications post-traductionnelles. Hedgehog est d'abord clivé pour donner une partie C-terminale catalytique qui réalise l'autocatalyse de la protéine et une partie N-terminale qui exécute le rôle de morphogène. Une molécule de cholestérol puis d'acide palmitique sont attachées au domaine N-terminal de Hedgehog qui est alors dirigé vers la membrane plasmique (Porter et al. 1996; Pepinsky et al. 1998).

La partie N-terminale de Hedgehog reste liée à la membrane et agit sur les cellules voisines. De plus, plusieurs molécules peuvent se regrouper et donner des radeaux sur la bicouche lipidique qui seront libérés dans le milieu extérieur par Dispatched et pourront agir à plus longue distance (Burke et al. 1999).

2.2.3/ Voie de signalisation :

Smoothed (Smo), une protéine à 7 domaines transmembranaires présentant une très forte homologie avec Frizzled ne peut pas lier Hedgehog et est inhibée par la protéine à 12 domaines transmembranaires Patched (Ptc). Patched joue un rôle double en interagissant avec Hedgehog : il séquestre Hedgehog, limitant l'étendue de son domaine d'action et active la voie de transduction en levant l'inhibition de Smoothed (Ingham et al. 2000).

En l'absence de signal Hedgehog, Smoothed interagit directement avec Costal 2 (cos2), une protéine de la famille des Kinésines qui peut se lier aux microtubules (MT). Costal 2 interagit aussi avec la kinase Fused et le facteur de transcription Cubitus

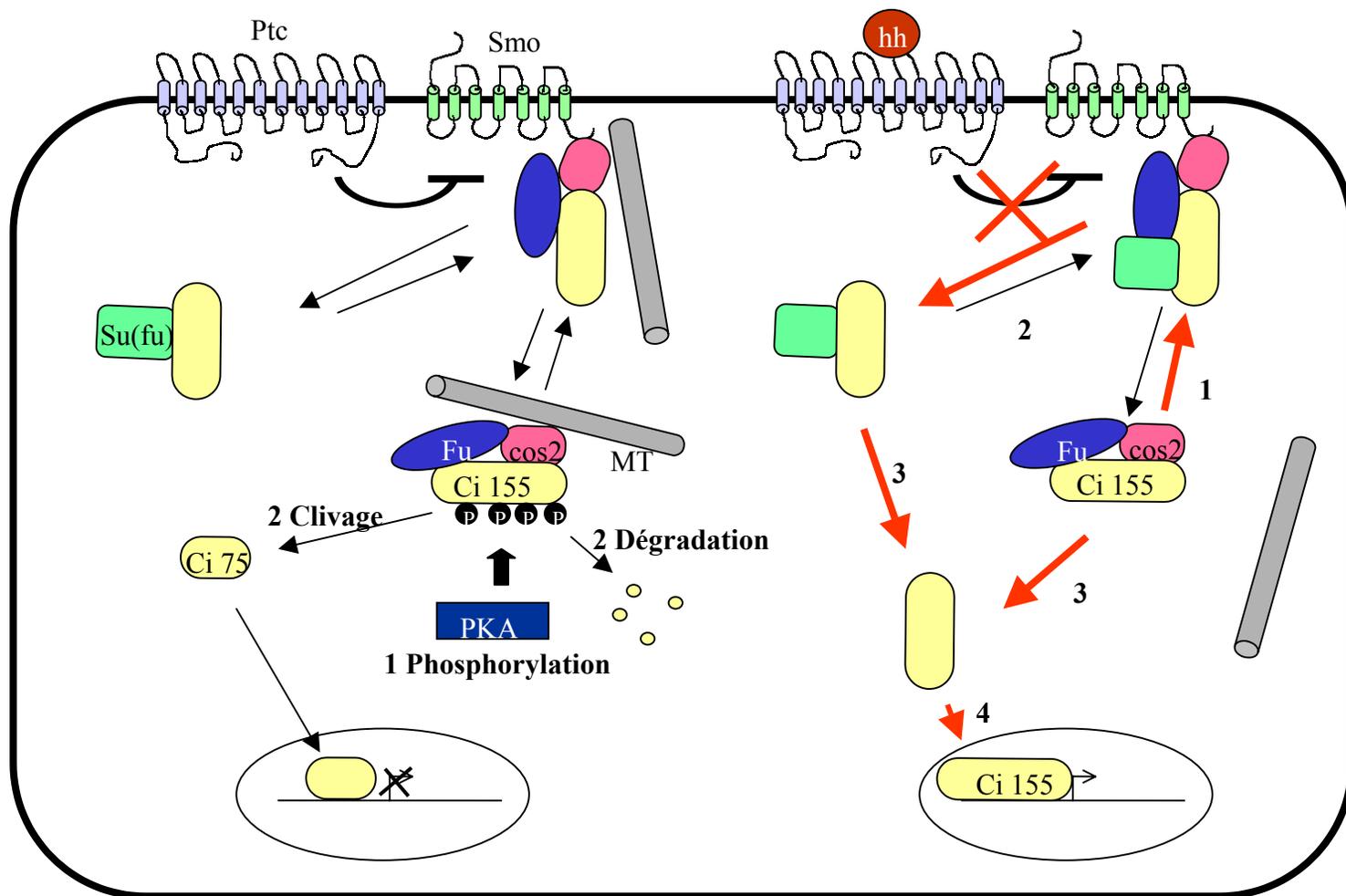


Figure 25 : Voie Hedgehog

interruptus (Ci) (figure 25). Ainsi, Costal 2, Fused et Cubitus interruptus forment un complexe qui est en équilibre entre sa forme liée avec Smoothened et les microtubules et sa forme cytoplasmique attachée aux seuls microtubules (Kalderon 2004). Lorsque le complexe est dans le cytoplasme, Cubitus interruptus, d'une taille de 155kDa, est phosphorylé par plusieurs kinases comme la Protéine kinase A (PKA), la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3) ou la Caséine kinase 1 (CK1). Ces phosphorylations sont nécessaires soit à la dégradation du facteur de transcription, soit à son clivage pour donner une forme tronquée de Cubitus interruptus de 75 kDa. La forme tronquée de Ci va alors entrer dans le noyau et inhiber la transcription des gènes cibles de Hedgehog comme *wingless*, *decapentaplegic* ou *patched*. La régulation de la quantité de Cubitus interruptus disponible dans le complexe formé par Costal 2 et Fused est réalisée à l'aide de son interaction avec Suppressor of fused (Su(fu)).

Après liaison de Hedgehog à son récepteur Patched, celui-ci lève son inhibition de Smoothened. Le complexe cytoplasmique formé par Costal 2, Fused et Cubitus interruptus lié à Smoothened va se interagir avec Suppressor of Fused et la formation de ce nouveau complexe permet la libération la forme entière de Cubitus interruptus (155kDa). Le facteur de transcription entre alors dans le noyau et active l'expression des gènes cibles. Lorsque le signal de Hedgehog est faible, Suppressor of Fused interagit encore avec Cubitus interruptus et limite son entrée dans le noyau alors que lorsque le signal est fort, Suppressor of fused phosphorylé joue le rôle de cargo et achemine directement la totalité des facteurs de transcription entiers dans le noyau (Kalderon 2004).

2.3/ Voie des « Epidermal Growth Factor » (EGF) :

2.3.1/ Rôles des EGF :

La grande diversité des ligands pour les récepteurs tyrosine kinase et les différentes voies de signalisation susceptibles d'être activées présupposent de la grande diversité des rôles des EGF. Ainsi, chez la drosophile, les voies EGF sont impliqués dans

la détermination précoce de l'axe dorso-ventral de l'embryon ou la formation des denticules au cours de la segmentation chez l'embryon (Golembo et al. 1996; Stevens 1998). Plus tard ils jouent un rôle prépondérant dans la formation des ommatidies et des soies mécanosensorielles (Zeidler et al. 2000; del Alamo et al. 2002).

Chez les vertébrés, les voies EGF sont largement impliquées dans la prolifération des tissus en développement ou tumoraux, mais aussi dans la détermination des destins cellulaires. Il a récemment été montré que l'activation de la voie JAK/STAT est nécessaire à l'extension convergente dans l'embryon de poisson zèbre (Yamashita et al. 2002).

La régulation du cycle cellulaire par les MAP kinases est très importante et les mutations qui affectent cette voie de signalisation conduisent à de nombreux cancers.

2.3.2/ Structure des EGF :

Les ligands des récepteurs EGF proviennent de plusieurs familles de molécules, parmi lesquelles on distingue la famille des EGF (comme Erb2 ou la Neureguline), des « Transforming growth factor α » (TGF α) (comme Spitz), ou des facteurs de croissance « Heparin-binding EGF-like » (HB-EGF).

Ces ligands sont des protéines transmembranaires qui sont clivées par des protéases et libérées dans le milieu extérieur. Leurs domaines extracellulaires contiennent une ou plusieurs régions riches en cystéines pouvant faire des ponts disulfures : les domaines de type EGF (Harris et al. 2003).

2.3.3/ Voie de signalisation des EGF :

Chez la drosophile, Spitz de la famille des TGF α est un des ligands privilégiés du récepteur tyrosine kinase « Drosophila EGF Receptor » (DER). Ces deux protéines sont exprimées ubiquitairement dans l'embryon de drosophile, cependant la protéine à sept domaines Rhomboïd (Rho) qui est responsable du clivage et de la libération de Spitz (Bang and Kintner 2000), est exprimé dans des régions précises de la partie ventrale de

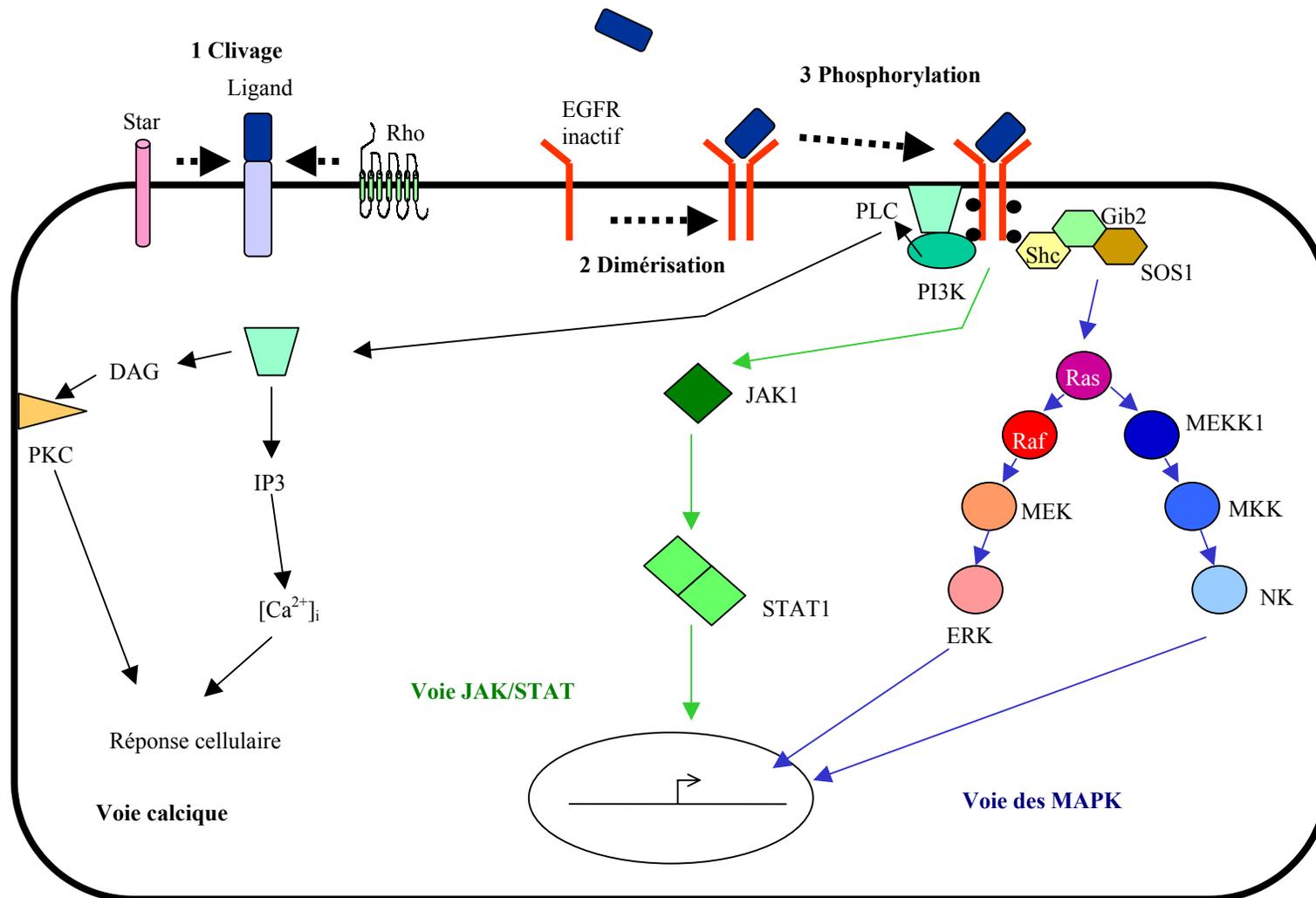


Figure 26 ; Voies EGF.

l'embryon. Spitz se lie à DER, active la dimérisation des récepteurs et les domaines tyrosine kinase intracytoplasmiques de chaque récepteur DER phosphorylent réciproquement la région intracellulaire du deuxième récepteur (figure 26).

L'activation de DER par Spitz conduit à l'activation de la voie des Ras/MAP kinases (figure 26) et à l'activation de la transcription des gènes cibles. Argos fait partie des gènes cibles, c'est une protéine sécrétée qui empêche la liaison de Spitz à DER. Argos se lie à DER et empêche sa dimérisation et sa phosphorylation (Jin et al. 2000). Il est donc impliqué dans une boucle de rétroaction qui régule l'activité de DER. Bien que la voie Ras/MAPK soit impliquée dans la formation des denticules, il existe d'autres voies de signalisation activées par les récepteurs tyrosine kinases.

Ainsi, certains ligands des récepteurs EGF peuvent activer la voie de la kinase JAK qui libère le facteur de transcription STAT3. D'autres activent la kinase IP3 qui va d'une part libérer le calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme, et d'autre part activer la protéine kinase C (figure 26).

Il est à noter que les facteurs de transcription des différentes voies de transduction activées par les récepteurs tyrosine kinases ont des structure différentes. Ils reconnaissent des sites de liaison à l'ADN différents et donc activent la transcription de gènes cibles spécifiques. Ce qui explique la diversité des rôles des facteurs de croissance.

3/ Détermination des structures cuticulaires dans un segment :

Dans le chapitre 3 nous avons vu qu'une cascade de protéines est mise en place pour déterminer la segmentation de l'embryon de drosophile. De même, plusieurs voies de signalisation (Wingless, Hedgehog, EGF, Notch) sont mises en place dans la partie ventrale de chaque segment et déterminent la polarité antéro-postérieure de ceux-ci. L'étude de la disposition et de l'action réciproque de ces différentes voies est un bon modèle pour comprendre le rôle et les interactions des morphogènes au cours du développement embryonnaire.

3.1/ Mise en place des voies de signalisation :

Peu après la cellularisation, les gènes de polarité segmentaire *wingless* et *engrailed* sont exprimés et délimitent les frontières parasegmentales antérieure et postérieure respectivement. Au début de l'extension de la bandelette germinative (stade 9-10 (Campos-Ortega and Hartenstein 1997)), ces deux gènes contrôlent mutuellement leur expression dans les cellules voisines. Wingless agit directement alors que Engrailed active la transcription de Hedgehog qui joue alors le rôle de médiateur (DiNardo et al. 1994) (stade 9-10 sur la figure 27).

A la fin de l'extension de la bandelette germinative (stade 11) l'expression de chaque gène de polarité segmentaire devient indépendante. Les gènes homéotiques commencent à activer la transcription de Serrate (ligand de Notch) dans les cellules n'exprimant ni Wingless ni Engrailed (Wiellette and McGinnis 1999). La répression de l'expression de Serrate dépend antérieurement de Hedgehog et postérieurement de Wingless (Alexandre et al. 1999) (figure 27).

Au début de la rétraction de la bandelette germinative (stade 12), les gènes homéotiques stimulent l'expression de Rhomboïd (Szuts et al. 1997). Les frontières du domaine d'expression de Rhomboïd sont par la suite affinées par l'action de Serrate, Hedgehog et Wingless (Alexandre et al. 1999; Gritzan et al. 1999; Sanson et al. 1999).

Enfin, à la fin de l'embryogenèse, il apparaît que les cellules qui sont sous la dépendance de Wingless sécrètent de la cuticule nue, dans la partie postérieure de chaque segment. En revanche, les cellules influencées par le gradient de Spitz sécrètent des denticules. La mise en place de cette alternance entre cuticule nue et denticules est donc étroitement régulée (figure 27).

3.2/ Wingless, Hedgehog et Spitz secrétés, forment des gradients:

A la fin de la rétraction de la bandelette germinative (fin du stade 12), le domaine ventral de chaque segment est subdivisé, plusieurs molécules sont secrétées dans le milieu extérieur et forment des gradients.

Au stade 10, lorsque les expressions de Wingless et de Engrailed sont mutuellement régulées par une boucle de rétrocontrôle, Wingless est exprimé selon un gradient extracellulaire symétrique. Cependant, lorsque l'expression des 2 protéines commence à être indépendante l'une de l'autre, la distribution de Wingless devient asymétrique et ne couvre plus les cellules Engrailed (Bejsovec et al. 1991 ; Heemskerk et al. 1991). Il semble que cette asymétrie soit due à une forte dégradation de Wingless au niveau des cellules qui lui sont postérieures (Dubois et al. 2001).

Le deuxième gradient impliqué dans la détermination ventrale de la cuticule est Hedgehog qui a la capacité d'agir à longue distance (plus de 3 cellules) de chaque côté de son domaine d'expression. Il peut ainsi réprimer la transcription de Serrate postérieurement. Cependant dans la partie antérieure à son domaine d'expression, Hedgehog n'a pas d'effet et semble être bloqué par l'action de Wingless (Piepenburg et al. 2000).

Enfin le clivage de Spitz par Rhomboid induit la formation d'un gradient symétrique du ligand de DER (O'Keefe et al. 1997). Ce gradient agit à courte distance et est impliqué dans la détermination des denticules au niveau de l'ectoderme ventral.

3.3/ Détermination de la cuticule nue et des denticules :

Dans la partie ventrale de l'embryon de drosophile, on distingue 2 types de cuticules : les denticules, nécessaires au déplacement de la larve dans la partie antérieure de chaque segment, et la cuticule nue dans la partie postérieure.

Il a été montré par Payre et ses collègues (1999) que l'expression du facteur de transcription *shaven-baby* (*svb*) est nécessaire et suffisante à la formation des denticules.

L'expression de *shaven-baby* peut être activée par la stimulation du récepteur tyrosine kinase DER. En effet, lorsqu'il est ubiquitairement activé, DER induit la transcription de *shaven-baby* dans toute la partie ventrale de l'embryon qui est alors recouverte de denticules. De plus, dans les embryons sauvages, le domaine d'expression de *shaven-baby* coïncide avec le gradient de Spitz. Cependant aucune preuve ne montre que la stimulation de la voie EGF est la seule voie nécessaire à l'activation de la transcription de *shaven-baby*.

De même, lorsque Wingless est ubiquitairement exprimé, l'expression de *shaven-baby* est réprimée dans toute la partie ventrale de l'embryon qui est alors constituée de cuticule nue. Si Wingless est réprimé, la transcription de *shaven-baby* est alors ubiquitaire et conduit à la formation de denticules. Wingless est donc capable de réprimer directement l'expression de *shaven-baby* dans les cellules ectodermiques ventrales (Payre et al. 1999).

Les gradients de Wingless et de Spitz sont chevauchants et mutuellement exclusifs, ils régulent l'expression de *shaven-baby* qui induit la formation des denticules dans la partie ventrale de la cuticule. Cependant, il a récemment été montré que l'activation du récepteur tyrosine kinase DER par de faibles quantités de Spitz est nécessaire à la survie des cellules qui forment de la cuticule nue (Urban et al. 2004). Ainsi Spitz est nécessaire tout au long de son gradient même en présence de fortes concentrations de Wingless. Certaines études suggèrent un rôle similaire de Wingless dans la partie formant des denticules mais aucune preuve directe n'a encore été apportée (Pazdera et al. 1998).

Chapitre 5

Rôle du récepteur 5-HT2Dro au cours de la gastrulation chez la drosophile

Chez la drosophile, la sérotonine est synthétisée dans le système nerveux central où elle contrôle notamment la prise de nourriture, l'apprentissage ou l'activité locomotrice et agit sur la croissance des neurones pendant le développement du cerveau. Elle circule aussi dans tout le corps grâce à l'hémolymphe et est impliquée dans la sécrétion de la salive par les glandes salivaires, la libération de certaines hormones, l'excitation cardiaque ou la modulation des jonctions neuromusculaires (Neckameyer and Leal 2002). A ce jour, on décompte 4 récepteurs de la sérotonine chez la drosophile 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT7Dro et 5-HT2Dro.

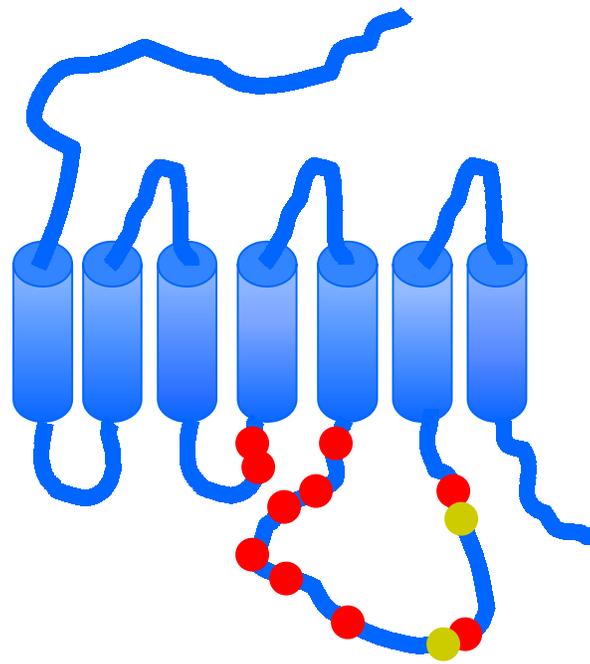
Le récepteur 5-HT2Dro, cloné au laboratoire est l'orthologue des récepteurs 5-HT2 des mammifères et présente des propriétés pharmacologiques plus proches de celles du récepteurs 5-HT2B par rapport aux autres récepteurs 5-HT2 (Colas et al. 1997).

1/ Structure du récepteur 5-HT2Dro :

Comme les autres récepteurs de la sérotonine, le récepteur 5-HT2Dro est un récepteur couplé aux protéines G. Il présente un très long domaine N-terminal (282 acides aminés) et ainsi qu'une grande troisième boucle intra-cytoplasmique (300 acides aminés) et un domaine C-terminal court (30 acides aminés). Les parties intracellulaires du récepteur ne présentent pas de domaine de liaison protéine-protéine connu, en revanche plusieurs sites de phosphorylation de la PKC et la PKA sont situés dans la deuxième et la troisième boucles intracellulaires (Colas et al. 1995) (figure 28 et chapitre 2).

2/ Expression du 5-HT2Dro :

Le récepteur 5-HT2Dro est non seulement présent dans le système nerveux central de la drosophile adulte, mais aussi chez l'embryon au début de la gastrulation, 3 heures après la fécondation alors qu'aucune cellule n'est encore différenciée. Chez l'embryon sauvage, il est uniquement exprimé dans l'ectoderme et présente un domaine d'expression identique à celui du gène « pair rule » *fushi tarazu* avec 7 bandes transversales le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (figure 29). Il existe un



- Site présumptif de phosphorylation par la PKC
- Site présumptif de phosphorylation par la PKA

Figure 28 : Structure du récepteur 5-HT2Dro.

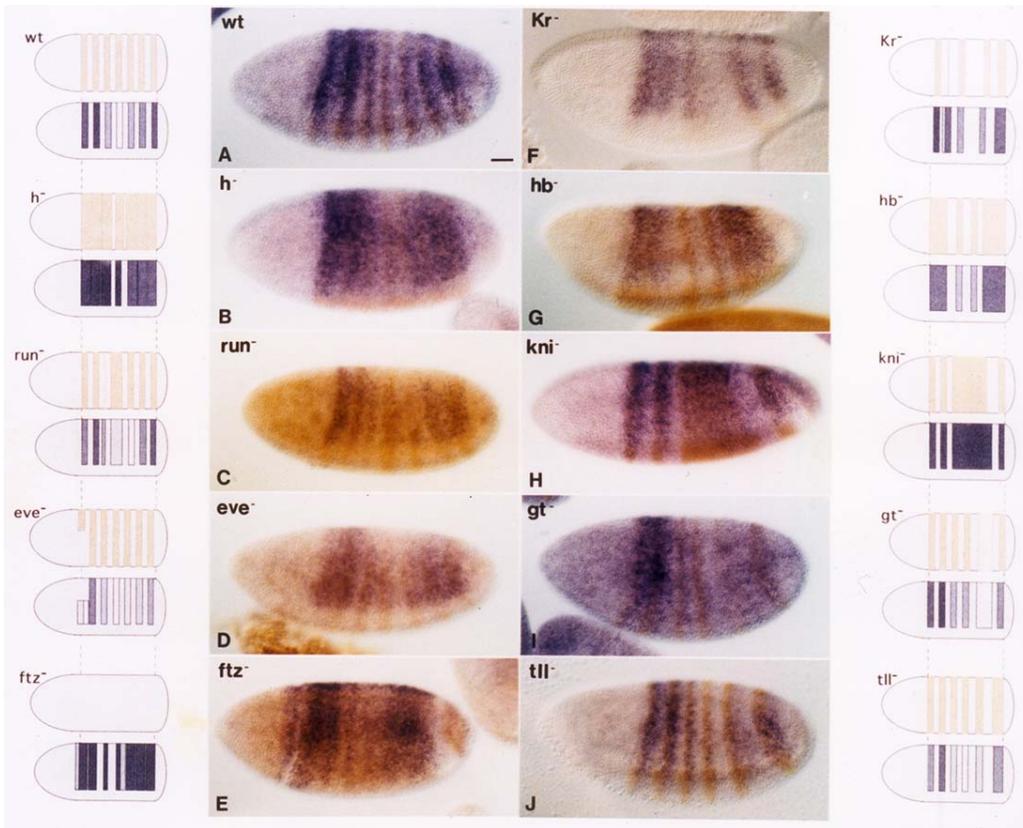


Figure 29 : Expression du récepteur 5-HT2Dro dans un embryon sauvage et différents mutants pour les gènes de segmentation (Colas, Launay et al. 1995).

gradient d'intensité de l'expression du récepteur 5-HT2Dro décroissant entre les bandes 1 et 4 et croissant entre les bandes 4 et 7 (figure 29). Ainsi, au niveau de la quatrième bande, l'expression du récepteur 5-HT2Dro est très faible alors qu'au niveau de la première et de la septième bande, le niveau d'expression du récepteur est importante (Colas et al. 1995).

De plus, l'hybridation *in situ* avec une sonde ARNm pour le récepteur 5-HT2Dro sur des embryons mutants pour des gènes « gap » ou « pair rule » montre que l'expression du récepteur dépend de la combinaison de l'ensemble de ces gènes mais pas des gènes de polarité segmentaire (Colas et al. 1995).

Il est important de noter que les embryons mutants pour le gène « gap » *knirps* présentent une forte augmentation de l'expression du gène du récepteur 5-HT2Dro au niveau des bandes 4 et 5 normalement très faiblement exprimées. En revanche, les mutants pour les gènes « pair rule » *runt* et *even-skipped* n'expriment que les bandes du récepteur 5-HT2Dro situées aux extrémités de l'embryon (Colas et al. 1995) (figure 29).

3/ Etude d'une souche déficiente dans la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro :

3.1/ Localisation de la déficience :

Le gène du récepteur 5-HT2Dro est situé sur le troisième chromosome de la drosophile, dans la région 82C5. Une souche contenant une déficience de petite taille de 55 kilobases a été créée au laboratoire par Jean François Colas et appelée Df(3R)HTRI. La souche Df(3R)HTRI contenant une déficience qui enlève le gène du récepteur 5-HT2Dro est embryonnaire létale à l'état homozygote et présente un phénotype caractéristique (voir ci-après). En revanche, la souche déficiente Df(3R)HTR6 qui se trouve dans la même région chromosomique mais n'enlève pas le gène du récepteur 5-HT2Dro ne présente pas le même phénotype que la souche Df(3R)HTRI. Il en est de même de 2 insertions de transposon qui n'affectent pas l'expression du récepteur dans la région couverte par Df(3R)HTRI mais pas Df(3R)HTR6 (Colas et al. 1999) (figure 30).

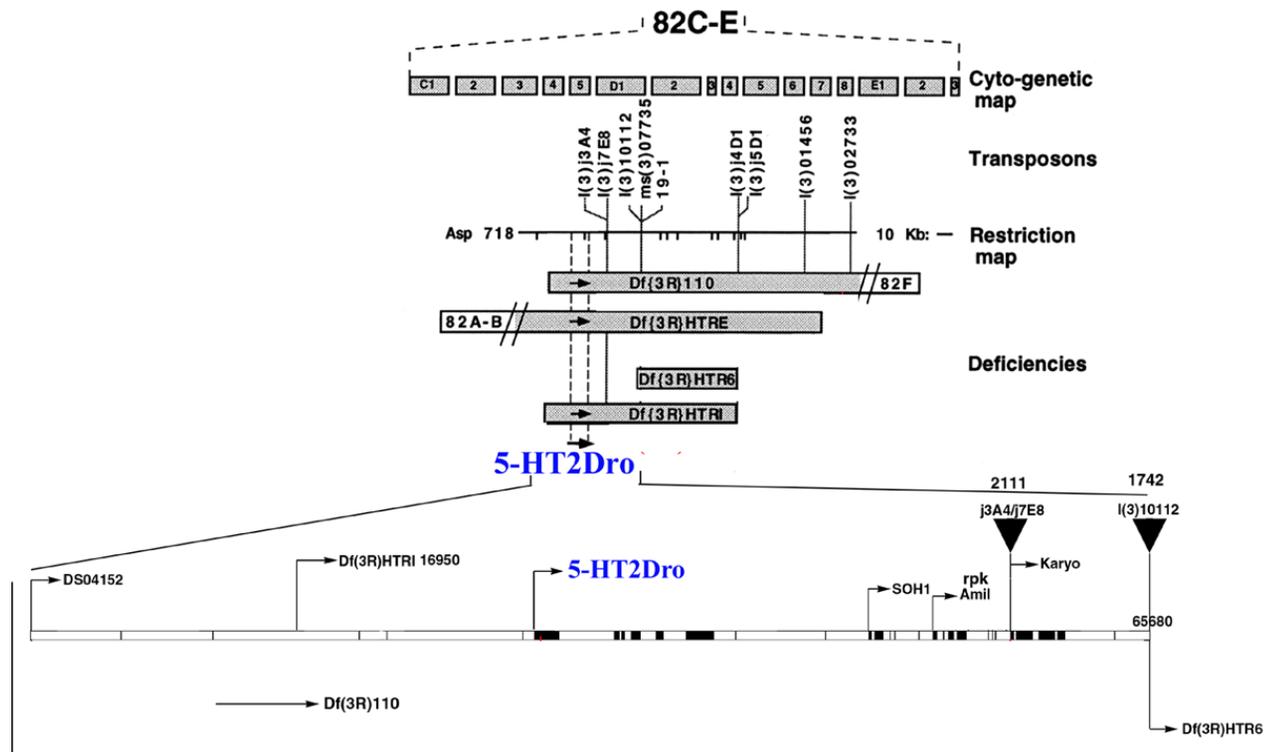


Figure 30 : Région chromosomique du récepteur 5-HT2Dro (Colas, Launay et al. 1999).

3.2/ Défaut de gastrulation observé dans les embryons homozygotes pour

Df(3R)HTRI :

L'enregistrement par video-microscopie de la gastrulation d'embryons homozygotes pour la déficience Df(3R)HTRI et d'embryons sauvages montre que les embryons mutants présentent un défaut de gastrulation. En effet, sur la figure 31, si on observe les cellules polaires situées à l'extrémité postérieure de l'embryon, on remarque que même si leur migration commence en même temps dans les 2 embryons, elles atteignent plus lentement la partie dorsale du sillon céphalique chez les embryons homozygotes déficients. Une technique, mise au point par Jean-Luc Vonesch au laboratoire, nous permet de suivre le mouvement de chaque cellule à la surface de l'embryon au cours de la gastrulation et de mesurer leurs vitesses (figure 32) (explication de la technique dans le matériel et méthodes section 2.4.2). Chez l'embryon sauvage, l'invagination des cellules mésodermiques est visualisée par la contraction des cellules sur la figure 32. Ce moment est considéré comme le temps $t=0$ minute. Après cette étape, les cellules observées sur les enregistrements vidéos sont toutes des cellules ectodermiques proches de la ligne médiane qui subissent l'intercalation cellulaire et bougent de la partie dorsale vers la partie ventrale. On distingue aussi les cellules polaires (PC) et le sillon céphalique (cf).

Chez les embryons homozygotes pour Df(3R)HTRI, l'invagination des cellules mésodermiques se fait correctement. Cependant la migration des cellules ectodermiques est plus lente (pentes plus fortes), les cellules polaires s'invaginent plus tard que chez les embryons mutants et arrêtent leur migration précocement. Toutes ces observations montrent que chez les embryons mutants pour le récepteur 5-HT2Dro, la poussée dorsale qui initie l'extension de la bandelette germinative n'est pas correctement relayée par l'intercalation cellulaire (Colas et al. 1999).

D'après le modèle d'Irvine et Wieschaus (1994) décrit dans le chapitre 3 section 3.2.2, l'intercalation cellulaire dépend de la segmentation de l'embryon qui permet une alternance des forces d'adhésion entre deux segments. Armadillo (orthologue de la β caténine chez la drosophile) est localisée à la membrane apicale des cellules ectodermiques dans un embryon sauvage. L'observation de la localisation intracellulaire

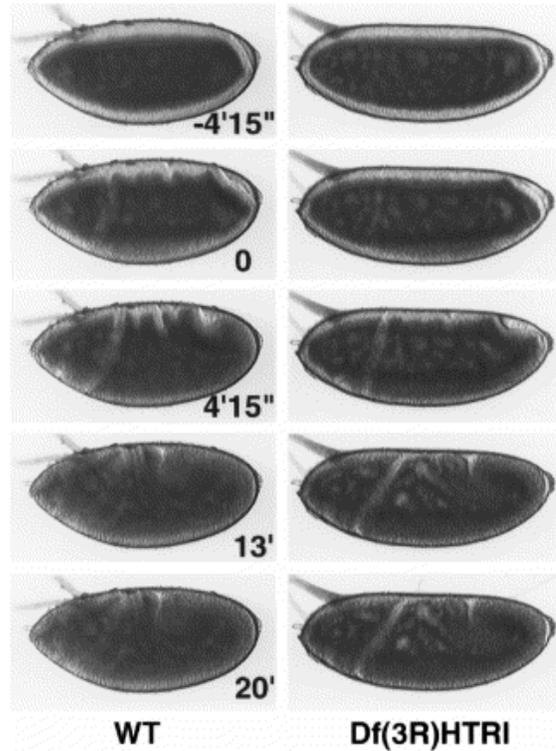


Figure 31 : Chronologie de la gastrulation d'embryons sauvages et déficients (Colas et al. 1999). Partie antérieure vers la gauche et dorsale vers le haut.

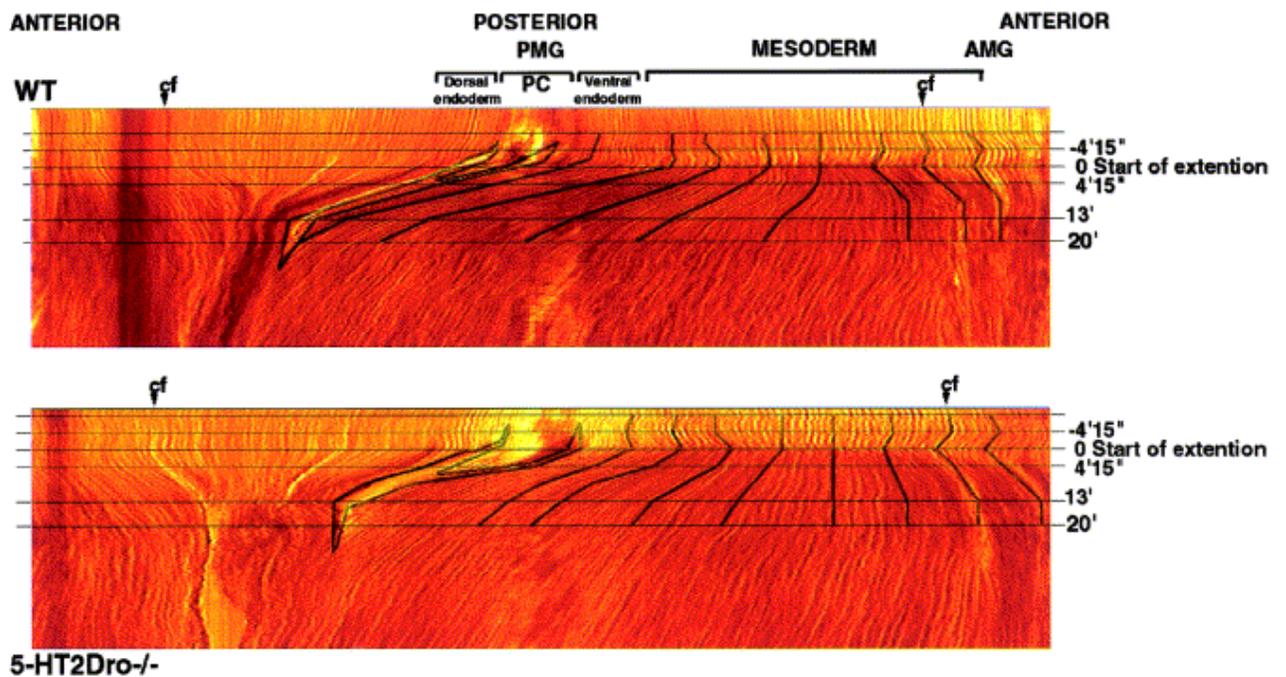


Figure 32 : Etude d'enregistrements vidéo pendant la gastrulation d'embryons sauvages et déficients (Colas et al. 1999).

de cette protéine à l'aide d'un microscope confocal dans les embryons déficients a montré que la localisation d'Armado est non seulement apicale mais s'étend aussi le long des membranes latérales des cellules dans les embryons homozygotes déficients. Armado joue un rôle dans la régulation des forces d'adhésion des cadhérines. La mauvaise localisation apico-basale d'Armado dans les cellules ectodermiques des embryons mutants peut entraîner une mauvaise localisation des DE cadhérines dans les cellules et/ou une modification de leurs forces d'adhésion et expliquer le défaut de gastrulation des embryons déficients (Colas et al. 1999).

3.3/ Phénotype cuticulaire de la souche Df(3R)HTRI :

La cuticule des embryons de drosophile reflète non seulement les défauts de segmentation mais aussi certains défauts de gastrulation. Les embryons homozygotes pour la déficience Df(3R)HTRI meurent au cours du développement précoce ou au début du premier stade larvaire (petites larves voir figure 31). L'observation de la cuticule des embryons non éclos 48 heures après la ponte révèle des phénotypes appelés « double ligne » et « fantôme ». Le phénotype « double ligne » est caractérisé par la présence de seulement 2 rangées de denticules dans chaque segment de l'embryon au lieu de 7 chez un embryon sauvage. Certains embryons présentent un autre phénotype cuticulaire, appelé « fantôme », sans denticules dans la partie ventrale de l'embryon et avec un trou dans la partie dorsale de l'embryon reflétant un défaut de fermeture dorsale. Ces phénotypes sont aussi observés dans les mutants *Punch* maternels et les mutants *shotgun* qui codent pour les DE cadhérines (Colas et al. 1999). Le gène *Punch* code pour la GTP cyclohydrolase 1 qui permet la production de tetrahydrobioptérine (BH4) co-facteur de la tryptophane hydroxylase. Les mutants *Punch* ne synthétisent pas de sérotonine. Les phénotypes cuticulaires des embryons homozygotes pour la souche Df(3R)HTRI sont aussi observés dans une souche transgénique exprimant l'ARNm antisens du gène du récepteur 5-HT2Dro. Cependant, les embryons homozygotes pour la déficience Df(3R)HTR6 qui n'enlève pas le gène du récepteur 5-HT2Dro ne présente pas ce phénotype cuticulaire (Colas et al. 1999).

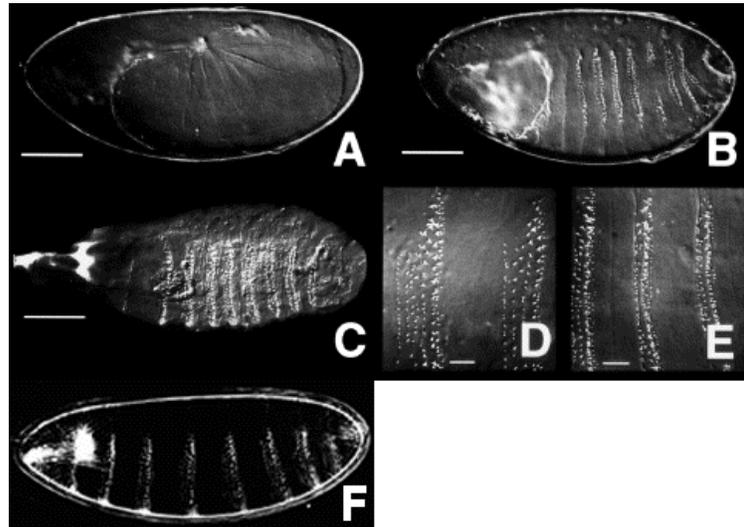


Figure 33 : Phénotypes cuticulaires des embryons homozygotes Df(3R)HTRI (D'après (Colas, Launay et al. 1999)). (A) Embryon fantôme sans denticules. (B) Embryon « double ligne » avec 2 rangées de denticules dans chaque segment (gros plan en E) au lieu de 7 chez un embryon sauvage (F et gros plan D). (C) Petite larve qui meurt peu après son éclosion.

4/ Etude d'une souche transgénique Krüppel-Gal 4 / UAS-5-HT2Dro :

Une souche transgénique Krüppel-Gal 4 / UAS-5-HT2Dro (dite Kr-5-HT2Dro) qui permet la surexpression du récepteur 5-HT2Dro dans la partie centrale de l'embryon où il est normalement peu exprimé a été créée au laboratoire. Cette souche est viable, mais les embryons Kr-5-HT2Dro qui subissent un choc thermique au début de la gastrulation meurent au cours du développement embryonnaire. Ce phénotype est expliqué par le retard engendré par le choc thermique qui désorganise la gastrulation. Les embryons Kr-5-HT2Dro ne peuvent pas rattraper ce retard, alors que les embryons sauvages ont cette capacité. L'étude d'enregistrements vidéo d'embryons Kr-5-HT2Dro montre que les cellules ectodermiques antérieures et postérieures ne commencent pas leur migration en même temps et bougent plus tard que chez un embryon sauvage (figures 34 et 35). De plus la figure 35 montre que après avoir initié leur mouvement, les cellules migrent rapidement et compensent leur retard. En résumé, la souche viable Kr-5-HT2Dro subit une mauvaise coordination de l'extension de la bandelette germinative avec une inhibition locale des mouvements de l'ectoderme (Colas et al. 1999).

Pour conclure, ces études ont montré que le manque ou la surexpression de récepteur 5-HT2Dro au début du développement embryonnaire conduisent à la mauvaise intercalation des cellules ectodermiques au cours de la gastrulation. Ces défauts sont accompagnés d'une mauvaise distribution cellulaire des jonctions adhérentes et de défauts cuticulaires caractéristiques (« fantôme » ou « double ligne »). Cependant, la souche Df(3R)HTRI étudiée n'enlève pas seulement le gène du récepteur 5-HT2Dro mais aussi 6 autres gènes. Bien que ces derniers ne semblent pas être exprimés au cours du développement embryonnaire de la drosophile, on ne peut exclure un rôle de ces gènes dans la gastrulation.

Lors de mon travail de thèse, l'étude d'un mutant ponctuel dans le gène du récepteur 5-HT2Dro a permis de confirmer le rôle prépondérant du récepteur et de la sérotonine lors de la gastrulation de la drosophile.

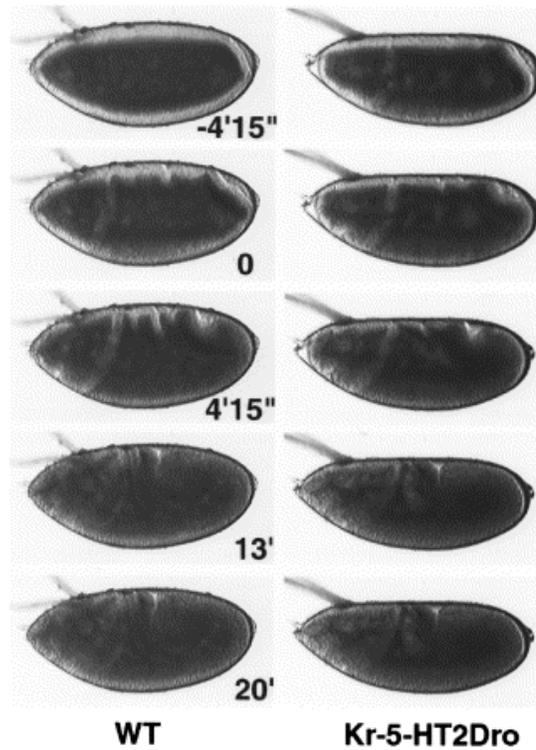


Figure 34 : Chronologie de la gastrulation d'embryons sauvages et Kr-5-HT2Dro (colas 1999) Partie antérieure vers la gauche et dorsale vers le haut.

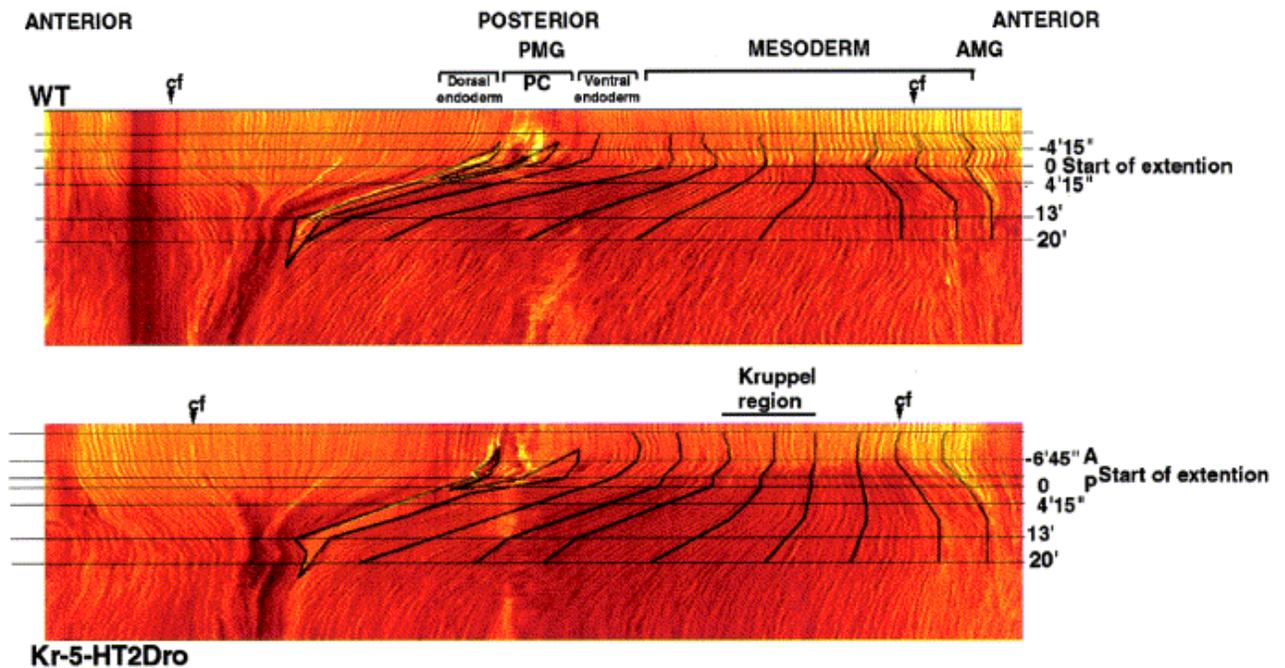


Figure 35 : Etude d'enregistrements vidéo pendant la gastrulation d'embryons sauvages et Kr-5-HT2Dro (colas 1999).

MATERIEL ET METHODES

1/ ETUDES GÉNÉTIQUES :	104
1.1/ Principe du chromosome balancier	104
1.2/ Mise en évidence de mutants létaux dans la région chromosomique de 5-HT2Dro :	105
1.3/ Nettoyage du chromosome 3 :	106
1.4/ Recombinaison entre un mutant hairy et le mutant dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :	109
1.5/ Recombinaison dans la partie distale du bras droit du chromosome I(3R)4830 :	109
1.6/ Localisation de la mutation sur la bras gauche du chromosome 3 :	110
2/ ETUDE DU PHÉNOTYPE EMBRYONNAIRE DU MUTANT 5-HT2DRO :	112
2.1/ Génotypage des embryons :	112
2.2/ Observation des cuticules embryonnaires :	115
2.2.2/ Préparation des cuticules :	116
2.3/ Hybridation in situ, immunohistochimie :	117
2.4/ Observation sous huile et time lapse vidéo :	123
3/ TRANSFECTIONS ET EXPÉRIENCE DE PHARMACOLOGIE :	124
3.1/ Clonage du premier exon mutant de 5-HT2Dro :	125
3.2/ Transfections dans des cellules COS-1 :	125
3.3/ Etude des relations ligand-récepteur :	128
4/ DOUBLE HYBRIDE (D'APRÈS LE DOUARIN 2001):	129
4.1/ Clonage des appâts :	129
4.2/ Transfections des levures :	130
4.3/ Test d'expression :	132
4.4/ Test d'activation :	133
4.5/ Préparation de la banque :	134
4.6/ Transformation de la banque dans les levures :	138
4.7/ Criblage de la banque :	139

4.8/ Mise en évidence des interactants avec 5-HT_{2Dro} : 141

Abréviations et descriptions des phénotypes associés:

Bri = bristles (soies très courtes)
bx = beadex (ailes longues et fines avec des échancrures)
ca = claret (yeux rouges foncés tirant sur le brun)
cn = cinnabar (cn² = yeux rouges vifs)
cu = curled (ailes recourbées)
Cy = curly (ailes recourbées)
D = Dichaete (ailes écartées et sans alula)
Df(3R) = déficience sur le bras droit du chromosome 3
dp = dumpy (dp^{lv1} = petits « cratères » pigmentés sur le thorax)
e = ebony (corps noir)
gl(2) = glass (yeux plus petits)
h = hairy (h1 = soies supplémentaires le long de la veine L2 des ailes à l'état homozygote, viable)
Hn = henna (affecte la couleur des yeux)
hs-FLP = Flippase sous l'influence du promoteur « heat shock »
In(3LR) = inversions de certaines parties d'ADN sur les bras gauches et droits du chromosome 3
iro = iroquois (affecte le développement des ailes)
kar²ry506 = karmoisin-rosy (yeux oranges)
Ki = kinked (soies du thorax tordues)
p = pink (yeux oranges)
Pr = prickly (soies du thorax très courtes)
pr = purple (yeux rouges violets)
pwn = pawn (affecte le développement des yeux)
ri = kni = knirps (affecte la segmentation)
rho(ve1) = rhomboid (affecte les veines des ailes)
m(roe-1) = rotund (disposition irrégulière des facettes des yeux donnant un effet rugueux)
ru = rough (yeux petits et rugueux)
Sb = stubble (Soies du thorax courtes)
Ser = serrate (ailes découpées)
sep = separated (certaines veines des ailes sont absentes)
sr = stripe (bandes dessinées sur le thorax)
ss = spineless (affecte le développement des antennes)
su(Hw) = suppressor of Hairy wing (macrochaetes supplémentaires sur le thorax)
st = scarlet (yeux rouges très vifs)
sti(1) = sticky (petits disques imaginaux)
Tb = tubby (corps petit et large)
th = thread (les antennes ne sont pas en plumeau)
Ubx = Ultrabithorax (gène homéotique, facteur de transcription)
w = white (yeux blancs)

1/ Etudes génétiques :

Les mouches sont entretenues dans des tubes de 3 tailles différentes contenant du milieu « brun ». La composition du milieu « brun » est la suivante :

Dans 20 litres d'eau chaude, on ajoute 100 g d'agar

150 g de farine de soja

270 g de levure de bière

1,2 kg de farine de maïs

1,2 kg d'extrait de malt

600 g de mélasse

100 mL d'acide propionique

1.1/ Principe du chromosome balancier :

Chez la drosophile, il est possible de maintenir et d'amplifier des souches récessives létales grâce à la technique du chromosome balancier.

Le chromosome balancier est un chromosome réarrangé qui comprend tous les gènes fonctionnels présents sur le chromosome sauvage mais dans un ordre différent. En effet, des cassures et des inversions ont été induites dans les parties non codantes du chromosome. Les morceaux découpés ont ensuite été remis dans un ordre différent de sorte que les recombinaisons homologues entre les deux chromosomes ne se produisent pas lors des méioses et que la perte de la mutation d'intérêt soit impossible.

Ces chromosomes contiennent des mutations dominantes viables codant pour des marqueurs morphologiques afin de suivre la ségrégation du chromosome balancier au cours des croisements. Dans le même temps, dans la majorité des cas, ils contiennent une mutation récessive létale, ainsi lors des croisements on ne peut pas avoir de mouches viables contenant les deux chromosomes balanciers.

chromosomes balanceurs utilisés dans ce travail :

2^{ème} chromosome **CyO** = In(2LR)O, Cy, dp^{lv1}, pr, cn²

3^{ème} chromosome **TM3** = In(3LR)TM3, ri, p^P, sep, su(Hw)², bx^{34e}, e

3^{ème} chromosome **TM6** = In(3LR)TM6, Hn^P, ss^{P88}, bx^{34e}, Ubx^{P15}, e

1.2/ Mise en évidence de mutants létaux dans la région chromosomique de 5-HT2Dro :

Des souches mutantes provenant d'une mutagenèse EMS et mises à disposition sur la banque de données mondiales (Flybase : <http://flybase.bio.indiana.edu/>) étaient caractérisées comme étant létales contre la déficience Df(3R)110 et viable contre Df(3R)6-7. Les mutations qu'elles portent sont donc situées dans la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro.

Ces souches ont les génotypes suivants :

l(3R)4830b/TM3Sb=>ru(1)h(1)th(1)st(1)l(3)82CDb(C644)cu(1)sr(1)e(s)ca(1)/TM3Sb(1)
) FBa10092876

l(3R)4831c/TM3Sb=>ru(1)h(1)th(1)st(1)l(3)82CDc(C931)cu(1)sr(1)e(s)ca(1)/TM3Sb(1)
FBa10092875

l(3R)4832d/TM3Sb=>ru(1)h(1)th(1)st(1)l(3)82CDd(C142)cu(1)sr(1)e(s)ca(1)/TM3Sb(1)
) FBa10092872

l(3R)4833d/TM3Sb=>ru(1)h(1)th(1)st(1)l(3)82CDd(C360)cu(1)sr(1)e(s)ca(1)/TM3Sb(1)
) FBa10092871

l(3R)4839c/TM3Sb => w(1118) ; l(3)82CDc(16)/TM3Sb(1)
FBa10092873

Souches déficientes utilisées produites au laboratoire :

Df(3R)HTRI => w⁻/w⁻ ; Df(3R)HTRI/TM3 {hb-lacZ} SerSb

Df(3R)HTR6 => Df(3R)HTR6/TM3 {tw-lacZ} Ser

Principe des croisements effectués :

- Croisements préliminaires pour mettre en évidence les mutations susceptibles d'affecter le locus du gène du récepteur 5-HT_{2Dro}.

Df(3R)HTRI X souche mutante → Létal

Df(3R)HTR6 X souche mutante → Viable

- Croisements préliminaires pour vérifier les groupes de complémentation.

souche mutante y X souche mutante z → Létal (les deux mutants sont mutés dans le même gène)

souche mutante y X souche mutante z → Viable (les deux mutants ne sont pas mutés dans le même gène)

- Croisements préliminaires pour vérifier la présence de mutants dans le gène de la karyoferine localisé dans Df(3R)HTRI dans lequel nous disposons d'une insertion de transposon létale (P2111).

P2111/TM3SerSb X souche mutante → Présence de mouches au phénotype sauvage appelées P2111/mutant.

P2111/mutant X P2111/mutant → Vérification de la fécondité des mouches à phénotype sauvage.

1.3/ Nettoyage du chromosome 3 :

génotype des souches utilisées :

Oregon R (or) : sauvage

Kar²ry506 : souche isogénique kar²ry506/kar²ry506

Ruprica : ru(1)h(1)th(1)st(1)cu(1)sr(1)e(s)Pr(1)ca(1)/TM6B Bri, Tb

Flybase stock N°=1711

Ki, kar²ry506 : w⁺/w⁺ ; pr, pwn P[ry⁺ , hs-FLP]³⁸/CyO ; Ki, kar²ry506/; Ki, kar²ry506

D, kar²ry506/TM3Ser Sb : In(3L)D¹iro^{D1}kar²ry506/TM3Ser, Sb

- Le nettoyage du chromosome 3 sur lequel est localisé le mutant dans le gène du récepteur 5-HT2Dro nous permet d'éliminer la présence de toute mutation supplémentaire éventuelle générée lors de la mutagenèse EMS.
- Elle se fait en deux parties, la première nous permet de nettoyer le bras gauche du chromosome et la deuxième partie le bras droit du chromosome dans la partie distale du gène du récepteur 5-HT2Dro.

⇒ **Première partie du nettoyage du chromosome :**

1/ ♀ w⁻/w⁻ ; l(3R)4830b/TM3Ser [yeux jaunes, e, Ser] X ♂ w⁺/Y ; kar²ry506/kar²ry506
[yeux oranges]

→ On récupère les femelles de génotype w⁻/w⁺ ; l(3R)4830b/ kar²ry506 [sauvage]

2/ ♀ w⁻/w⁺ ; l(3R)4830b/ kar²ry506 [sauvage] X ♂ w⁺/Y; Ruprica/TM6B, Bri, Tb [Pr, Bri, Tb]

→ On récupère les mâles w⁺/Y ; l(3R)4830b recombéné/Ruprica [ru⁺, h⁺, th⁺, st⁺, cu, sr, e, Pr]

3/ ♀ w⁻/w⁻ ; Df(3R)HTRI/TM3Ser Sb [yeux jaunes, Ser, Sb] X ♂ w⁺/Y; l(3R)4830b recombéné/Ruprica [ru⁺, h⁺, th⁺, st⁺, cu, sr, e, Pr]

→ On récupère les mâles et les femelles w⁻/w⁺ (w⁻/Y) ; l(3R)4830b recombéné/TM3Ser [e, Ser]

⇒ *A ce stade, on amplifie un stock de mouches [e, Ser]*

Croisements préliminaires avant de commencer la deuxième partie :

4/ ♂ pr, pwn FLP³⁸/CyO ; Ki, kar²ry506 [Ki, CyO] X ♀ kar²ry506/kar²ry506 [yeux oranges]

→ On récupère les mâles CyO/+ ; Ki, kar²ry506/kar²ry506 [Ki, CyO, yeux oranges]

⇒ **Deuxième partie du nettoyage du chromosome :**

5/ ♀ l(3R)4830b recombiné/TM3Ser [yeux jaunes, e, Ser] X ♂ CyO/+ ; Ki, kar²ry506/kar²ry506 [Ki, CyO, yeux oranges]

→ On récupère les femelles w⁺/w⁺ ; l(3R)4830b recombiné/Ki, kar²ry506 [Ki]

6/ ♀ l(3R)4830b recombiné/Ki, kar²ry506 [Ki] X ♂ D, kar²ry506/TM3Ser Sb [D, Ser, Sb]

→ On récupère les mâles l(3R)4830b recombiné kar²ry506/D, kar²ry506 [Ki⁺, D, yeux oranges]

7/ ♀ w⁻/w⁻ ; Df(3R)HTRI/TM3Ser Sb [yeux jaunes, Ser, Sb] X ♂ l(3R)4830b recombiné kar²ry506/D, kar²ry506 [Ki⁺, D, yeux oranges]

→ On récupère les mâles et les femelles l(3R)4830b recombiné kar²ry506/TM3Ser [Ser]

La souche recombinée portant la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro est appelée M51.

⇒ ***Stock = M51/TM3Ser [Ser]***

Pour vérifier la présence de la mutation dans le récepteur 5-HT2Dro on croise les mouches obtenues avec la souche l(3R)4830b/TM3Ser Sb ou Df(3R)HTRI/TM3Ser.

1.4/ Recombinaison entre un mutant hairy et le mutant dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :

Génotype des souches utilisées :

h1 : h1/h1 [FBgn0001168](#)

- Cette recombinaison a permis de tester l'hypothèse de l'existence d'une interaction génétique entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro.

1/ ♀ w⁺/w⁺ ; M51/TM3Ser [Ser] X ♂ w⁺/Y ; h1/h1 [h] → On récupère les femelles w⁺/w⁺ ; M51/h1 [sauvage]

2/ ♀ w⁺/w⁺ ; M51/h1 [sauvage] X ♂ w⁻/Y ; l(3R)4831c/TM3Ser, Sb [yeux jaunes, e, Ser, Sb] → On récupère les mâles w⁺/Y ; h1, M51/l(3R)4831c [h]

3/ ♀ w⁻/w⁻ ; Df(3R)HTRI/TM3Ser [Ser] X ♂ w⁺/Y ; h1, M51/l(3R)4831c [h] → On récupère les mâles et les femelles w⁻/w⁺ (w⁻/Y) ; h1, M51/ TM3Ser [Ser]

⇒ *Stock = h1-M51/TM3 Ser [Ser]*

Pour vérifier le stock ainsi formé on croise les mouches avec l(3R)4830b/TM3Ser Sb, Df(3R)HTRI/TM3Ser ou h1/h1.

1.5/ Recombinaison dans la partie distale du bras droit du chromosome l(3R)4830 :

Génotype des souches utilisées :

$w^{1118} : w^{1118}/w^{1118} ; +/+$ [yeux blancs]

- Cette recombinaison a permis de mettre en évidence la présence d'une mutation supplémentaire sur le chromosome l(3R)4830b et de la localiser entre les gènes *hairy* et *thread*.

1/ ♀ $w^{1118}/w^{1118} ; +/+$ [yeux blancs] X ♂ $w^-/Y ; l(3R)4830b/TM3Ser Sb$ [yeux jaunes, e, Ser, Sb] → On récupère les femelles $w^{1118}/w^- ; l(3R)4830b/+$ [yeux blancs]

2/ ♀ $w^{1118}/w^- ; l(3R)4830b/+$ [yeux blancs] X ♂ $w^-/Y ; l(3R)4831c/TM3Ser, Sb$ [yeux jaunes, e, Ser, Sb]

→ On récupère les mâles $w^-/Y ; ru/l(3R)4831c [ru], w^-/Y ; ru, h/l(3R)4831c [ru, h]$ ou $w^-/Y ; ru, h, th/l(3R)4831c [ru, h, th]$

3/ ♀ $w^-/w^- ; Df(3R)HTRI/TM3Sb [Sb]$ X ♂ $w^-/Y ; ru/l(3R)4831c [ru], w^-/Y ; ru, h/l(3R)4831c [ru, h]$ ou $w^-/Y ; ru, h, th/l(3R)4831c [ru, h, th]$

→ On récupère les mâles et les femelles $w^-/w^- (w^-/Y) ; ru/TM3Sb [Sb], ru, h/TM3Sb [Sb]$ ou $ru, h, th/TM3Sb [Sb]$

On vérifie la présence des différentes mutations en croisant les mouches avec la souche l(3R)4830b/TM3Ser Sb.

1.6/ Localisation de la mutation sur la bras gauche du chromosome 3 :

Génotype des souches utilisées :

Df(3L)h-i22 : Df(3L)h-i22, Ki(1), rn(roe-1), p(p)/TM3 Ser (66D10-66E1)

FBab0002374

Df(3L)Scf-R6 : Df(3L)Scf-R6, th(1), st(1), cu(1), sr(1), e(s), ca(1)/TM3 Sb (66E1-66F1-6)

FBab0027420

Df(3L)BSC35 : Df(3L)BSC35, rho(ve1), e(1)/TM3Ser, p(p) (66F1-2-67B263)

FBab0035322

Df(3L)AC1 : Df(3L)AC1, m(roe-1)p(p)/TM3Sb (67A2-67D11-13)

FBab0002292

Df(3L)BSC14 : Df(3L)BSC14, rho(ve1), e(1)/TM3 Ser (67E3-7-68A2-6)

FBab0029706

Df(3L)vin5 : Df(3L)vin5, ru(1), h(1), gl(2), e(4), ca(1)/TM3 Ser, Sb (68A2-3-69A1-3)

FBab0002457

Df(3L)vin7 : Df(3L)vin7, h(1), gl(2), e(4), ca(1)/TM3Ser Sb (69C8-11-69B4-5)

Fbab0002460

Df(3L)eyg[C1] : w(*) ; Df(3L)eyg[C1]/TM3, P{ry(+t72)=ftz/lacC}SC1, ry(RK) Sb Ser (69A4-5-69D4-5) FBab0028386

Df(3L)BSC10 : Df(3L)BSC10, rho(ve1), e(1)/TM3 Ser (69D4-5-70A1)

FBab0029692

Df(3L)BSC12 : Df(3L)BSC12, rho(ve1), e(1)/TM3 Ser (69F6-70A1)

FBab0029722

In(3LR)C190L : In(3LR)C190L, Ubx(42TR), Ubx(-)/sti(1) (70A1-2-70C2-3)

FBab0022850

Df(3L)fz-GF3b :Df(3L)fz-GF3b,P{w(+t7.2AR)=wA(R)}66E/TM6bTb,ca (70C1-2-70D4-5)

FBab0002371

Df(3L)fz-M21 : Df(3L)fz-M21, st(1)/TM6 (70D2-3-71E4-5)

FBab0002373

Df(3L)XG5 : Df(3L)XG5/TM3 Sb, Ser (71C2-3-72B1-C1)

FBab0029807

Df(3L)brm11 : Df(3L)brm11/TM6c cu, Sb, ca (71F1-4-72B1-C1)

FBab0002363

Dp(3;3)S2a2 : Dp(3;3)S2a2/TM6b, Ubx

donné par G. Reuter

Dp(3;3)S2a3 : Dp(3;3)S2a3/TM6b, Ubx

donné par G. Reuter

Df(3L)ED4421 : Df(3L) ED4421/TM6c, Sb

Centre de Szezeg

Df(3L)Exel 16114 : Df(3 Df(3L)Exel 16114 /TM3 Sb

Exelixis

Df(3L)Exel 19048 : Df(3L)Exel 19048 /TM3 Sb

Exelixis

- Afin de localiser plus précisément cette nouvelle mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3, on croise les souches issues de la recombinaison dans la partie distale du bras droit du chromosome 3 avec des déficiences chevauchantes entre le locus de *hairy* et celui de *thread*.

Déficiences Y X mutant Z → présence de mouches sauvages lorsque la mutation n'est pas dans la région couverte par la déficience.

→ absence de mouches sauvages lorsque la mutation est dans la région couverte par la déficience.

2/ Etude du phénotype embryonnaire du mutant 5-HT2Dro :

2.1/ Génotypage des embryons :

Dans le but de mettre en évidence moléculairement une mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro, on a d'abord visualisé les embryons homozygotes mutants, puis on a amplifié l'ADN de chaque exon de 5-HT2Dro, les produits de PCR sont par la suite séquencés directement.

2.1.1/ Extraction d'ADN d'embryons uniques :

Dans un premier temps, on laisse pondre des mouches sur du milieu « jus de pomme » pendant 2 à 3 heures, puis on laisse vieillir ces embryons 2 heures après la fin de la ponte. On récolte dans un tube de 1.5 mL un embryon unique issu de cette ponte (on peut congeler le tube dans l'azote liquide et conserver l'embryon à -20°C). On ajoute 100 μl de Tpu (Tpu: 100mM Tris/HCl (pH=9), 0.1mM EDTA, 1% SDS). Après homogénéisation avec un broyeur (Piston Pellet Bleu / Polylabo #06163), 14 μl de KAc 8M sont ajoutés au mélange et l'ensemble est vortexé. Les tubes sont ensuite placés dans la glace pendant 20 minutes puis centrifugés 15 minutes à 13000 rotations par minutes (rpm) à 4°C . Au surnageant récupéré, on ajoute 30 μg de glycogène et 1 volume d'isopropanol. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante suivie d'une centrifugation de 20 minutes à 13000 rpm à 4°C , le culot est lavé avec de l'éthanol 80%, et repris dans 60 μL d'eau.

Milieu « jus de pomme » (500 mL) : 12,5 g d'agar
375 mL d'eau
125 mL de jus de pomme

2.1.2/ Génotypage par PCR :

A partir de l'ADN extrait des embryons uniques, des réaction d'amplification en chaînes (PCR) ont été réalisées afin de les génotyper. On recherche les embryons homozygotes mutants pour le chromosome muté.

On utilise donc dans un premier temps des oligomères permettant l'amplification d'un gène (atonal) du chromosome 3 (témoin positif de la PCR) et d'un gène spécifique du chromosome balancier (tw-lacZ).

A partir des embryons homozygotes pour le chromosome mutant, on amplifie ensuite chaque exon du récepteur par PCR afin de les séquencer dans la partie codante de 5-HT2Dro.

ADN génomique	5 µL
tampon PCR 10x	5 µL
dNTP 5 mM	1,5 µL
Taq polymérase (Perkin Elmer)	0,25 µL
oligonucléotide (1µg/µL)	0,2 µL de chaque
eau	27,85 µL

Le volume final est de 40 µL.

tampon PCR 10x : KCl 500mM, Tris pH=8,3 100mM, MgCl₂ 20mM.

Tableau 3 : Conditions de PCR pour un tube:

Les cycles des PCR sont les suivants :

- 40 cycles de 1 minute à 55°C
- 2 minutes à 72°C
- 3 minutes à 94°C

Oligonucléotides utilisés:

- Première PCR pour mettre en évidence les embryons homozygotes pour la mutation.
-amplification du gène *atonal* pour vérifier la présence de l'ADN intact du chromosome 3.

RK113:5' CGTTGGATCCAGCAACATAACACCACCATA 3'

RK114:5' ATCGGGATCCGGGAATTCAGCGCAGCAATC 3'

- amplification du transposon {twist-β-gal} pour visualiser la présence du chromosome balancier.

WH24:5' GCGTCAGTTGCGTTCCGTAAGTGC 3'

WH25:5' CAGTTTGAGGGGACGACGACAGTA 3'

- Deuxième PCR pour amplifier les différents exons du récepteur 5-HT2Dro.

-amplification de l'exon 1.

AAK169:5' GGAATTCCAAAACAAGTATTGTTGATGCTG 3'

AAK170:5' GGGGTACCTTATCTACTATATTTTACTTGC 3'

-amplification des exons 2,3 et 4.

AAI125:5' GGGGTACCAATTTTTTTTGAGATTCACATATA 3'

AAI126:5' GGGGTACCGCAGTAAGTCACCACCACGTAATT 3'

-amplification de l'exon 5.

AAP267:5' GGTGGAAAATTATTCGAAAGT 3'

AAP268:5' GCGATTCACCACCAAATAATTTA 3'

-amplification de l'exon 6.

AAI129:5' GGGGTACCCTTAACTTTTTTGGTACTACTAATA 3'

AAI130:5' GGGGTACCTGGCACTGGATCCGCGTCTGGGCT 3'

2.1.3/ Séquençage :

Les fragments de PCR sont purifiés avec un kit de purification GeneClean (#1001-400), puis repris dans 50 µL d'eau. Enfin, les séquences ont été déterminées directement sur les produits de PCR par la méthode de Sanger avec des dideoxynucléotides fluorescents (séquenceur automatique Applied scientific).

Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont les mêmes que pour la PCR.

2.2/ Observation des cuticules embryonnaires :

- La souche Df(3R)HTRI présente un phénotype cuticulaire. C'est pourquoi les cuticules des embryons mutants M51 dans le gène du récepteur 5-HT2Dro ont été observées.

2.2.1/ Ponte et récolte des embryons :

Dans un premier temps, on laisse pondre les mouches pendant 1 à 2 heures sur du milieu « jus de pomme » sur lequel on a étalé de la levure. Puis on récolte tous les embryons dans un petit panier avant de les réétaler délicatement sur une boîte de milieu « jus de pomme » sans levure. On laisse vieillir ces embryons pendant 72 heures en éliminant et comptant les larves au fur et à mesure qu'elles éclosent 24 heures, 48 heures et 72 heures après la fin de la ponte. Enfin, après 72 heures, on compte les embryons qui n'ont pas éclos (il faut faire attention à d'éventuelle éclosions tardives entre 24 et 72 heures, correspondant généralement aux embryons ayant les deux chromosomes balanceurs).

Calcul du pourcentage de létalité :

% de létalité = nombre d'embryons non éclos après 72 heures / nombre total d'embryons pondus.

2.2.2/ Préparation des cuticules :

Les embryons morts sont récoltés dans un panier, déchorionnés pendant 2 minutes dans une solution d'eau de javel 50% puis abondamment rincés à l'eau avant d'être séchés et transférés à l'aide d'un pinceau fin dans une goutte de milieu « Hoyers » entre lame et lamelle [Nusslein-Volhard, 1984 #204]. Un plot en métal d'une quarantaine de grammes est placé sur la lamelle. L'ensemble est transféré sur une plaque chauffante à 60°C pendant 48 heures au terme desquelles les structures internes de l'animal se sont éclaircies ; seules les structures cuticulaires résistant au traitement sont visibles.

Les cuticules sont observées avec un microscope optique. On distingue différentes classes phénotypiques.

Le pourcentage des embryons d'une classe phénotypique est calculé de la manière suivante :

% phénotype = nombre d'embryons du phénotype/ nombre total d'embryons sur la lame.

2.3/ Hybridation in situ, immunohistochimie :

- Après avoir observé les cuticules des embryons mutants, des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont été faites pour visualiser l'expression de *5-HT2Dro*, *wingless*, *fushi-tarazu* ou *engrailed* avec des sondes ADN et des anticorps spécifiques.

2.3.1/ Synthèse des sondes ADN (D'après *Boehringer Mannheim Biochemica*) :

- Toutes les expériences de détection d'un ARN messager ont été réalisées par hybridation *in situ* sur des embryons entiers à l'aide d'une sonde « froide ». Le déoxynucléotide modifié utilisé pour le marquage est le Dig11-dUTP. La Dig ou digoxygénine (stéroïde extrait de *Digitalis purpurea*) est fixée sur le nucléotide par un bras carboné. La révélation des hybrides ARN-ADN s'effectue grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre la digoxygénine et couplé à une activité phosphatase alcaline catalysant une réaction d'oxydoréduction sur un couple de substrats incolores et donnent un produit coloré.

A une matrice d'ADN bien purifiée (10 ng-3 µg, dans un volume de 13 µL) et dénaturée (95°C, 10 minutes suivi d'un refroidissement rapide sur glace), on ajoute 4 µL d'hexanucléotide (10x, #1277 081), 2 µL de « DIG DNA labeling mixture » (10x, #1277 065), et 1 µL de Klenow (2U/µL). Le mélange est incubé 15 heures à 37°C. Puis on ajoute 1 µL de Klenow pour une incubation supplémentaire d'une heure. La réaction est stoppée en ajoutant 2 µL EDTA 0.2M (pH=8.0). L'ADN marqué est purifié par précipitation en utilisant 4µL 3M NaAc (pH=5.2) et 75µL d'éthanol 100% froid (-20°C) avec ou sans entraîneur suivant la quantité d'acides nucléiques déjà présente. Le culot est rincé à l'éthanol 80% puis resuspendu dans l'eau à la concentration de 100 ng/µL.

La matrice utilisée est un cosmide contenant le gène du récepteur 5-HT2Dro appelé COS9.

2.3.2/ Fixation :

➔ Collecte d'embryons :

En premier lieu, on laisse pondre les mouches sur du milieu « jus de pomme » pendant 1 heure qui vieillissent ensuite les embryons encore entre 2 heures 30 minutes et 5 heures. Les pontes sont faites dans une cage cylindrique de 30 cm de long et 5 cm de section, à chaque extrémité de laquelle un joint permet d'installer une boîte de ponte (Falcon #3004). Les mouches sont nourries avec du milieu « brun » entre chaque session de ponte. Les pontes sont faites sur un milieu « jus de pomme ».

➔ Fixation des embryons pour hybridation in situ et immunomarquages :

(Tautz et Peifle 1989)

Déchoriation :

Les embryons pondus et vieillis sont récoltés dans l'eau de javel 50% pendant 2 minutes 30 secondes dans le panier. On lave ensuite les embryons dans deux bains d'eau et on bombarde leurs surfaces avec du PBT 0,1% (PBS 1x, 0,1% Triton X100).

Fixation au formaldéhyde :

Après avoir transféré les embryons dans un tube à hémolyse en verre avec une pipette pasteur, on les rince dans du triton X100 avec 4 mL du tampon de fixation "1x". La fixation est faite dans le tube en verre avec 2,5 mL de FS (Fixation Solution) et 2 mL heptane. Après avoir bouché les tubes avec un bouchon « versalis », on les remue 20 minutes sur une balancelle puis on aspire la totalité de la phase inférieure.

tampon de fixation "1x" : HEPES pH=6,9 0,1 M

MgSO₄ 2 mM

EGTA 1 mM

10 mL FS : 8,92 mL de tampon de fixation "1x"

1,08 mL de formaldéhyde 37%

Dévitellinisation :

La dévitellinisation est faite en ajoutant 1 volume de méthanol 100% au milieu de fixation et en remuant d'abord doucement puis vigoureusement pendant 10 secondes maximum (les embryons dévitellinisés coulent de l'interface entre l'heptane et le méthanol vers le fond du tube). On aspire ensuite le milieu de fixation et le méthanol et on rince abondamment le tube contenant les embryons dans 4 mL de méthanol frais. Enfin, on transfère les embryons dans un tube de 1,5 mL (à ce stade, les embryons peuvent être conservés à -20°C dans le méthanol).

2.3.3/ Hybridation *in situ* :

Dans un premier temps, on remplace le méthanol réchauffé à température ambiante. par 1 ml de ME (ME=90% Méthanol, 10% EGTA 0,5 M), puis on refixe les embryons en les incubant successivement dans les bains suivants:

- . 5 minutes dans 30% PP, 70 % ME (PP 100% = PBS 1x, 4% formaldéhyde).
- . 5 minutes dans 50% PP, 50% ME.
- . 5 minutes dans 70% PP, 30% ME.

On laisse ensuite les embryons sur la balancette pendant 20 minutes dans un bain 100% PP et on les lave 3x5 minutes dans du PBTw (PBTw=PBS / 0,1% Tween20) avant de procéder au traitement à la protéinase K (Etape clé de l'expérience).

Pour ce faire, on incube les embryons 3 minutes 30 secondes dans 1 mL Protéinase K à 100 µg/mL final dans du PBTw (stock à 20 mg Protéinase K MERCK /ml H₂O) à 37°C en les retournant un fois chaque minutes. On arrête la digestion en incubant les embryons 2 fois 1 minute dans de la glycine à 2 mg/mL PBTw (stock à 20 mg/ml PBTw). Les embryons sont ensuite lavés 2 fois 5 minutes avec du PBTw et avant d'être

refixés 20 minutes dans de 100% PP. Ils sont enfin rincés 5 fois 5 minutes avec du PBTw.

A ce stade, on peut aliquoter les embryons si nécessaire (mêmes embryons, sondes différentes). Écarter les embryons destinés à la pré absorption de l'anticorps.

Les étapes suivantes sont faites sans remuer les embryons. On lave d'abord les embryons 10 minutes dans 500 µL de PBTw/HS (1:1) puis 10 minutes dans du HS avant de préhybrider les embryons pendant 1 heure, à 42°C dans 500 µL de HS. Quelques minutes avant le début de l'hybridation, il faut dénaturer la sonde-digoxigénine (Stock à 100ng/µL H₂O) dans du HS à 95°C pendant 3 minutes puis la laisser refroidir sur la glace jusqu'à la température d'hybridation. (prévoir la quantité de sonde nécessaire à une concentration finale d'hybridation égale à 500 ng/mL HS embryon, soit 1 ou 2µL pour un tube).

Après la préhybridation, on enlève le surnageant de préhybridation et on mélange délicatement la sonde dénaturée (200 ou 400 µL) avec les embryons (<50µL) dans le tube de 1,5 mL. On laisse les embryons hybrider au minimum 18 heures à 42°C .

Solution d'hybridation (HS) : Formamide déionisé 50%

SSC 5x

ARNt 100 µg/mL

Héparine 50 µg/mL

Tween 20 0,1%

La solution est filtrée et stockée à -20°C.

Le lendemain, après avoir enlevé la sonde (elle peut être réutilisée au moins deux fois), on lave les embryons comme suit : . 20 minutes dans du HS à 42 °C.

- . 10 minutes dans du HS/PBTw (4:1) à température ambiante.
- . 5 minutes (3:2).
- . 5 minutes (2:3).
- . 5 minutes (1:4).

Puis on remet le tube sur la balancette et on lave les embryons pendant 5 minutes dans du PBTw avant de les incuber pendant 3 heures à température ambiante (ou la nuit à 4°C), sur balancette, avec 1mL de l'anticorps anti-digoxygénine (Alcalin Phosphatase conjugate; Boehringer Mannheim #1093 274) dilué au 1/2000 dans du PBTw (préabsorbé au 1/100 contre des embryons traités PK).

Après l'incubation des embryons avec l'anticorps, on les lave 4 fois pendant 5 minutes dans du PBTw, puis 3 fois 5 minutes dans une solution de BRLIII Tw frais. On procède alors à la réaction de coloration en remplaçant le dernier lavage par 1 mL BRLIII Tw contenant 4,5 µL NBT + 3,5 µL XP.

--NBT : 4-Nitro blue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim #1087 479)

Solution 75mg/mL dans 70% v/v DMF.

--XP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Boeh. Mann. #1017 365 = Na₂ salt, 200 mg)

Solution 50mg/mL H₂O.

La réaction doit être développée dans le noir, de 30 minutes à 5 heures, à température ambiante sur la balancette. Il faut souvent changer la solution de coloration (après les 10 premières minutes puis chaque 30 minutes). La réaction est suivie grâce à la loupe binoculaire sur un aliquote dans une cupule et arrêtée en lavant le tube au moins 3 fois 5min dans du PBTriton 0,3%.

Solution BRLIII : NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

Tris pH=9,5 100 mM

(facultatif) Levimasol 1 mM

Il faut filtrer et stocker la solution sans Tween (vérifier qu'il n'y ait pas de précipité)

Pour éviter les précipités, on peut ajouter 500 µL d'HCl à 1 L de solution.

BRLIII Tw = BRLIII + Tween 20 0,1% (préalablement dissous dans du PBS 1x)

Les embryons peuvent alors être montés simplement entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol-PBS 1x.

2.3.3/ Immunohistochimie :

Après fixation au formaldéhyde 4%, on utilise les embryons qui sont stockés dans le méthanol. On réhydrate progressivement les embryons en les mettant dans des bains de méthanol 75% (dans du PBS 1x) puis 50%, 25% et enfin du PBS 1x. Chaque bain dure environ 10 minutes.

Ensuite, on procède au blocage des embryons dans 3 bains de PBT-goat serum (PBS 1x, Triton 0,1% et goat serum 5%) pendant 20 minutes. On incube l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C dans une solution de PBT-goat serum diluée au 1/10.

Le lendemain, après avoir lavé 3 fois les embryons dans du PBT pendant 5 minutes, on les incube 1 heure dans une solution de PBT-goat serum diluée 1/10 contenant l'anticorps secondaire couplé HRP (« horse radish peroxydase »). On fait 2 lavages de PBT-goat serum pendant 10 minutes à température ambiante, sur la balancelle. Pour la révélation, on utilise le kit ABC de Santa Cruz Biotechnology (cat # sc-2018). Après avoir refroidit 1 mL de PBT, puis on y ajoute 5 µL de solution A et après 10-20 secondes de mélange rapide à l'aide d'un vortex, 5 µL de solution B. Le mélange est ensuite mis sur la glace entre 30 minutes et 1 heure (=préincubation du système Avidine-biotine complexe (ABC)). Le dernier lavage est remplacé par 500 µL de solution ABC et on les laisse incuber entre 30 minutes et 1 h à température ambiante sur la balancelle. Après 3 lavages de 10 minutes dans du PBT à température ambiante sur la balancelle, on procède à la révélation en plaçant les embryons dans une solution de révélation (PBS 1x 1,5 mL, DAB 60 µL et H₂O₂ 6 µL) et on laisse incuber les embryons entre 1 et 10 minutes. Les lames sont montées comme indiqué dans une goutte de glycérol-PBS 1x.

- Anticorps utilisés : - Engrailed 1/1
- Fushi tarazu 1/200
- Wingless 1/100
- Anticorps secondaire 1/1000

2.4/ Observation sous huile et time lapse vidéo :

- Le but de cette expérience est d'observer les mouvements cellulaires lors de la gastrulation de l'embryon et de pouvoir les enregistrer. A l'aide d'un logiciel mis au point au laboratoire, nous pouvons à partir de ces enregistrements, élaborer une figure nous permettant de suivre la migration de chaque cellule individuellement et même de mesurer sa vitesse.

2.4.1/ Observation sous huile :

Dans un premier temps, on laisse pondre les mouches sur une boîte de milieu « jus de pomme » pendant 1 à 2 heures. Ensuite, on laisse les embryons vieillir pendant 2h30 et on les couvre avec de l'huile 3S (Votalef® chez Prolabo # 24 626.185). Les embryons deviennent progressivement transparents, on peut alors observer les mouvements cellulaires lors de la gastrulation.

2.4.2/ Time lapse vidéo :

On observe la gastrulation sous une loupe binoculaire équipée d'une caméra reliée à un ordinateur. On enregistre alors les étapes de la gastrulation toutes les 15 secondes pendant 1 heure (soit 241 images) avec le logiciel Zeiss Axiovision 3.0.6, puis à l'aide d'un logiciel mis au point par Jean-Luc Vonesch à l'IGBMC appelé Tcstk, chaque image a été traitée. Ainsi, avant les premiers mouvements cellulaires, on commence l'enregistrement en faisant la mise au point sur le plan focal de la ligne médiane de l'embryon (voir figure 36). On prépare ensuite un masque noir avec une ligne blanche de 1 pixel suivant la périphérie de l'embryon. Le logiciel superpose ce masque à chaque photo du film et enregistre l'image délimitée par cette ligne. On visualise alors l'alternance de chaque cellule le long de l'embryon (on voit les membranes). Le logiciel

coupe alors cette image dans la partie antérieure de l'embryon et l'étale horizontalement. Il fait de même avec chaque image du film et place toutes les lignes les unes en dessous des autres (voir figure 36). Ainsi, il est possible de suivre la migration de chaque cellule (voir graphique ou chaque carré correspond à la même cellule à des positions différentes).

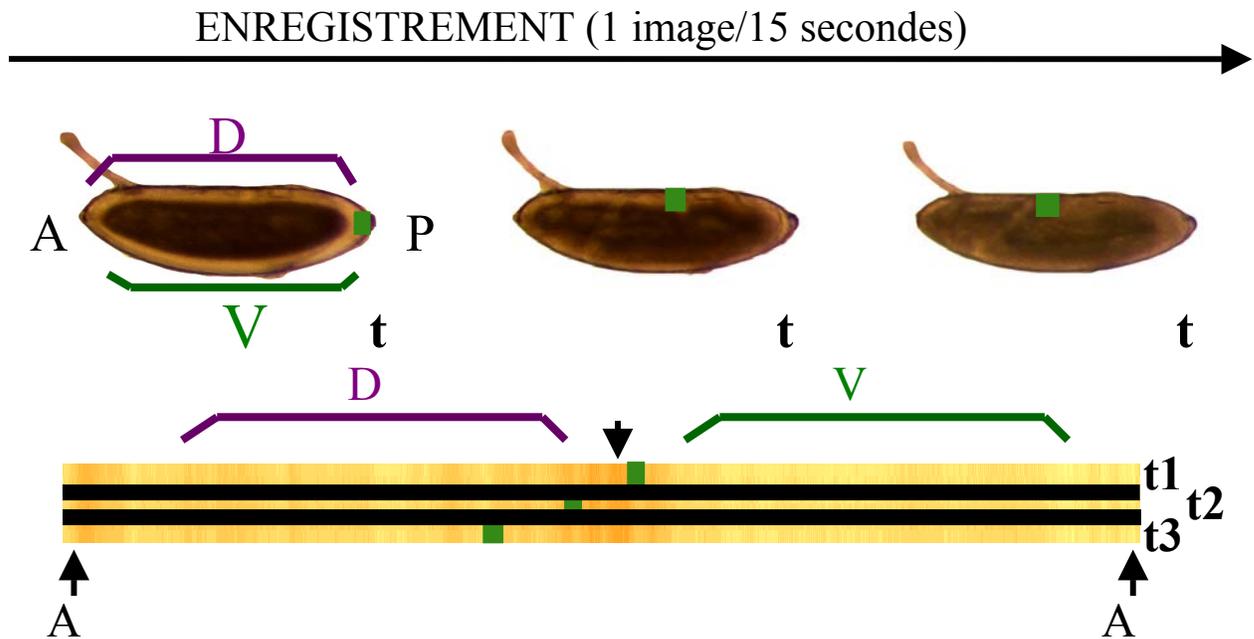


Figure 36 : Principe de déroulage des time lapse vidéo.

3/ Transfections et expérience de pharmacologie :

- Afin de vérifier l'affinité de la sérotonine pour le récepteur 5-HT_{2Dro} mutant, on a cloné le premier exon de ce récepteur (contenant la mutation ponctuelle) dans un vecteur contenant le récepteur sauvage. Puis on a transfecté les vecteurs dans des cellules COS-1 pour exprimer le récepteur et faire des expériences de pharmacologie.

3.1/ Clonage du premier exon mutant de 5-HT2Dro :

Dans un premier temps, on remplace le premier exon du récepteur 5-HT2Dro muté dans un vecteur p513 contenant le récepteur sauvage. Pour ce faire, on amplifie par PCR le premier exon du récepteur à partir d'ADN d'embryon homozygote pour la mutation (oligomères AAK 169 et AAK 170). Ce produit de PCR est ensuite purifié avec le kit GeneClean (# 1001-400).

Ensuite, le vecteur contenant le récepteur sauvage et le fragment de PCR obtenu sont incubés avec les enzymes de restriction BsiW1, puis EcoR1. On purifie les produits digérés par phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation à l'éthanol. Enfin on procède à une ligation du vecteur coupé et du fragment de PCR avec une T4 DNA ligase toute la nuit à 16°C avant de transformer les bactéries le lendemain par la technique du CaCl₂ (voir maniat 1.116-1.118).

Enfin on prépare des mini préparations et des maxi préparations d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline (voir maniat 1.38-1.42) suivies d'une purification au chlorure de césium (voir maniat 1.65-1.68).

Ce vecteur sera utilisé pour transférer les cellules COS-1 sur lesquelles les expériences de pharmacologie ont été faites.

3.2/ Transfections dans des cellules COS-1 :

Les cellules COS-1 sont des cellules de reins de singes verts africains. Ces cellules n'expriment pas de récepteurs à la sérotonine, on les transfecte avec des vecteurs contenant les récepteurs 5-HT2Dro sauvage ou mutant.

3.2.1/ Transfections :

Le premier matin :

Dans un premier temps, les cellules COS-1 confluentes dans un falcon de 75 cm² ou une boîte de 9 cm de diamètre sont divisées. Pour ce faire, on aspire tout le milieu de

culture que l'on remplace avec 10 mL de trypsine diluée au dixième pour recouvrir toute la boîte. On aspire 9 mL de trypsine et on replace la boîte dans l'incubateur à 37°C pendant 5 minutes. Pendant ce temps, on prépare 10 boîtes de 9 cm de diamètre avec 9 mL de milieu de culture (DMEN +5% FCS + Antibiotiques). On reprend les cellules, en tapant la boîte pour les décoller et on rajoute 10 mL de milieu de culture. Enfin, on ajoute 1 mL de cellules dans chaque boîte préalablement préparée et on les replace dans l'incubateur.

L'après midi :

Il faut préalablement préparer :

Une solution de CaCl_2 2M

Une solution de TE (Tris 1 M EDTA 50 mM)

Une solution d'HBS 2x (pour 500 mL d'eau) : NaCl 8 g

KCl 0,35 g

Na_2HPO_4 (12 H_2O) 0,2 g

HEPES 5 g

Il faut rajouter du HCl pour ajuster le pH à 7,12
(environ 20 mL d'HCl)

On prépare plusieurs séries de tubes pour tester l'efficacité de la transfection :

D'une part, on transfecte le vecteur contenant le gène du récepteur 5-HT_{2Dro} sauvage ou mutant. D'autre part, dans le tube témoin, on transfecte le récepteur sauvage et 1 µg de vecteur CMV tk Gal contenant le gène de la β-galactosidase. Ainsi, en mesurant l'activité de cette enzyme, on peut en déduire l'efficacité de la transfection.

	Sauvage	Mutant	Témoin
ADN	10 µL	5 µL	10+1 µL
TE	210 µL	215 µL	210 µL
CaCl ₂	30 µL	30 µL	30 µL
HBS 2x	250 µL	250 µL	250 µL

Tableau 4 : Composition des mélanges de transfections pour chaque boîte.

On prépare d'abord le mélange composé de l'ADN, du TE et du CaCl₂ (tableau 4). On verse ensuite ce mélange au goutte à goutte dans la solution de HBS 2x. Il y a formation d'un précipité et on laisse le tout incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

On récupère les cellules divisées le matin, et on enlève 5 mL de milieu après avoir vérifié que les cellules adhèrent au fond de la boîte. Enfin, on ajoute les 500 µL de solution de transfection aux cellules (le milieu jaunit) aux 5 mL de milieu restant et replace la boîte dans l'incubateur à 37°C toute la nuit.

Le lendemain :

Le lendemain matin, on aspire le milieu de transfection que l'on remplace par 10 mL de milieu de culture.

3.2.2/ Test d'efficacité :

Afin de vérifier l'efficacité de la transcription, on procède au test de détection de l'activité de la β-galactosidase. Ainsi, on rince les cellules avec du PBS 1x, puis on le remplace avec 5 mL de solution de coloration (Gal 1 mg/mL, K₃(HPO₄)₂ 5 mM, K₄(H₂PO₄)₂ 5 mM). Les cellules transfectées deviennent bleues car elles peuvent utiliser le substrat de la β-galactosidase. On laisse les cellules incuber dans la solution toute la nuit dans l'incubateur à 37°C et le lendemain, on nettoie les cellules avec du PBS 1x avant de les observer au microscope inversé. Il est alors possible d'estimer le nombre de cellules bleues par rapport au nombre total des cellules présentes sur la boîte et donc d'estimer l'efficacité de la transfection.

3.2.3/ Test de viabilité :

Il est aussi possible de mettre en évidence le nombre de cellules qui meurent au cours de l'expérience par la technique du bleu trypan. Dans ce test, on dispose d'une solution de bleu trypan (0,4 % m/v dans du PBS 1x sans calcium ni magnésium). Après avoir lavé les cellules avec du PBS 1x, on remplace le milieu par 10 mL de cette solution diluée au demi dans du PBS 1x. Après 10 minutes d'incubation, on rince le bleu trypan avec du PBS 1x à deux reprises et on regarde les cellules au microscope optique. Les cellules mortes sont colorées en bleue et celles qui ont survécu restent transparentes.

3.2.4/ Congélation :

Le cinquième jour, on congèle les cellules afin de récupérer les membranes intactes avec le récepteur 5-HT_{2Dro} sauvage ou muté.

Pour ce faire, on commence par laver les cellules 2 fois avec 10 mL de PBS 1x et on remplace le dernier lavage avec 1 à 2 mL de PBS 1x. On racle ensuite les cellules avec un « rubber policeman » et on récupère les cellules que l'on met dans un tube 50 mL. Le tube est ensuite placé à -80°C.

3.3/ Etude des relations ligand-récepteur :

L'affinité de la sérotonine et d'autres composés (agonistes, antagonistes) a été mesurée directement sur les membranes des cellules COS-1 par J.M. Launay selon la méthode de déplacement. Ainsi, on utilise le déplacement d'un ligand marqué radioactivement, présent dans une préparation de membrane contenant le récepteur à étudier par un composé non radioactif mis en excès. On détermine ainsi la constante de dissociation (K_i) qui correspond au déplacement de 50% du ligand marqué sur les membranes et le pK_i qui reflètent l'affinité du composé pour le récepteur.

Les composés testés sont :

Agonistes : Sérotonine, α méthyl 5-HT, Tryptamine, 5-CT, Dexfenfluramine

Antagonistes : Ritanserine, Mesulergine, Kétanserine, Buspirone, Yohimbine

4/ Double hybride (d'après Le Douarin 2001):

- La technique du double hybride permet de visualiser des interactions directes entre deux protéines. Pour ce faire, deux protéines de fusion sont construites respectivement avec le domaine d'activation de VP16 et le domaine de liaison à l'ADN de Lex A et les protéines à tester. Lorsque les deux protéines d'intérêt ont la capacité de dimériser, Lex A et VP16 interagissent entre eux et activent la transcription des gènes cibles comme le gène de synthèse de l'histidine ou de la β -galactosidase.
- Ainsi, on a procédé à un crible double hybride avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT_{2Dro} qui est connu pour interagir avec les effecteurs secondaires des RCPG. Le crible est fait sur une banque d'ARN messenger d'embryons de drosophile de 3 à 18 heures.

4.1/ Clonage des appâts :

Avant de commencer l'expérience de double hybride, on prépare les vecteurs contenant des protéines de fusion contenant le domaine C-terminal du récepteur 5-HT_{2Dro} et le domaine de liaison à l'ADN de la protéine bactérienne Lex A.

Tout d'abord, on prépare les fragments de PCR qui seront clonés dans le vecteur pBTM116 mod.

Les oligomères utilisés sont :

Pour amplifier le domaine C-terminal :

5' CGGAATTCGCACGTTCCGGGCGGCCTT 3'

5' CGCGGATCCTCACCGTTTGCAGTTGCACTT 3'

Les produits de PCR sont purifiés avec un kit de purification Nucleospin Extract Kit (#635960), puis incubés avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. En parallèle on coupe le vecteur pBTM116 avec les même enzymes. On ligue le fragment de PCR et le vecteur avec une T4 DNA ligase (on obtient alors un vecteur contenant une protéine de fusion Lex A-domaine protéique de 5-HT2Dro selon la figure 37), puis on transforme des bactéries XL1Blue par la méthode du CaCl₂ (voir maniat 1.116-1.118).

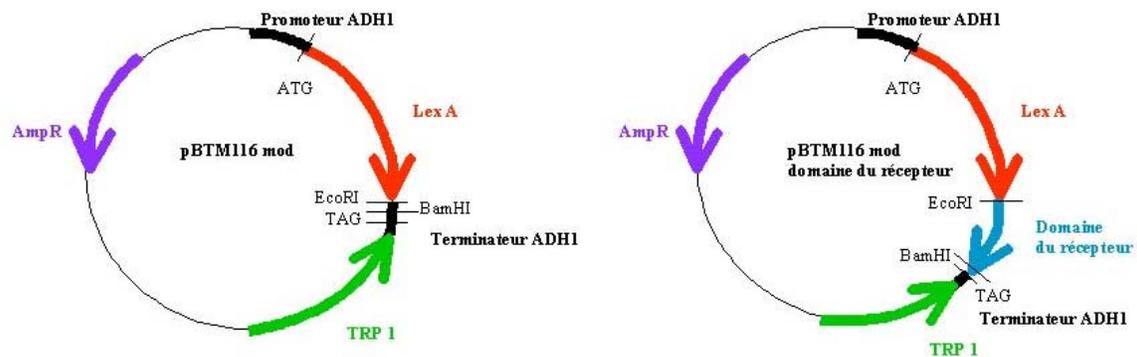


Figure 37 : vecteur pBTM116 et construction de l'appât.

La présence du vecteur est vérifié à l'aide de mini préparations selon la méthode de lyse alcaline avec du SDS (voir maniat 1.32-1.34), puis on prépare une grande quantité de cette construction par maxi préparation par la méthode de lyse alcaline avec du SDS (maniat 1.38-1.42) suivi d'une purification au chlorure de césium (maniat 1.65-1.68).

Après avoir vérifié la séquence du gène codant pour la protéine de fusion, le vecteur est alors prêt à être transformé dans les levures.

4.2/ Transfections des levures :

Après avoirensemencé 25 mL de milieu YPD avec une souche L40a de levure on place le tube à agiter toute la nuit à 30°C. Le lendemain, avant de commencer l'expérience, il faut préparer le mix 1 (180 µl LiAc 1M ; 1,2 ml PEG (PM= 3350 g/mol) ; 250 µl ADN de sperme de saumon (2 mg/mL) (préalablement dénaturé 10 minutes a

100°C et refroidit) ; 170 µl d'eau), puis rajouter à 173 µL de ce mix, 2 µL d'ADN (=mix 2) et vortexer vigoureusement.

On peut ensuite commencer à centrifuger les cellules dans un tube de 50 mL (20°C, 3000 rpm, 5 minutes), puis laver le culot avec 10 mL d'eau stérile. On répète l'opération en lavant le culot avec 1 mL d'eau stérile et après avoir transféré les cellules dans un tube de 1,5 mL, on centrifuge 15 secondes à température ambiante et vitesse maximale. On incube les levures pendant 15 minutes dans 250 µL de LiAc (0,1 M) à 30°C.

Après cette préincubation, on rajoute aux 175 µL de mix 2, 25 µL de levures et on incube le mélange 30 minutes à 30°C. Le mélange est ensuite placé à 42°C pour faire un choc thermique pendant 20 minutes.

Enfin on centrifuge le tube 15 secondes à température ambiante pour remplacer le mélange contenant du PEG par de l'eau stérile et on étale 50 µL de la transformation sur un boîte SD supplémentée avec les acides aminés adéquats (tryptophane, adénine, histidine, leucine, valine ou isoleucine). On laisse pousser les levures 2 à 5 jours dans une étuve à 30°C.

Milieu YPD : Bacto-yeast extract 1% (10g/L)

Bacto-peptone 2% (20g/L)

Glucose 2% (20g/L)

(bacto-agar (pour les boîtes) 2% (20g/L))

Milieu SD (synthetic dextrose minimal medium) :

Bacto-yeast nitrogen base sans acides aminés 0,67% (6,7 g/L)

Glucose 2% (20 g/L)

(bacto-agar (pour les boîtes) 2% (20 g/L))

Tryptophane, histidine (concentration finale= 50 µg/mL)

Leucine, valine, isoleucine (concentration finale=60 µg/mL)

Adénine (concentration finale= 20µg/mL)

Les milieux Trp⁻ sont supplémentés en leucine, isoleucine, valine, histidine et adénine.

Les milieux Trp⁻Leu⁻ sont supplémentés en histidine et adénine.

Les milieux Trp⁻ Leu⁻ His⁻ sont supplémentés en adénine.

	concentration du stock (mg/mL)	concentration finale (µg/mL)	volume pour 500 mL de SD.
Adénine	1	20	10 mL
tryptophane	10	50	2,5 mL
histidine	4	50	6,25 mL
leucine, isoleucine, valine	4	60	7,5 mL

Tableau 5 : Concentrations des acides aminés à ajouter dans le milieu SD.

4.3/ Test d'expression :

- Le but de cette expérience est de vérifier que la protéine de fusion n'est pas toxique pour la cellule et qu'elle est exprimée dans les levures. Dans un premier temps on prépare des extraits protéiques à partir des levures et on détecte l'expression de la protéine de fusion par western blot.

4.3.1/ Extraction de protéines :

On met en culture les levures d'une colonie dans 20 mL de milieu SD supplémenté avec les acides aminés adéquats et on les met à agiter toute la nuit à 30°C. Après une première centrifugation (20°C, 3000 rpm, 5 minutes), on lave le culot avec 1 mL d'eau stérile. On transfère les levures dans un tube de 1,5 mL que l'on centrifuge 15 secondes à température ambiante et vitesse maximale.

Ensuite, on place les cellules dans 150 µL de tampon de lyse (KCl 0,4 M ; Tris-HCl pH=7,9 50 mM ; 1 mM PIC (antiprotéases)). On rajoute environ le même volume de billes de verre acides (Sigma no. G-8772 ; 0,45 mm) et on vortexe chaque tube trois fois 30 secondes en plaçant les tubes dans la glace entre deux agitations. On sépare ensuite le

surnageant du culot en centrifugeant les tubes 15 minutes à 4°C et à 13000 rpm. On reprend le surnageant qui contient les protéines, il est important d'utiliser ces protéines dans la même journée car elles se dégradent très vite. Avant de les utiliser, il faut notamment mesurer la concentration des protéines extraites par la méthode de Bradford avec un kit Bio-Rad Protein Assay. La gamme de comparaison est une gamme de BSA à 0 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 45 µg/mL et 60 µg/mL. On mélange 10 µL de protéines avec 10 µL de SDS gel-loading buffer 2X (100 mM Tris-Cl (pH=6,8), 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromophenol blue, 20% (w/v) glycérol, 200 mM beta-mercaptoethanol).

4.3.2/ Western blot :

On fait migrer les échantillons (préalablement dénaturés 3 minutes à 100°C et remis sur la glace) sur un gel SDS-PAGE 12% (voir maniais Annexe 8.40-8.45). La migration du gel est faite pendant 2heures à 80 V et on transfère ensuite les protéines séparées sur le gel sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell ; 0,45 µm ;Ref:10 401180) selon la méthode de transfert par immersion. Le transfert est effectué pendant 40 minutes à 100 mA.

Après blocage 30 minutes dans une solution de lait (5%) et PBTw (PBS 1X, Tween 20 0,2%) et 3 lavages successifs au PBTw, on incube l'anticorps anti Lex A (1/5000 dans du PBTw) toute la nuit à 4°C. Le lendemain, on effectue trois lavages au PBTw et on incube la membrane avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé à HRP 1/10000) dans du PBTw pendant 2 heures. Après 3 lavages au PBTw, on produit la réaction chimioluminescente de la peroxydase avec le kit « ECL Western blotting detection reagent » (Amersham Bioscience No : RPN2106).

4.4/ Test d'activation :

- Le test d'activation a pour but de vérifier l'absence d'interactions non spécifiques entre la protéine « appât » et le domaine VP16 présent dans le vecteur pASV4 vide (dans lequel la banque a été clonée). Pour cela, on vérifie la capacité des levures à

pousser sur un milieu sans histidine car un des gènes rapporteurs de l'interaction est le gène de synthèse de l'histidine.

Tout d'abord, on transforme la souche contenant le vecteur pBTM116 dans lequel l'appât est cloné avec pASV4 vide et on sélectionne les levures transformées par les deux vecteurs (milieu SD Trp⁻ Leu⁻). Les colonies qui poussent sont rééталées sur des boîtes contenant le même milieu et après 2 à 5 jours d'incubation à 30°C, les cellules sont récoltées dans 3 mL de milieu SD liquide et la titration des cellules est faite avec un hemocytomètre (voir maniatiss A8.6, A8.7).

On étale 10^5 , 10^6 et $5 \cdot 10^6$ cellules sur des boîtes SD Trp⁻ Leu⁻ His⁻ avec différentes concentrations de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), un inhibiteur de la synthèse de l'histidine (le 3-AT est très toxique il ne faut pas toucher les boîtes sans gants. De plus il se dégrade très rapidement (le mettre dans le milieu après autoclave)). On utilise comme témoin positif une boîte SD Trp⁻ Leu⁻ sur laquelle on étale 500 cellules (test de viabilité).

4.5/ Préparation de la banque :

- La banque qui sera utilisée est une banque d'ADNc d'embryons de drosophile (3-18 heures après la ponte). Ces ADNc sont clonés dans des vecteur pASV4 (voir figure 38). Les vecteurs sont conservés dans des phages.

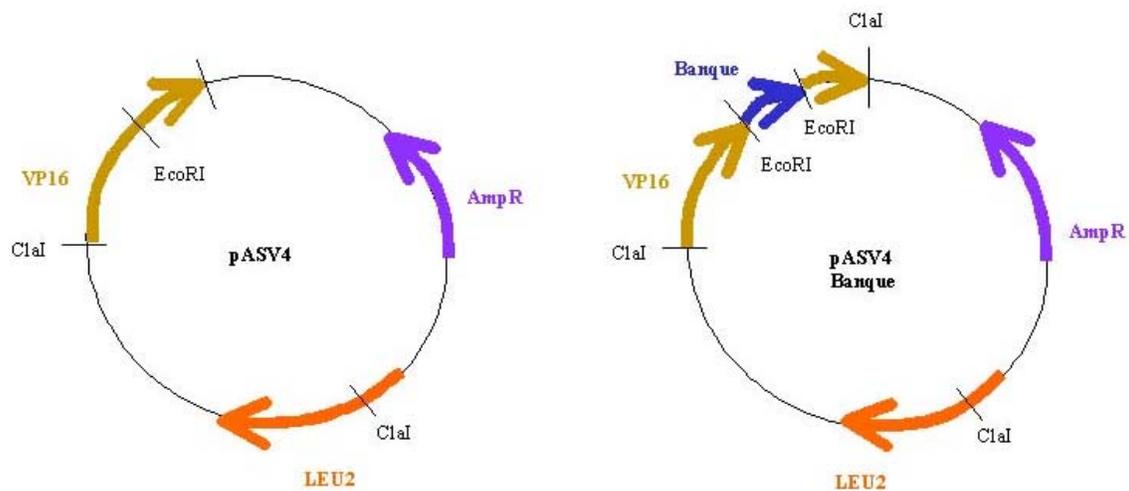


Figure 38 : vecteur pASV4 et construction de la banque.

4.5.1/ Excision de la banque :

A partir d'une colonie de d'E. Coli BNN132 qui a poussé sur une boîte LB, on prépare une culture liquide de 10 mL de LB mise toute la nuit à 32°C. Le lendemain, à partir de 2 mL de cette culture, on réensemence 10 mL de LB + 0,2% maltose + 40 µg/mL Kanamycine mis à agiter à 32°C pendant 4 heures. Après avoir centrifugé les cellules (5 minutes, 3500 rpm à température ambiante), on les resuspend dans 4 mL d'une solution de MgCl₂ 10 mM (fraîchement préparée à partir d'une solution 1M). Puis on ajoute à 1 mL de cette suspension, 100 µL de la banque de phages disponible au laboratoire contenant les vecteurs et on incube les tubes pendant 30 minutes à 32°C sans agitation. On rajoute 2 mL de LB et on continue l'incubation à 32°C pendant 1 heure en agitant. Enfin, après avoir ajouté du DMSO (7% final), on aliquote les bactéries (200 µL) et on les plonge dans l'azote liquide avant de les stocker à -80°C.

On procède ensuite à une titration de cette banque en étalant plusieurs concentrations de bactéries (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) sur des boîtes LB Ampicilline (100 µg/mL).

La banque de phages contient $1,5 \cdot 10^6$ recombinants et lors de l'étalement de la banque on cherche à représenter chaque recombinant. Ainsi, à partir des résultats de la titration, on calcule la quantité de bactéries à étaler pour représenter cette banque

entièrement (20000 colonies/boîtes). Pour étaler les bactéries sur une boîte on dilue les bactéries dans 3 mL de LB, on étale le milieu et laisse sécher la boîte qui est par la suite placée toute la nuit à 37°C.

Le lendemain, on récupère toutes les colonies qui ont poussé en mettant 10 mL de LB dans chaque boîte et en raclant les colonies. Le LB utilisé pour chaque boîte est mélangé, les bactéries sont donc stockées dans 500 mL de LB. Pour purifier l'ADN recombinant des bactéries, on met les 500 mL de LB et bactéries à agiter pendant 30 minutes et on prépare une maxi préparation d'ADN plasmidique selon la méthode de lyse alcaline avec SDS (voir maniat 1.38-1.42) et une purification sur un gradient de chlorure de césium (voir maniat 1.65-1.68).

4.5.2/ Vérification de la complexité :

La complexité de la banque représente la quantité de vecteur à transférer pour que chaque ADNc soit représenté au moins une fois en phase dans le vecteur et dans la bonne orientation.

Calcul de la complexité de la banque :

Le génome compte 14000 gènes X 3 (clonage dans les trois phases)

X 2 (clonage dans les deux orientations)

X 2 (pour augmenter la chance de voir les clones représentés)

Après transformation des levures, on veut donc $2 \cdot 10^5$ colonies.

La titration nous permet d'ajuster la quantité d'ADN de la banque pour avoir ce nombre de colonies (soit 50 boîtes avec $4 \cdot 10^3$ colonies/boîtes).

Vérification de la complexité de la banque :

Afin de vérifier si la banque contient les constructions, il faut vérifier sa complexité par PCR. On fait les PCR sur la préparation de phages (préalablement portée

à ébullition pendant 5 minutes), une préparation d'ADN de mouche et un aliquote de la banque.

	ADN de mouche	Phages	Banque
ADN	5 µL	3,25 µL	5 µL
Taq	0,25 µL	0,25 µL	0,25 µL
dNTP (5mM)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
H ₂ O	24,15 µL	29,15 µL	24,15 µL
Tampon (10X)	5 µL	5 µL	5 µL
oligomères	0,3 µL x 2	0,3 µL x 2	0,3 µL x 2

Tableau 6 : Composition des tubes de PCR pour amplifier l'ADN de mouche, les phages ou la banque purifiée.

Les oligomères choisis sont testés sur les 3 préparations. Ils amplifient les ADN suivants :

teashirt

ACZ208 : 5' GACTCAAACCTCCTCGGAAC 3'

ACZ209 : 5' GATTCCGCCCTTCCATAAAG 3'

5-HT2Dro

AAI129 : 5' GGGGTACCCTTAACCTTTTGGTACTACTAATA 3'

AAI130 : 5' GGGGTACCTGGCACTGGATCCGCGTCTGGGCT 3'

RP49

PG39 : 5' GTGTATTCCGACCAGGTTACA 3'

PF84 : 5' TCCTACCAGCTTCAAGATGAC 3'

panier

ACV65 : 5' GGAATTCCGCAGTGCCTACGATCCGTC 3'

ACV66 : 5' CGGGATCCCGTTTTTCTTGGGCTTTCGTTT 3'

ACV67 : 5' GGAATTCGCGGCAGGAACGCAGCTCTAC 3'

ACV68 : 5' CGGGATCCTTACGAGGTGGCCATCAGTTT 3'

DE-cadhérine

ABP302 : 5' GATACGCTCCTAAGGTCAAAGA 3'

ABP303 : 5' CCTAGACCGTGATGCAATATAC 3'

wingless

ADV300 : 5' TCAGTGTGAGAGTGTGTGT 3'

ADV301 : 5' GGTGAGGACTCTATCGTTCC 3'

ADV302 : 5' CTACAGCCACCAGTCGAGATC 3'

ADV303 : 5' GGTCCGACACAGCCTGCACTTC 3'

armadillo

ADV304 : 5' CCAAGATGAGTTACATGCC 3'

ADV305 : 5' CAGCAGCTTGATCAACTCGG 3'

ADV306 : 5' GATTGCTGTTCAACGAAATC 3'

ADV307 : 5' CAATCTCGCCAACGTCCATGTC 3'

4.6/ Transformation de la banque dans les levures :

Il faut d'abord étaler les levures L40a contenant le vecteur pBTM116-Cterm sur une boîte SD Trp⁻ et les laisser incuber 2 jours à 30°C. Puis on inocule 250 mL de milieu YPD avec ces levures et on incube la culture liquide toute la nuit à 30°C.

Le lendemain, on commence par préparer le mélange de transformation dans l'ordre et en vortexant après chaque ajout : 12 mL de PEG (PM=3350 g/mol) 50% ; 1,8 mL LiAc 1M ; 3 mL d'eau ; 0,5 mL de sperme de saumon (10 mg/mL) et enfin 0,25 mL d'ADN de la banque (1 mg/mL). Pour connaître la quantité d'ADN adéquat, il faut tester l'efficacité de la transformation (voir à la fin du protocole).

On mesure ensuite la DO_{600 nm} qui doit être aux alentours de 0,8-1 (2.10⁷ cellules/mL) et on met les levures dans 5 tubes de 50 mL (5x50) avant de les centrifuger 5 minutes à 3500 rpm et à température ambiante. Puis on lave les cellules dans 50 mL puis 30 mL d'eau stérile en centrifugeant à chaque fois. On resuspend les cellules dans 1,5 mL de LiAc (100 mM), ajuste jusqu'au volume final de 2,5 mL et on incube la suspension 15 minutes à 30°C. On centrifuge les cellules pour enlever le LiAc, on resuspend le culot dans le mélange de transformation et incube les cellules 30 minutes à

30°C en les mélangeant 3 ou 4 fois. Puis on procède au choc thermique en incubant les tubes 40 minutes à 42°C en les remuant toutes les 5 minutes.

Enfin, on centrifuge les tubes pour enlever le mélange de transformation (le PEG empêche les levures de pousser) et on resuspend les cellules dans 250 mL de milieu YPD que l'on laisse incuber 1 heure à 30°C avec agitation. Après avoir centrifugé les cellules, on les reprend dans 30 mL d'eau stérile, on étale 300 µL de la suspension sur des boîtes SD Trp⁻ Leu⁻ de 140 mm (voir le calcul de la complexité) et on laisse les cellules incuber 2 à 5 jours à 30°C. Puis, on récupère les colonies de 10 boîtes dans 2 mL de milieu SD Trp⁻ Leu⁻. On calcule le titre avec un hémodécomètre. Après avoir centrifugé les tubes, le milieu et on resuspend les cellules dans le même volume d'un tampon composé de glycérol 65% ; Tris pH 7,5 10mM ; MgCl₂ 10 mM. Les cellules sont aliquotées par tubes de 1 mL et placées à -80°C. (pas d'azote liquide le taux de survie est plus faible).

▲ Avant de transformer la banque : Il faut tester l'efficacité de transformation avec un aliquote de la banque et le vecteur pASV4 seul. Ainsi on suit le même protocole que pour la transformation de la banque mais en préparant une culture liquide de 125 mL de levures L40a contenant le vecteur pBTM116. De plus, la préincubation dans le LiAc 100 mM se fait dans un volume de 0,75 mL et le mélange de transformation a la composition suivante : 6 mL de PEG ; 0,9 mL de LiAc 1M ; 1,4 mL d'eau ; 0,25 mL de sperme de saumon. A ce stade, on mélange 5 µg de pASV4 vide avec 346 µL de mix de transformation. On mélange le reste de la préparation avec 210 µL de banque (0,6 mg/mL). A la fin de l'expérience, avant d'étaler les cellules, on resuspend celles-ci dans 15 mL d'eau. On étale plusieurs dilutions sur des boîtes SD Trp- Leu- de 140 mm.

4.7/ Criblage de la banque :

- Après avoir transformé les levures avec le vecteur contenant l'appât et celui contenant la banque, il faut tester l'activation des gènes cibles comme la synthèse d'histidine ou de l'activité de la β-galactosidase.

4.7.1/ Test d'activation à l'histidine :

Dans un premier temps, on décongèle un aliquote de levures transformées par les deux vecteurs et après avoir vérifié son titre à l'aide d'un hemocytomètre, on procède à un test de viabilité. Pour ce faire, on étale 500 et 1000 levures sur un boîte SD Trp⁻ Leu⁻.

Après 2 à 5 jours on compte le nombre de colonies qui ont poussé, puis on étale 10^7 cellules (soit 10 fois le nombre de recombinants dans la banque) sur un boîte de 140 mm SD Trp⁻ Leu⁻ et His⁻ (ajouter la quantité de 3-AT définie si nécessaire). On place les boîtes à 30°C pendant 2 à 5 jours. Au bout de 5 jours, on compte le nombre de colonies qui ont poussé.

4.7.2/ Test d'activation qualitatif à la β -galactosidase :

Cette expérience permet de confirmer l'activation observée dans le test histidine. A partir des levures qui ont poussé sur les boîtes SD Trp⁻ Leu⁻ His⁻ du premier test d'activation, on prépare un gel d'agarose 0,5% comprenant 0,5 M de tampon potassium phosphate pH 7 ; 6% DMF ; 0,1% SDS. Après avoir refroidit le gel, on rajoute du β -mercaptoethanol (concentration finale 50 mM) et du X-Gal (concentration finale 0,5 mg/mL). Enfin, on rajoute le gel sur les colonies et quand il est solide on remet les boites à 30°C. Les cellules deviennent bleues au bout de quelques heures.

Tampon potassium-phosphate 0,5 M pH=7 : 61 mL de K₂HPO₄ 1 M

39 mL de KH₂PO₄ 1 M

H₂O qsp 200 mL

Il faut filtrer la solution.

4.7.3/ Test d'activation quantitatif à la β -galactosidase :

Une culture de 15 mL de levures dans un milieu SD Trp⁻Leu⁻His⁻ est placée toute la nuit à 30°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO_{600nm} de 0.5 à 1 ($2 \cdot 10^7$ cellules/ mL).

Après avoir centrifugé les cellules 5 minutes à 3000 rpm à 4°C, on resuspend le culot dans 1 mL d'eau stérile et on transfère les cellules dans un tube de 1,5 mL.

On centrifuge alors le tube 15 secondes à vitesse maximale et on remplace le surnageant avec 150 µL de solution Z (16,1 g de Na₂HPO₄·7H₂O (60 mM final) ; 5,5 g de NaH₂PO₄·H₂O (40 mM final) ; 0,75 g de KCl (10 mM final) ; 0,246 g de MgSO₄·7H₂O (1 mM final) ; 3,5 mL de β-mercaptoéthanol (50 mM final) dans 1 L d'eau à pH 7 et stocké à 4°C sans autoclaver).

On ajoute ensuite un volume équivalent de billes de verre et on met les échantillons dans la glace. On mélange chaque tube 30 secondes à l'aide d'un vortex en les remettant dans la glace entre 2 mélanges. Après une centrifugation de 15 minutes à 4°C à vitesse maximale, on transfère 5 à 50 µL d'extraits protéique dans des tubes de 1,5 mL, on ajuste les volumes à 500 µL avec de la solution Z et on place les tubes 5 minutes à 30°C.

La réaction colorimétrique est commencée par l'ajout de 100 µL d'ONPG (4 mg/mL dissous dans de la solution Z et stocké à -20°C) et l'incubation des tubes à 30°C (mesurer le temps de réaction). La réaction est arrêtée par l'ajout de 250 µL de Na₂CO₃ (noter le temps). On mesure la DO_{420nm} de la solution.

L'activité spécifique (en nmol/mg/min) est calculée comme suit :

$$(DO_{420nm} \times 0,85) / (0,0045 \times \text{protéines} \times \text{volume} \times \text{temps})$$

4.8/ Mise en évidence des interactants avec 5-HT2Dro :

- Dès que l'on a des souches positives pour les deux tests d'activation, on récupère le plasmide contenant l'ADNc de la banque, on le transforme dans des bactéries après avoir séquencé l'insert contenu dans le plasmide, on recherche les séquences homologues avec un logiciel qui procède à des alignements de séquence et reconnaît les séquences homologues (BLAST).

4.8.1/ Extraction d'ADN à partir des levures :

On prépare 20 mL de culture liquide de SD Trp⁻ Leu⁻ His⁻ que l'on met toute la nuit à agiter à 30°C. Le lendemain, on collecte les cellules en centrifugeant 5 minutes à 3500 rpm à température ambiante et après avoir resuspendu les cellules dans 1 mL d'eau stérile (les mettre dans un tube de 1,5 mL), on les centrifuge 15 secondes à température ambiante à vitesse maximale. Puis on resuspend le culot dans 100 µL de tampon de lyse (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1 M, Tris-HCl pH=8 10mM, EDTA 1 mM) et on rajoute 50 µL de phénol et 50 µL de chloroforme et le même volume de billes de verre (0,45 mm). On mélange vigoureusement la solution pendant 2 minutes puis on remet les tubes sur la glace pendant 15 minutes. Après avoir centrifugé 15 minutes à vitesse maximale à 4°C, on récupère la phase aqueuse et on fait une précipitation à l'éthanol (ajouter 10 µL de NaAc 3M et 200 µL d'éthanol). Après avoir placé les tubes 1 heure à -80°C, on les centrifuge 15 minutes à vitesse maximale et à 4°C. On reprend le culot dans 100 µL d'eau.

4.8.2/ Préparation des bactéries compétentes HB101 :

La souche d'E. Coli HB101 a le génotype suivant : F⁻, thi-1, hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻) supE44, recA13, ara14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (str^r), xyl5, mti-1.

Elle est utilisée pour sa capacité à discriminer les deux vecteurs pASV4 et pBTM116. Mais cette discrimination n'est pas totale (en moyenne 1 colonie sur 15 contient pASV4).

Voici le protocole suivi pour préparer les bactéries compétentes pour l'électroporation.

On ensemence un « starter » de 50 mL de LB à 37°C toute la nuit. Le lendemain, on ensemence une culture de 500 mL de LB à partir de 10 mL de la culture de la nuit. (DO_{600nm}maximale= 0,4-0,5). Pendant ce temps, on refroidit 2 L d'eau bidistillée préalablement stérilisée. Puis, on refroidit la culture 1 à 2 heures à 4°C avant de la répartir dans 10 tubes de 50 mL. Il faut alors centrifuger les tubes à 4500 rpm pendant 10 minutes à 4°C, avant de resuspendre les bactéries dans 8 mL d'eau stérile (remettre dans

4 tubes (20mL/tubes)). Pour resuspendre les bactéries, il faut les mettre sur balancette à 4°C. On refait la manipulation plusieurs fois en reprenant les bactéries dans 10 mL (remettre dans 2 tubes de 50 mL), puis 10 mL (volume final dans 1 TUBE DE 50 mL) de glycérol 10% (le glycérol pur est à 85%), et enfin dans 2 mL de glycérol (85%). On aliquote les bactéries suspendues dans le glycérol par 50 µL, avant de les congeler dans l'azote liquide et les placer à -80°C.

4.8.3/ Transformation des levures et extraction de l'ADN :

Les bactéries compétentes HB101 ont été transformées avec 6 µL d'ADN de levures par la technique d'électroporation (voir maniatiss 1.119-1.122).

Les transformants sont incubés dans 200 µL de LB et on étale le tout sur une boîte de 90 mm de milieu M9 supplémenté en thiamine HCl (1mL d'une solution stock à 10 mg/mL), en proline (20 mL d'une solution stock à 10 mg/mL) et en ampicilline (concentration finale 100 µg/mL). On met les boîtes à incuber 2 à 3 jours à 37°C. L'efficacité de transformation doit être de 10⁷ colonies pour l'électroporation de 1 µg de vecteur sur une boîte LB ampicilline.

4.8.4/ Séquençage et BLAST.

Lorsque l'on a des colonies, on prépare des cultures liquides dans 2 mL de LB ampicilline et on procède à une extraction d'ADN (mini préparation) selon la méthode lyse alcaline avec du SDS (voir maniatiss 1.32-1.34). Une digestion Cla I de toutes les mini préparations permet de vérifier la présence du vecteur pASV4 et pas pBTM116. Puis après avoir visualisé les souches positives pour le vecteur pASV4 de la banque, on transforme une souche XL1Blue par la méthode du chlorure de calcium à partir des mini préparations. On étale les bactéries sur une boîte LB ampicilline. A partir d'une culture liquide de 2 mL, on fait une mini préparation selon la technique de lyse alcaline avec du SDS. A la fin de cette expérience on reprend l'ADN dans 300 µL de TE et 3 µL de RNase. Puis on refait une étape de phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Enfin, on reprend l'ADN dans 50 µL d'eau.

On séquence le plasmide à partir de la mini préparation avec trois oligomères compris dans le plasmide pASV4:

VN234 : 5' GCCCTTGGAATTGACGAGTA 3'

ACX214 : 5' CAATAATTCCAAAGAAGCAC 3'

RC119 : 5' TGAGCAATGTTTACCGATG 3'

Le séquençage est effectué selon la méthode des dideoxynucléotides fluorescents de Sanger (principe voir maniat 12.6)

Enfin, on recherche la séquence dans les bases de données sur internet à l'aide du logiciel BLAST.

RESULTATS

Chapitre 1

*Etude d'un mutant ponctuel
dans le gène du récepteur*

5-HT2Dro

Les premières études du rôle de la sérotonine et du récepteur 5-HT2Dro au cours de l'extension de la bandelette germinative ont été faites sur une souche contenant une délétion dans la région chromosomique du gène du récepteur. Le phénotype cuticulaire « double ligne » a été non seulement observé dans cette souche mais aussi dans une souche transgénique exprimant l'ARNm anti-sens du récepteur 5-HT2Dro. De plus, une troisième souche mutée dans le gène punch, dans laquelle la sérotonine n'est pas synthétisée, présente aussi un phénotype « double ligne ». Ce phénotype cuticulaire est accompagné par un défaut de gastrulation ainsi qu'une mauvaise localisation apico-basale des jonctions cellulaires dans les cellules ectodermiques de l'embryon (Colas et al. 1999).

Mon travail de thèse a porté sur l'étude d'un mutant ponctuel appelé M51, létal, dans le gène du récepteur 5-HT2Dro (souche isogénique pour la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro). La sérotonine présente une plus forte affinité pour le récepteur muté par rapport au récepteur sauvage. L'étude de l'extension de la bandelette germinative des embryons mutants montre que les cellules ectodermiques migrent plus rapidement et s'arrêtent plus tôt que chez un embryon sauvage. Le phénotype cuticulaire « fantôme » des embryons M51 confirme cet arrêt précoce de la gastrulation.

L'étude des cuticules et de la gastrulation d'embryons mutants de la souche l(3R)4830b qui contient la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro que la souche M51 présente un phénotype différent que les embryons homozygotes M51. En effet, les embryons ne présentent pas de denticules dans le segment abdominal 4 (« A4 sans denticule »). Ce phénotype est moins dramatique que celui des embryons « fantômes ». Ils présentent aussi une plus faible accélération de la gastrulation par rapport aux embryons homozygotes M51. Comme les 2 souches ont la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro mais dans des fonds génétiques différents. Nous avons alors cherché à comprendre la raison de ces différences phénotypiques entre les embryons homozygotes M51 et l(3R)4830b. Une première hypothèse révélant une interaction entre les voies de signalisation du récepteur 5-HT2Dro et de Hairy (présent sur le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b) a été écartée. Une deuxième hypothèse a alors été faite. Elle implique alors l'interaction génétique entre le gène du récepteur 5-HT2Dro et une mutation supplémentaire, dans un

gène non encore identifié, situé sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b. Des résultats préliminaires nous permettent de confirmer cette dernière hypothèse.

1/ Mise en évidence d'une mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :

1.1/ Caractérisation génétique de mutants potentiels dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :

Une mutagenèse réalisée avec de l'éthyl-méthyl sulfate (EMS) et effectuée par Megraw et Kaufman (1998) a permis de mettre en évidence plusieurs mutants dans la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro (82C5). Ces souches sont disponibles dans la banque de données mondiale des drosophilistes (Flybase) et sont appelées l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c, l(3R)4833c et l(3R)4839d. Les lettres b, c et d font références aux groupes de complémentation mis en évidence par Megraw et Kaufman.

Ces souches sont répertoriées en fonction des résultats de croisements avec les déficiences Df(3R)110 et Df(3R)6-7. La déficience Df(3R)110, contre laquelle ces souches sont létales, enlève le gène du récepteur 5-HT2Dro alors que la déficience Df(3R)6-7, contre laquelle les souches sont viables, ne couvre pas cette région (figure 39).

Afin de restreindre la région dans laquelle ces souches sont susceptibles d'être mutées, un criblage génétique a été effectué avec les souches Df(3R)HTRI (contenant le gène du récepteur) et Df(3R)HTR6 disponibles au laboratoire (figure 39). Ainsi, les souches l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c sont mutées dans la région couverte par Df(3R)HTRI mais pas Df(3R)HTR6 alors que la souche l(3R)4839d n'est pas mutée dans un gène couvert par ces délétions. Les souches l(3R)4831d et l(3R)4839d

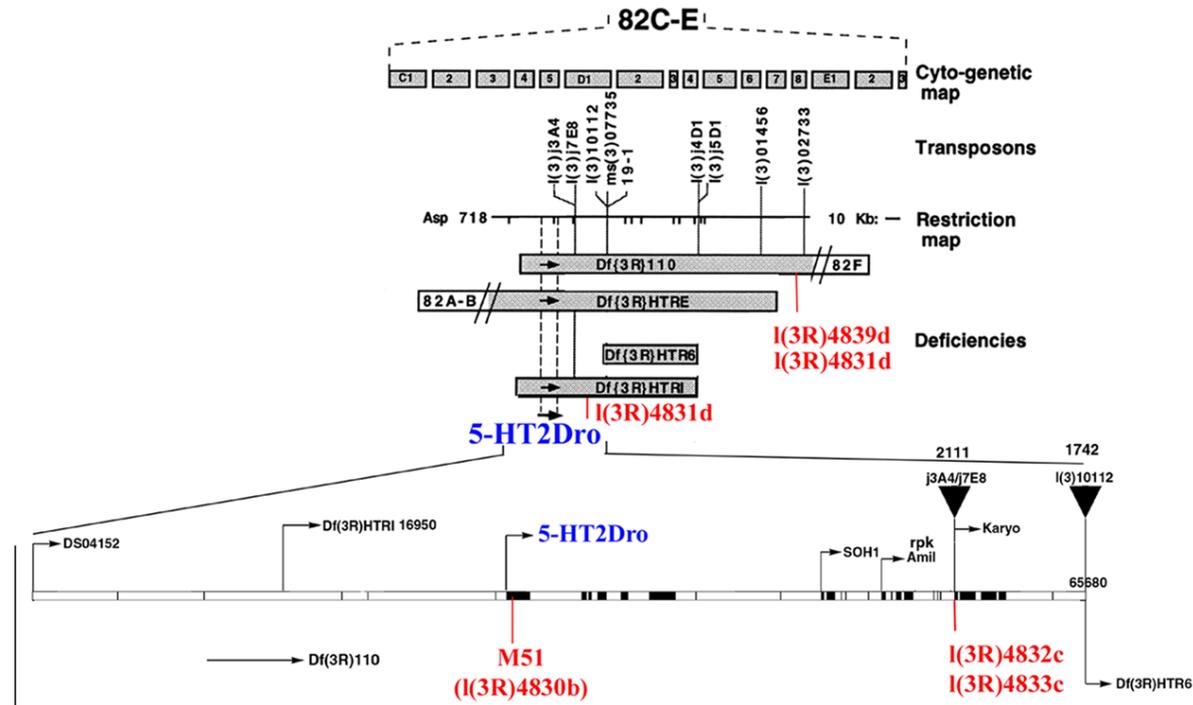


Figure 39 : Carte de la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro.

Les numéros des souches testées sont indiqués en rouge. Les souches I(3R)4839d et I(3R)4831d présentent une mutation dans un même gène situé à l'intérieur de la déficience Df(3R)110 mais pas dans les autres déficiences. La souche I(3R)4831d contient une deuxième mutation dans un gène contenu dans la déficience Df(3R)HTRI. Les souches I(3R)4832c et I(3R)4833c sont mutées dans le gène de la karryoferrine. Enfin, la souche I(3R)4830b (notée M51) est mutée dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

sont répertoriées dans le même groupe de complémentation et donc mutées dans le même gène. Après vérification, on en déduit que la souche l(3R)4831d présente 2 mutations : l'une dans le même gène que l(3R)4839d et l'autre dans la région du gène du récepteur 5-HT2Dro (figure 39).

Les souches l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c sont ensuite testées contre une souche P2111 contenant une insertion létale de transposon dans le gène de la karyofferine. Il s'est avéré que la progéniture de ces croisements avec la souche P2111 est stérile pour les souches l(3R)4832c et l(3R)4833c.

A l'issue de cette première étape, on peut dire que les mutations dans les souches l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c sont présentes dans la région chromosomique du gène du récepteur 5-HT2Dro. Les souches l(3R)4832c et l(3R)4833c sont mutées dans le gène de la karyofferine et la souche l(3R)4831d présente 2 mutations différentes. A l'issue de ces croisements, seules les souches l(3R)4830b et l(3R)4831d sont encore potentiellement mutées dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

1.2/ Mise en évidence d'une mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro :

La présence de mutations dans le gène du récepteur 5-HT2Dro a été testée dans les souches l(3R)4830b et l(3R)4831d. Pour ce faire, l'ADN codant pour les exons du gène du récepteur 5-HT2Dro des embryons homozygotes a été amplifié et séquencé.

Une mutation ponctuelle a été mise en évidence dans le premier exon du gène du récepteur dans la souche l(3R)4830b. Cette mutation affecte la structure primaire du domaine N-terminal du récepteur et change la proline 52 en sérine (figure 40). La souche l(3R)4831d ne présente pas de mutation dans ce gène.

● M51 → S

```

1 MEMQSYSGRG PSTGTSETAT ATAAVASASA SDTAATFTLR HFNCRLLEAD WPGPRQPFID CEGSHTNSTS YTPSSLPTSK NLIEGPNNTF QCARQAIDEA 100
101 EHNAFYSCDG ESPLSENCTL RLKARLLRWP YEAYEHIRLA INGALSDYAS DKLSDSSSCD EGGMVLQCKL GQAHHELLLCH LQQLEREPLR EVGSAEESFS 200
201 NDSLLQAFQI ELGAERDGLW SFLNLSELME PDHGFLGIMN VTNTSLDMFL ENLTALNTTS TASTADMATE FAVTKSFLDY SPHGYDFLEFL FVVFIFAGG 300
301 LGNILVCLAV ALDRKLQNVY NYFLFSLAIA DLLVSLFVMP MGAIPAFLGY WPLGFTWCNI YVTCVDLACS SSILHMCFIG LGRYMGIRNP LGSRRHSTKR 400
401 LTGIKIAIVW VMAMMVSSSI TVLGLVNEKS IMPEPNICVI NNRAFFVFGS LVAFYIPLM MVTYALTIP LLRKKARFAA EHPSEPFRR LGGRFTLRPQ 500
501 HSQQQLQMPF SFGSNNKFL SMGDGNRNFN TEGEMEEGGA PSRRSGVEPA ERPLMQORTA SSRSMGTVSF RNVVNGTSGA AGSGRRTTGT AHSSPFRFSGA 600
601 GILRHSSSSP ASSCHSTSTS RSSSEWRKHG GYPNLMDRLA IHLRLSLVPP SSHPNRRASV RVTISQPQLG YPTNVGGNGG RTVGATEVGA GNGSSAGRT 700
701 SNSSLGGTSL MKIATIQGPI LNQQAAGGN HMQVKVKTPTA LKPEEPQRNK VRPFKFAENR VATPTLNLRF LNNRSKRNSL SANAVATEQK ATKVLGLVFF 800
801 TFVLCWSPFF ILNIIFAACP ECQVPEHVVN TCLWLGYVSS TINPIIYTIF NRTFRAAFIR LLKCNCKR* 869

```

I
II
III
I

IV
V

VI
VII
VI

Figure 40 : Séquence primaire du récepteur 5-HT2Dro.

La protéine contient 869 acides aminés. Les cadres délimitent les hélices transmembranaires dont le numéro est indiqué en chiffres romains. La mutation ponctuelle M51 remplace la proline 52 en sérine (notation en rouge) dans le domaine N-terminal du récepteur.

1.3/ La mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro change ses propriétés pharmacologiques :

La liaison de certains agonistes et antagonistes du récepteur 5-HT2Dro a été testée sur le récepteur muté, transfectés dans des cellules COS-1. Cette étude a mis en évidence un gain d'affinité de la sérotonine pour le récepteur 5-HT2Dro muté par rapport au récepteur sauvage (tableau 7). En effet, la concentration de sérotonine nécessaire pour lier le récepteur 5-HT2Dro muté est 10 fois plus faible que celle nécessaire à la liaison du récepteur sauvage. Il en est de même pour la dexfenfluramine ou la kétansérine. En revanche, l'affinité de la 5-CT ou la bufoténine est plus faible pour le récepteur muté que pour le récepteur sauvage.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 7.

	5-HT2Dro	5-HT2Dro muté
Agonistes		
Tryptamine	5,69	5,71
5-HT	6,69	7,95
α -méthyl 5-HT	6,38	6,43
5-CT	5,77	4,55
Dexfenfluramine	7,76	8,28
Antagonistes		
Ritansérine	8,10	8,17
Mélusergine	7,11	7,15
Kétansérine	7,39	8,07
Bufoténine	6,68	5,87
Yohimbine	6,51	6,47

Tableau 7 : Expérience de pharmacologie.

Les valeurs correspondent au pKi moyen qui représente l'affinité de la molécule pour le récepteur testé. $pK_i = -\log(\text{concentration inhibitrice } 50)$

La mutation dans le domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro influence la liaison de la sérotonine à ce récepteur mutant M51 dont l'affinité est plus forte que pour le récepteur sauvage.

2/ Phénotype cuticulaire de la souche M51 :

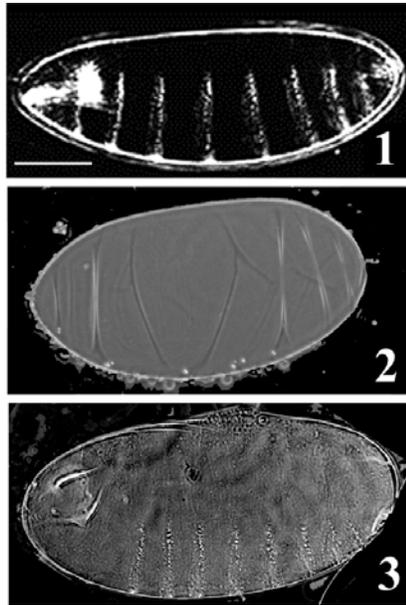
Dans la souche M51, le chromosome 3 a été nettoyé par recombinaisons afin de ne garder que la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro. La souche est donc isogénique, ne contenant que la mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

2.1/ Phénotype cuticulaire de la souche M51 :

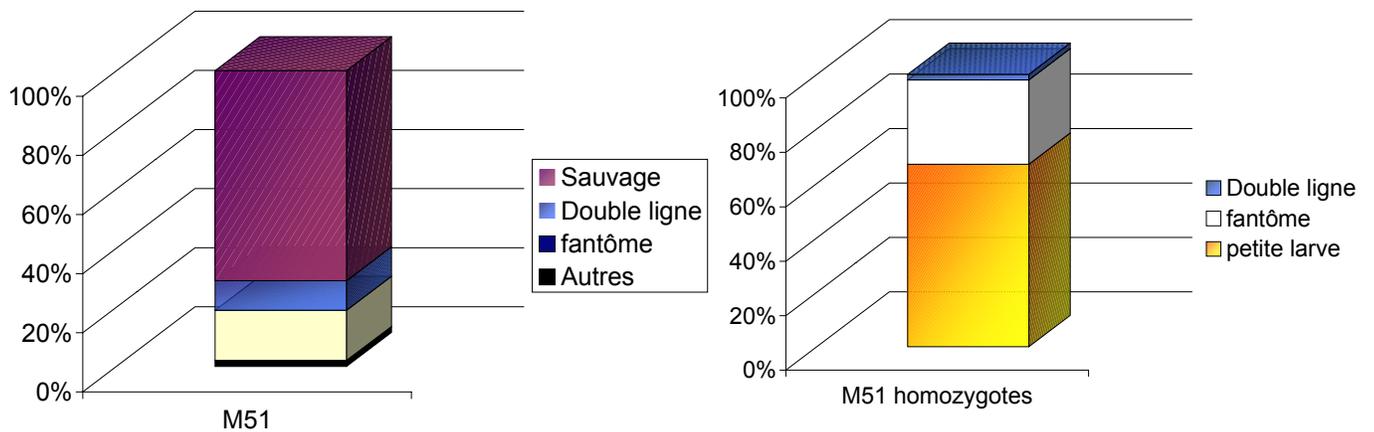
La souche M51 est létale à l'état homozygote et stockée à l'aide d'un chromosome balancier contenant le gène de la GFP (« green fluorescent protein ») sous le contrôle du promoteur du gène *Krüppel*.

L'analyse des cuticules des embryons qui n'ont pas éclos 72 heures après leur ponte, a montré plusieurs classes phénotypiques parmi lesquelles on distingue des embryons sauvages (figure 41A), des « fantômes » ou « double ligne » (figure 41B et C). La répartition des différents phénotypes cuticulaires est présentée dans la figure 41D et le tableau 8.

L'analyse de la létalité des embryons M51 a montré que 30% des embryons meurent pendant l'embryogenèse. Il apparaît donc que les embryons homozygotes balanciers et homozygotes mutants meurent pendant l'embryogenèse. L'analyse des embryons M51 qui n'ont pas éclos 72 heures après la ponte contient ces 2 catégories de génotype. Nous avons voulu connaître le phénotype précis des embryons homozygotes M51. Afin de distinguer les embryons homozygotes mutants des autres embryons, l'étude des embryons GFP négatifs (homozygotes M51) a montré que 67% des embryons éclosent entre 24 et 48 heures et meurent tôt au cours du premier stade larvaire. Les embryons qui n'éclosent pas présentent essentiellement un phénotype « fantôme » (figure 41 et tableau 8).



A



B

C

Figure 41 : Phénotype cuticulaire de la souche M51.

(A1) Cuticule d'un embryon sauvage. (A2) Cuticule d'un embryon « fantôme », la cuticule est formée mais il n'y a pas de denticules ni de structures de la tête. (A3) Cuticule d'un embryon présentant des denticules mais pas de structures de la tête. (B) Graphique présentant la proportion de chaque classe phénotypique observé dans la souche M51 et (C) parmi les seuls embryons homozygotes M51.

	M51 (n=214)	M51 Homozygotes (n=80)
Sauvage	71%	
Double ligne	10%	2%
Fantôme	17%	31%
Petite larve		67%
A4 sans denticule	1%	
Autres	1%	

Tableau 8 : Répartition des différentes classes phénotypiques cuticulaires de la souche M51.

La population M51 correspond à la totalité des embryons qui n'éclosent pas alors que les M51 homozygotes représentent la population des embryons GFP négatifs.

2.2/ Etude de l'extension de la bandelette germinative des embryons M51 :

L'étude de la souche Df(3R)HTRI a montré que le récepteur 5-HT2Dro joue un rôle prépondérant au cours de l'extension de la bandelette germinative (Colas et al. 1999). La gastrulation des embryons M51 a donc été enregistrée en vidéo-microscopie et analysée à l'aide d'un logiciel développé spécialement (voir matériel et méthode et figure 42A).

On remarque dans un premier temps que les cellules mésodermiques des mutants ne s'invaginent pas correctement par rapport aux embryons sauvages. Sur la figure 42A (WT), l'invagination du mésoderme est révélée par les mouvements cellulaires similaires à une contraction (mesoderm) avant le temps t=0 minute. Sur la figure 42A, ces cellules ne commencent à migrer qu'au temps t=0 minute. De plus, le sillon céphalique (cf) apparaît plus large chez les embryons mutants que chez les sauvages, traduisant un défaut de la force de poussée des cellules ectodermiques sur le sillon céphalique lors de l'extension de la bandelette germinative (figure 42A).

Le calcul des vitesses entourant les cellules polaires (cellules surlignées en bleu dans la figure 42A) a été faite selon la méthode décrite dans la figure 42B. On distingue 4 étapes avec 4 vitesses différentes au cours de l'extension de la bandelette germinative.

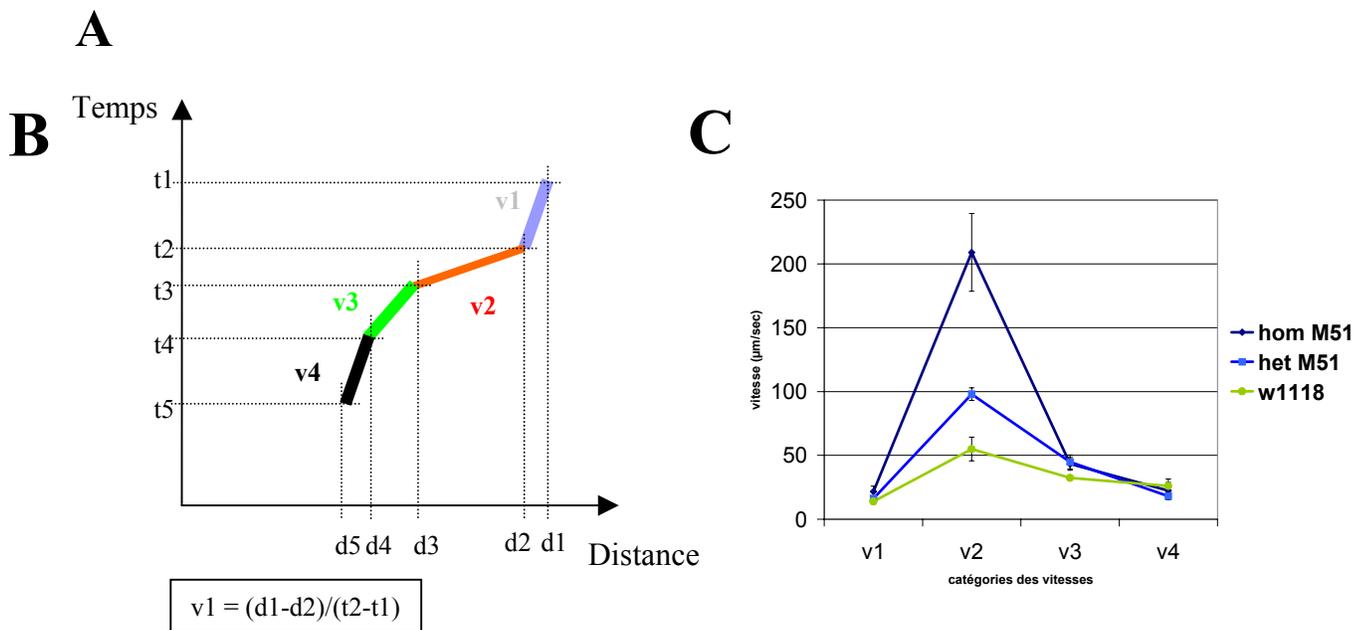
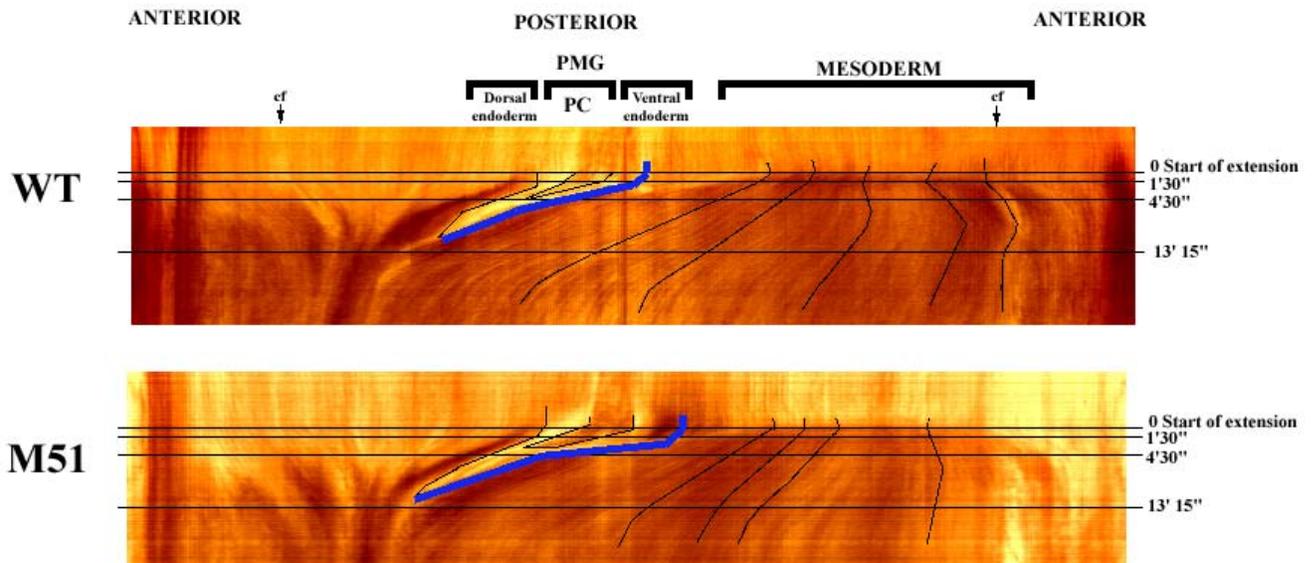


Figure 42 : Etude de l'extension de la bandelette germinative des embryons M51.

(A) Etude des enregistrements video de l'extension de la bandelette germinative.

L'échelle des temps est indiquée à droite, le temps 0 correspond à l'invagination du mésoderme. Les lignes verticales noires correspondent à la trajectoire de cellules ectodermiques. Les cellules polaires (PC) et le sillon des cellules polaires (PMG) sont indiquées. Les vitesses des cellules surlignées en bleu ont été calculées et représentées en C.

(B) Explications des calculs de vitesse des cellules. On distingue 4 étapes de vitesses différentes (v1 à v4). (C) Mesure des vitesses des cellules ectodermiques dans des embryons homozygotes M51, des embryons hétérozygotes M51, et sauvages.

La figure 42C répertorie les vitesses des 4 étapes d'embryons homozygotes M51, d'embryons hétérozygotes et sauvages (w1118). On constate que si la gastrulation commence à la même vitesse (v1) chez tous les embryons, les cellules accélèrent et atteignent une vitesse (v2), modérée dans l'embryon sauvage, mais beaucoup plus importante lors de la gastrulation des embryons homozygotes M51. On remarque aussi que les embryons hétérozygotes M51 présentent une vitesse v2 intermédiaire entre celle des embryons sauvages et homozygotes M51. La forte augmentation de la vitesse v2 des cellules ectodermiques dans les embryons homozygotes M51 entraîne une invagination prématurée des cellules polaires (PC sur la figure 42A). Les cellules ralentissent ensuite progressivement et atteignent les vitesses v3 puis v4. Les vitesses sont données dans le tableau 9.

catégories de vitesses en $\mu\text{m}/\text{sec}$	w1118 n=3	Hétérozygote M51 n=5	Homozygote M51 n=6
v1	14+2.08	16.2+1.99	21.67+4.25
v2	55+9.39	98+4.93*	209+30.48*
v3	32.33+1.45	44.8+5.98*	43.33+5.04*
v4	26+5.59	18+2.7	22.5+6.18

Tableau 9 : Mesure des vitesses des cellules ectodermiques au cours de la gastrulation.

(*) données significativement différentes $p \leq 0.05$

La souche M51, isogénique pour la mutation gain d'affinité dans le gène du récepteur 5-HT2Dro, présente un défaut de gastrulation. Le feuillet mésodermique ne s'invagine pas correctement et le sillon céphalique est plus large dans les embryons mutants que dans les embryons sauvages. De plus, lors de la phase rapide de l'extension de la bandelette germinative, les cellules ectodermiques migrent beaucoup plus rapidement dans les embryons mutants que les sauvages. De manière intéressante, la vitesse de gastrulation des embryons hétérozygotes M51 est intermédiaire.

2.3/ L'expression des gènes wingless et engrailed est normale :

La mutation gain d'affinité dans le gène du récepteur 5-HT2Dro entraîne une létalité larvaire et embryonnaire. Les embryons mutants qui présentent un défaut de gastrulation meurent tôt au cours du développement embryonnaire. Ce défaut est traduit au niveau cuticulaire par le phénotype « fantôme ». Comme ce phénotype ne présente pas de denticules, nous avons voulu étudier l'effet de cette mutation sur la segmentation des embryons homozygotes M51.

La figure 43 montre que l'expression des protéines Wingless et Engrailed est inchangée dans les embryons homozygotes M51 par rapport aux embryons contrôles. Les embryons hétérozygotes M51 mis en évidence par un marquage contre la GFP présente sur le chromosome balancier sous la dépendance du promoteur du gène *Krüppel* que dans les embryons sauvages car ils présentent un phénotype normal vis à vis d'Engrailed et de Wingless ((Ingham and Hidalgo 1993; Gustavson et al. 1996)). Ils ont donc été pris comme contrôles.

La mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro est létale soit lors de la gastrulation de l'embryon, soit pendant le premier stade larvaire. Les embryons qui meurent tôt présentent un défaut de gastrulation et un phénotype cuticulaire appelé « fantôme ». Malgré l'absence de denticules dans les embryons « fantômes », l'expression de Wingless et Engrailed est inchangée dans les embryons homozygotes mutants M51.

3/ Etude du phénotype de la souche l(3R)4830b :

Il est intéressant de constater que le phénotype cuticulaire de la souche l(3R)4830b est différent de celui de la souche M51. En effet, les deux souches contiennent la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro dans des fonds génétiques différents. L'étude des souches l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c a

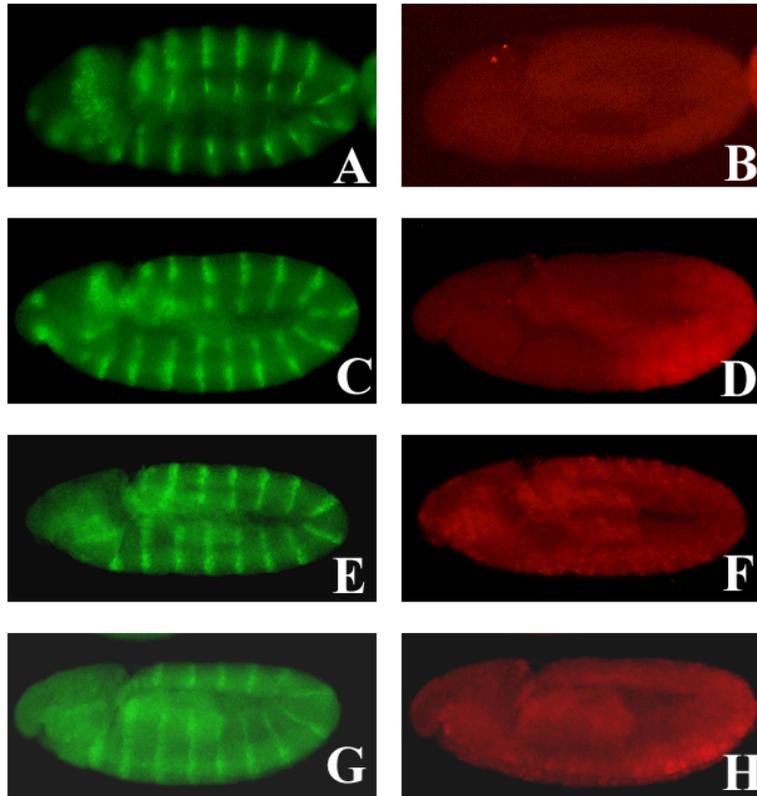


Figure 43 : Expression des protéines *Wingless* et *Engrailed* dans des embryons de stade 9.

La souche étudiée est M51/ TM3 Kr-GFP. On peut différencier les embryons homozygotes et hétérozygotes à l'aide d'anticorps dirigés contre la GFP. Les embryons hétérozygotes sont marqué dans les cellules exprimant Krüppel (postérieur-ventral sur les photos D et H). Les embryons homozygotes pour la mutation ne présentent pas de marquage GFP (B,F). (A,C) Expression de *Wingless*. (E,G) Expression de *Engrailed*.

montré que cette différence phénotypique n'est pas due à la différence de fond génétique entre les souches M51 et l(3R)4830b.

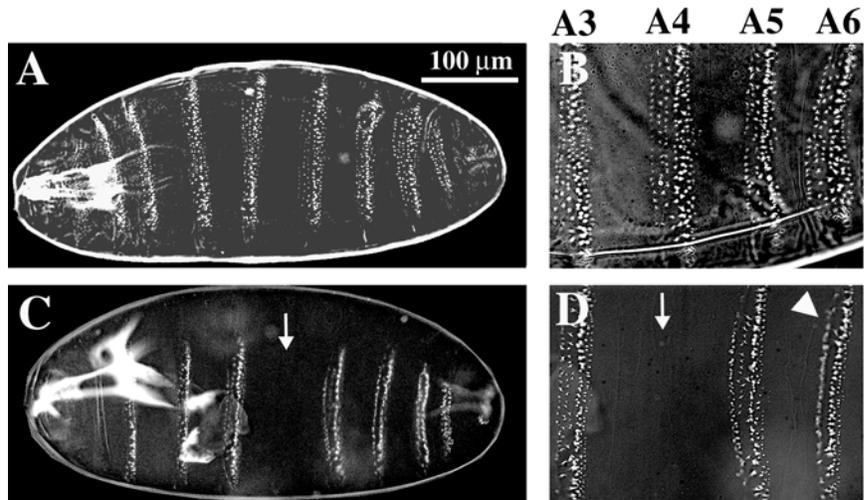
3.1/ Phénotype cuticulaire de la souche l(3R)4830b :

La souche l(3R)4830b présente un phénotype cuticulaire particulier sans denticule dans le quatrième segment abdominal (figure 44C,D). La répartition des différents phénotypes parmi les embryons qui n'ont pas éclos 72 heures après la ponte (mélange d'homozygotes mutants et d'homozygotes balanceurs) montre que 15% de ces embryons présentent ce phénotype cuticulaire alors que la souche M51 ne présente que 1% d' « A4 sans denticule ». Cette répartition est donnée dans la figure 44E et dans le tableau 10.

Nous avons voulu vérifier l'influence éventuelle du fond génétique, c'est-à-dire celle des marqueurs récessifs présents sur le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b mais pas sur celui de la souche M51 et celle du chromosome balanceur sur le phénotype cuticulaire. Pour cela l'étude des cuticules d'embryons des souches l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c a été faite. Ces souches présentent aussi le phénotype « A4 sans denticule » mais dans de très faibles proportions par rapport à la souche l(3R)4830b. La mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro joue donc un rôle dans la formation du phénotype « A4 sans denticule ».

	M51 n=214	l(3R)4830b n=2500	l(3R)4831d n=500	l(3R)4832c n=88	l(3R)4833c n=180
Sauvage	71%	63%	76%	75%	70%
A4 sans denticule	1%	15%	2%	4%	6%
Double ligne	10%	2%	7%	10%	6%
Fantôme	17%	22%	10%	11%	14%
Autres	1%	0%	6%	0%	4%

Tableau 10 : Répartition des différentes classes phénotypiques cuticulaires dans les souches M51, l(3R)4830b, l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c.



B

Figure 44 : Phénotypes cuticulaire de la souche *l(3R)4830c* contenant la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

(A,B) Vue ventrale d'un embryon sauvage avec les 7 rangées de denticules. (C,D) Vue ventrale d'un embryon ne présentant pas de denticules dans le segment abdominal A4. (E) Répartition des phénotypes observés dans la souche M51 (mutée dans le gène du récepteur 5-HT2Dro après nettoyage du chromosome), *l(3R)4830b* (avant le nettoyage du chromosome), *l(3R)4831d*, *l(3R)4832c* et *l(3R)4833d* présentant le même fond génétique que *l(3R)4830b*.

3.2/ Les embryons homozygotes l(3R)4830b présentent une expression ectopique de Wingless :

Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT2Dro et de la protéine Fushi-tarazu est sauvage dans les embryons homozygotes l(3R)4830b (figure 45A et B) (Colas et al. 1995).

De plus, l'absence de denticules dans le quatrième segment abdominal nous a poussé à vérifier l'expression des gènes de polarité segmentaires impliqués dans la formation des denticules Engrailed et Wingless. L'expression d'Engrailed dans les embryons homozygotes l(3R)4830b est identique à celles d'embryons sauvages (figure 45C) (Gustavson et al. 1996). En revanche, on observe une expression ectopique de Wingless entre les bandes 9 et 10 par rapport à son motif d'expression sauvage (flèche dans la figure 45D).

Au début de la gastrulation les expressions d'Engrailed et Wingless sont dépendantes l'une de l'autre et deviennent, par la suite indépendantes (voir chapitre 4 de l'introduction). Comme la formation d'une bande ectopique est spécifique de la protéine Wingless, l'expression de cette protéine à différents stades du développement embryonnaire a été suivie (figure 46). On a pu constater qu'aux stades précoces de la gastrulation, l'expression de Wingless est la même dans les embryons homozygotes mutants que dans les embryons sauvages (figure 46A (stade 6) et B (stade 8)) (Ingham and Hidalgo 1993). Puis, au début du stade 9 (figure 46C et D), la bande numéro 10 s'élargit par rapport aux autres bandes et se dédouble à la fin de l'extension de la bandelette germinative (figure 46E et F). Enfin, cette expression ectopique persiste au cours de la rétraction de la bandelette germinative (figure 46G et H).

Les embryons homozygotes l(3R)4830b présentent un phénotype cuticulaire spécifique sans denticules dans le segment abdominal 4. Ce phénotype est accompagné par l'expression ectopique de Wingless tant au niveau protéique que de l'ARNm (résultats non montrés). L'expression ectopique de Wingless est donc régulée transcriptionnellement.



Figure 45 : La souche l(3R)4830b présente une expression ectopique de Wingless.
 L'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT2Dro (A) et de la protéine Fushi tarazu (B) est inchangée dans des embryons de stade 7 de la souche l(3R)4830b. De même l'expression d'Engrailed (stade 9) est similaire à celle d'un embryon sauvage du même stade (C). En revanche, les embryons de stade 9 présentent une expression ectopique (flèche) de Wingless entre les bandes 9 et 10 (D).

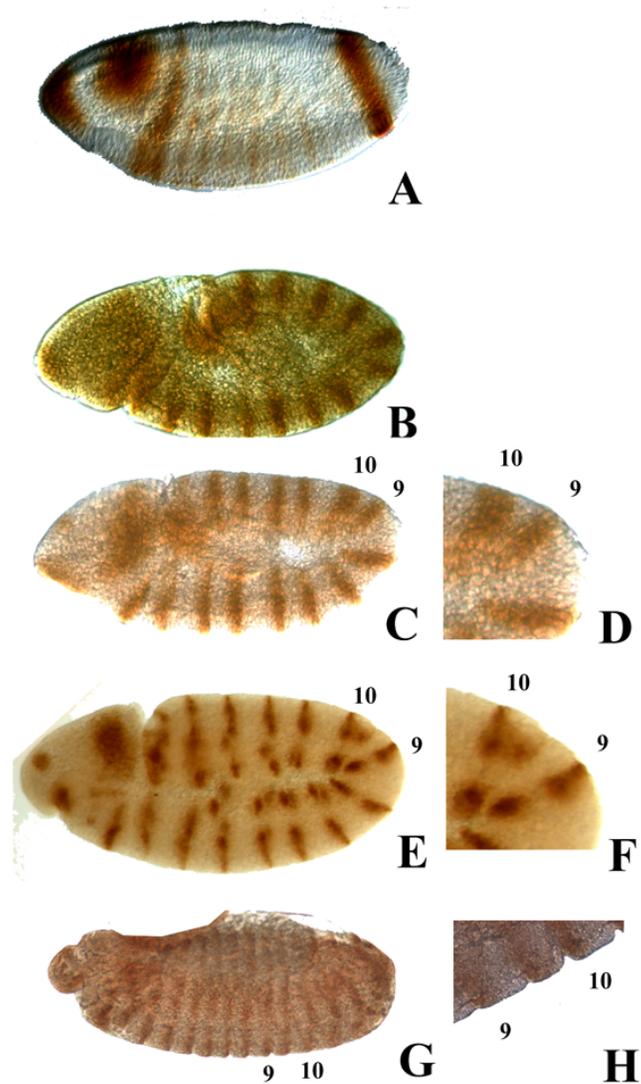


Figure 46: Expression de Wingless à différents stades chez les embryons homozygotes l(3R)4830b.

(A,B) L'expression de Wingless est similaire à celle d'un embryon sauvage du stade 6 au stade 13, puis la dixième bande devient plus large par rapport aux autres bandes (C,D) et se dédouble en fin d'extension de la bandelette germinative (E,F). Cette expression ectopique persiste après la rétraction de la bandelette germinative (G,H).

De plus, la régulation de l'expression ectopique de *Wingless* par le récepteur *5-HT2Dro* est faite alors que le boucle de rétrocontrôle entre *Engrailed* et *Wingless* a été dérégulée.

3.3/ Les embryons de la souche *l(3R)4830b* présentent un défaut de gastrulation :

L'analyse de l'extension de la bandelette germinative des embryons homozygotes *l(3R)4830b* a montré que cette souche présente des défauts de gastrulation similaires à ceux de la souche M51. En effet, dans la figure 47A, on peut voir que les cellules mésodermiques ne migrent pas correctement et que le sillon céphalique (cf) est plus large dans les embryons mutants que dans les embryons sauvages. De plus, lorsqu'il arrive au niveau du sillon céphalique, le sillon des cellules polaires (PMG) arrête sa migration et repart légèrement vers la partie postérieure de l'embryon (figure 47A).

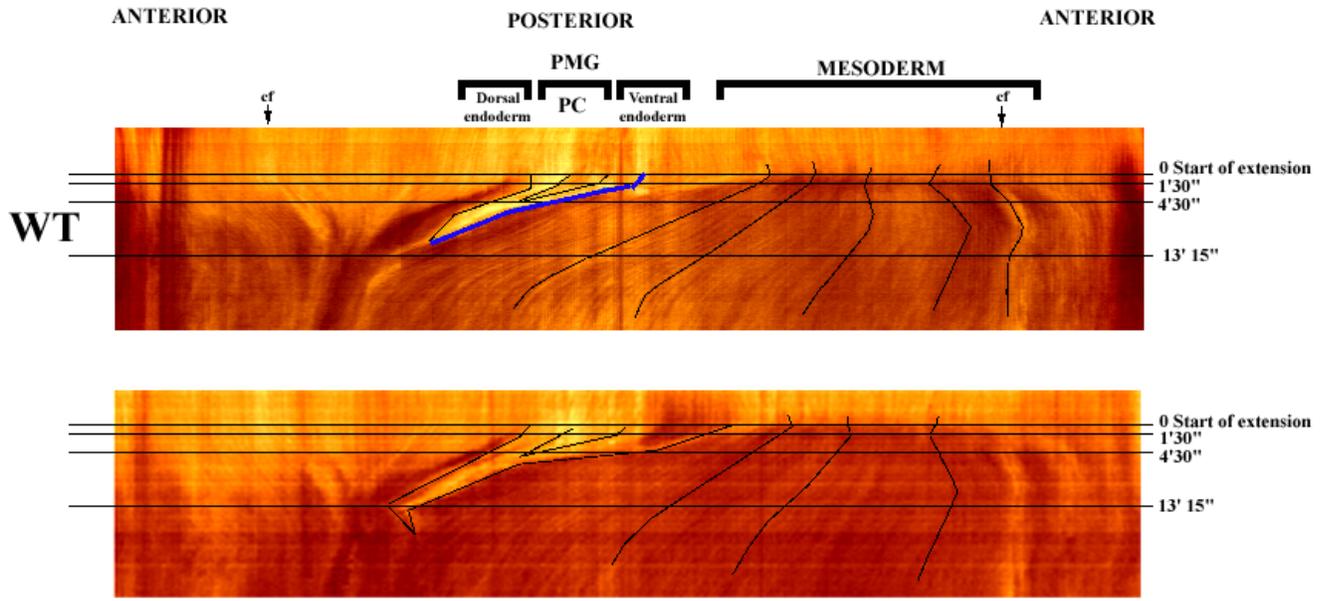
Le calcul des vitesses des cellules qui entourent les cellules polaires a été fait de la même manière que pour la souche M51. La vitesse de la deuxième phase de l'extension de la bandelette germinative des embryons mutants (v_2 dans la figure 47B et tableau 11) est plus élevée que celle des embryons sauvages mais n'atteint cependant pas la vitesse v_2 des embryons homozygotes M51. Ces différences sont significativement différentes. Il en est de même pour les vitesses des embryons hétérozygotes (figure 47C et tableau 11). Tout comme la souche M51, la souche *l(3R)4830b* ralentit (vitesse v_3 encore significativement différente par rapport au sauvage) avant d'atteindre la vitesse v_4 identique à celle des embryons sauvages.

Catégories des vitesses en $\mu\text{m}/\text{sec}$	w1118 n=3	Hétérozygote M51 n=5	Homozygote M51 n=6	Hétérozygotes <i>l(3R)4830b</i> n=4	Homozygotes <i>l(3R)4830b</i> n=11
v_1	14+2.08	16.2+1.99	21.67+4.25	22+1.87	21.27+2.68
v_2	55+9.39	98+4.93*	209+30.48*	78.75+12.56*	147+15.32*
v_3	32.33+1.45	44.8+5.98*	43.33+5.04*	56+10.46*	51.09+4.39*
v_4	26+5.59	18+2.7	22.5+6.18	35.5+1.85	31.9+1.3

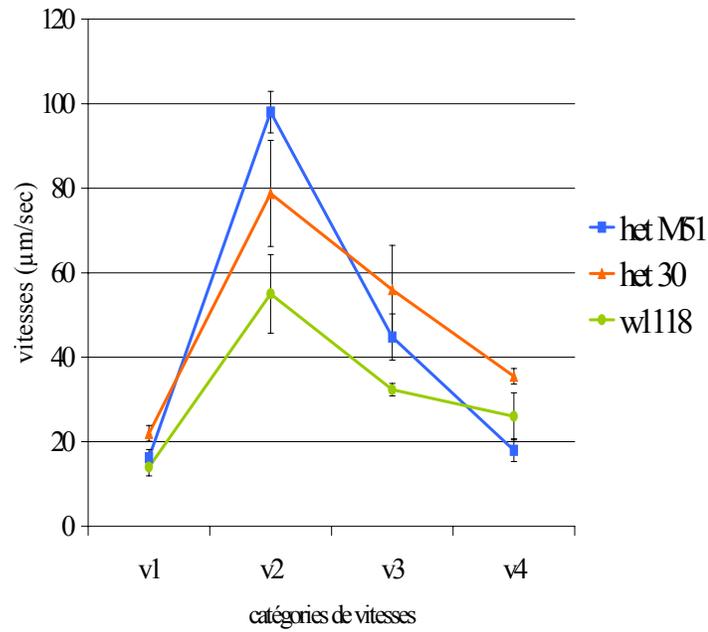
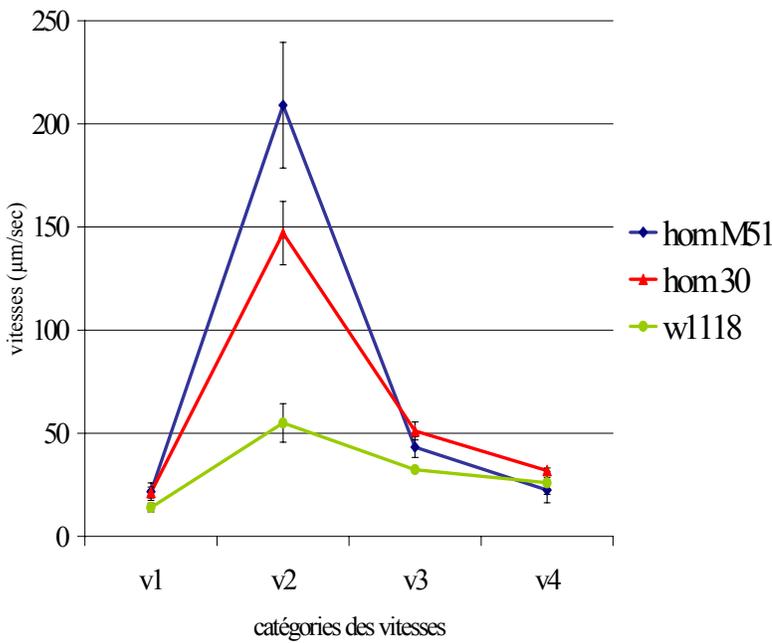
Tableau 11 : Mesure des vitesses des cellules ectodermiques au cours de la gastrulation.

(*) données significativement différentes $p \leq 0.05$

A



l(3R)4830b



B

Figure 47 : Etude de l'extension de la bandelette germinative de la souche l(3R)4830b.

(A) Etude de l'enregistrement video de l'extension de la bandelette germinative. L'échelle des temps est à droite, les cellules polaires (PC) et le sillon des cellules polaires (PMG) sont visibles. Les vitesses des cellules surlignées en bleues ont été calculées et sont représentées en B (homozygotes M51 et l(3R)4830b (hom30)) et C (hétérozygotes).

C

L'analyse des mouvements cellulaires au cours de l'extension de la bandelette germinative des embryons de la souche l(3R)4830b montre qu'ils présentent des défauts de gastrulation similaires à ceux de la souche M51. Cependant, malgré une forte augmentation de la vitesse des cellules ectodermiques, celles-ci n'atteignent tout de même pas les vitesses observées chez les embryons M51 ni à l'état homozygote, ni à l'état hétérozygote.

Nous avons cherché à comprendre la raison des différences phénotypiques entre les souches l(3R)4830b et M51. Il est possible que la souche l(3R)4830b présente non seulement la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro, mais aussi une mutation dans un deuxième gène impliqué dans le même processus cellulaire. Cette deuxième mutation atténuerait le phénotype de la souche M51.

4/ Recherche d'une interaction potentielle entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro :

4.1/ La mutation hairy 1 (h1) peut présenter un phénotype « A4 sans denticule » :

Le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b contient plusieurs marqueurs récessifs et notamment une mutation hypomorphe dans le gène *hairy* appelée *hairy 1* (h1).

Il a été montré en 1995 par P.W. Ingham et ses collègues que la mutation h1 est essentiellement associée à la formation de soies surnuméraires sur les ailes des mouches adultes mais qui présente 30% de létalité. Cependant, parmi les larves et les adultes, 25% des individus présentent un défaut dans la formation des segments abdominaux et le quatrième segment abdominal est le plus souvent affecté. Lorsque la souche h1 est croisée avec souche contenant une autre mutation *hairy* dominante perte de fonction, la progéniture de ce croisement contient 2 mutations différentes dans le même gène : on dit que l'individu est trans-hétérozygote. Dans ce cas, le phénotype est aggravé car la létalité de ces souches trans-hétérozygotes est de 65%. De plus, 95% des adultes qui éclosent présentent un défaut dans le quatrième segment abdominal (Ingham et al. 1995).

4.2/ Le phénotype « A4 sans denticule » n'est pas la conséquence d'une interaction entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro :

Dans un premier temps, l'analyse du phénotype cuticulaire d'une souche isogénique h1 a révélé que cette souche ne présente pas d'individu avec le phénotype « A4 sans denticule » (figure 49 et tableau 12). Ce résultat est en contradiction à celui observé par P.W. Ingham et ses collègues. En revanche, environ 30% des embryons ont un phénotype « fantôme » et n'éclosent pas, ce qui est en accord avec l'étude de P.W. Ingham et ses collègues qui ont observé également une létalité de 30% pour cette souche h1.

Le phénotype cuticulaire de la souche h1 est aggravé lorsqu'il est placé dans une souche en trans-hétérozygote face à une mutation dominante perte de fonction (Ingham 1995). Il est donc possible que la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro et la mutation h1 coopèrent pour donner le phénotype « A4 sans denticule ». Afin de vérifier cette hypothèse, on a effectué des recombinaisons entre les souches isogéniques h1 et M51 contenant le gène du récepteur 5-HT2Dro muté afin de construire une souche ne contenant que les mutations h1 et M51 (souche h1-M51). La figure 48 présente le génotype de chaque souche étudiée. L'analyse du phénotype cuticulaire des embryons h1-M51 a montré que cette souche ne présente pas d'individu avec le phénotype « A4 sans denticule » mais une majorité d'embryons sauvages et « fantômes » (figure 49 et tableau 12). La même expérience a aussi été faite avec une souche mutante perte de fonction pour Hairy (hC1) et a confirmé l'absence d'interaction génétique entre les produits des gènes *hairy* et *5-HT2Dro* (résultats non montrés).

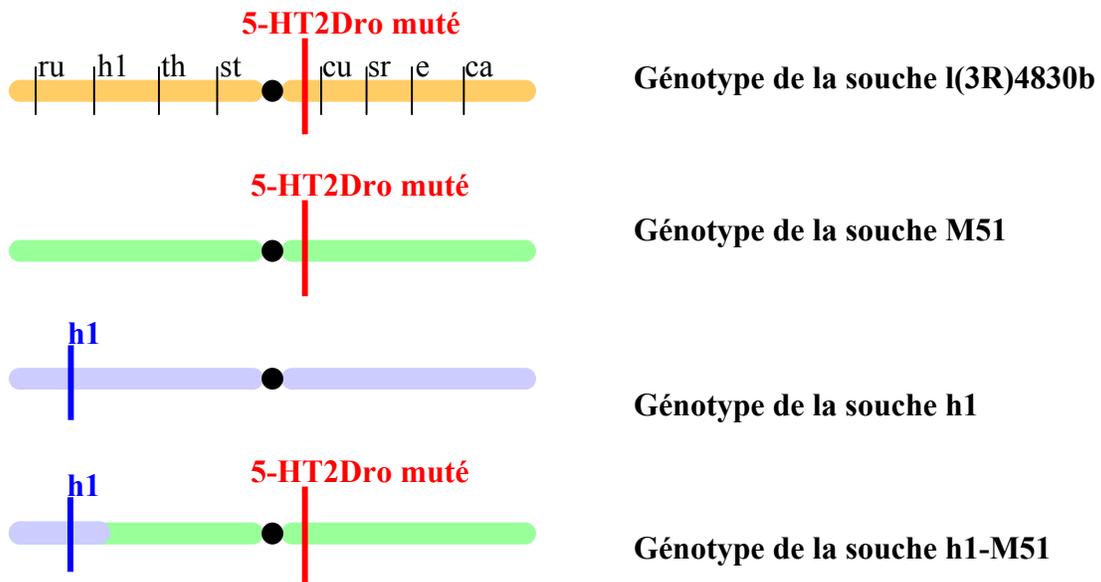


Figure 48 : Génotype des souches utilisées lors des recombinaisons permettant la construction d'une souche h1-M51.

Le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b contient plusieurs marqueurs dont une mutation hypomorphe dans le gène *hairy* appelée h1. Le chromosome 3 de la souche M51 a été nettoyé à partir du chromosome de la souche l(3R)4830b et ne contient plus aucun marqueur. La recombinaison entre les souches isogéniques M51 et h1 permet la formation d'une souche ne contenant que les mutations h1 et M51 sur le chromosome 3.

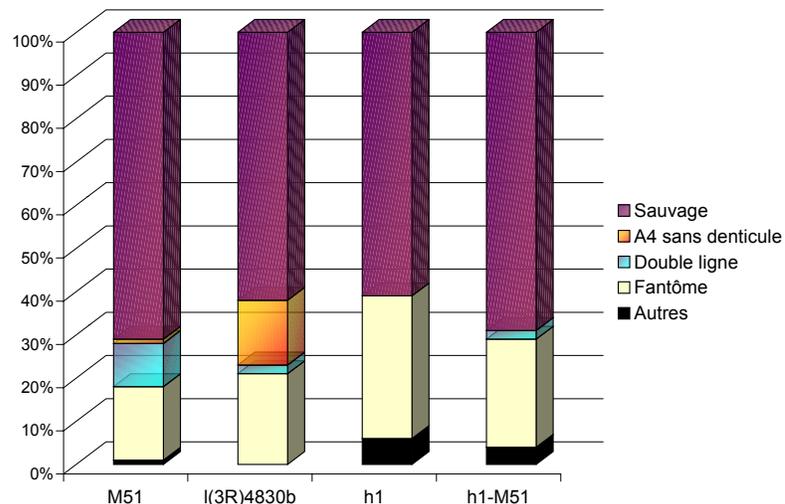


Figure 49 : Répartition des phénotypes cuticulaires dans les souches M51, l(3R)4830b, h1 et h1-M51.

	M51 n=214	l(3R)4830b n=2500	h1 n=282	h1-M51 n=489
Sauvages	71%	63%	61%	69%
A4 sans denticules	1%	15%	0%	0%
Double ligne	10%	2%	0%	2%
Fantômes	17%	22%	33%	25%
Autres	1%	0%	6%	4%

Tableau 12 : Répartition des différentes classes phénotypiques cuticulaires dans les souches M51, l(3R)4830b, h1 et h1-M51.

La mutation h1 dans la souche isogénique étudiée au laboratoire n'affecte pas la formation du segment A4. La construction de la souche h1-M51 par recombinaison a permis de tester l'hypothèse selon laquelle une interaction génétique serait possible entre le facteur de transcription Hairy et le récepteur de la sérotonine 5-HT2Dro. L'analyse des phénotypes cuticulaires et de leurs répartitions, a montré que l'apparition du phénotype « A4 sans denticule » n'est pas le fait de la combinaison des mutations h1 et M51.

5/ Le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b contient une mutation létale :

5.1/ Mise en évidence d'une mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b:

Après avoir montré que Hairy et le récepteur 5-HT2Dro n'agissent pas ensemble sur la formation du quatrième segment abdominal, l'existence éventuelle d'une deuxième mutation sur le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b a été recherchée. En effet, le phénotype cuticulaire de cette souche a toujours ségrégué avec le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b. De plus, la disparition du phénotype « A4 sans denticule » avait été observé après le nettoyage du bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b.

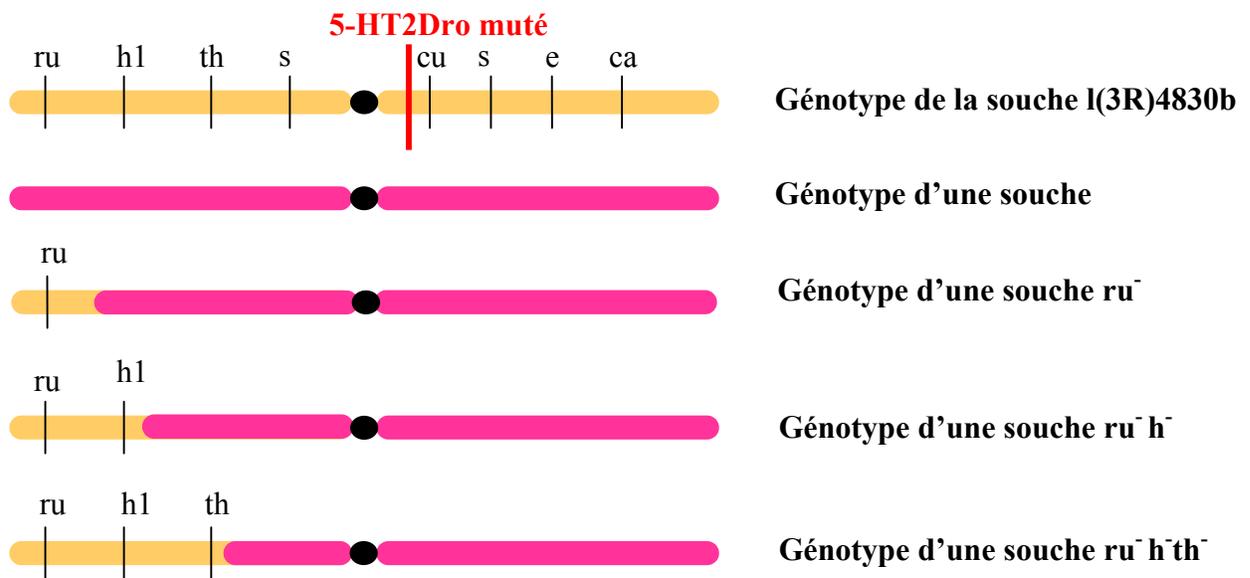


Figure 50 : Génotype des souches recombinées dans la partie gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b.

Le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b présente plusieurs gènes mutés de manière récessive, notamment *rough* (ru), *hairy* (h) et *thread* (th) sur le chromosome 3L.

Afin d'isoler la partie distale du bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b, des recombinaisons ont été effectuées entre les chromosomes de cette souche et une souche sauvage.

Dans chaque catégories de recombinants, plusieurs souches ont été étudiées.

100% des souches ru⁻ sont viables.

50% des souches ru⁻h⁻ sont viables.

0% des souches ru⁻h⁻th⁻ sont viables.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué plusieurs recombinaisons entre les chromosomes d'une souche sauvage et la souche l(3R)4830b afin d'isoler des parties distales du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b de taille différentes (figure 50). Ainsi, nous avons pu isoler des souches contenant uniquement le marqueur *rough* (ru^-) dans la partie la plus distale du chromosome, d'autres souches contenant les marqueurs *rough* et *hairy* (ru^-h^-) et enfin plusieurs souches contenant les marqueurs *rough*, *hairy* et *thread* ($ru^-h^-th^-$) (figure 50).

Il a par la suite été montré que 100% des souches ru^- sont viables à l'état homozygote alors que seulement la moitié des souches ru^-h^- est viable (sur 5 souches ru^-h^- 3 sont létales et 2 viables) et la totalité des souches $ru^-h^-th^-$ sont létales. Nous en avons conclu qu'il existe une mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b entre le marqueurs *hairy* et *thread*.

5.2/ Localisation de la mutation létale dans la région 67A2-67D13 du chromosome 3 :

Etant donné que toutes les souches $ru^-h^-th^-$ et la moitié des souches ru^-h^- sont létales à l'état homozygote, nous en avons conclu que le gène muté est situé entre *hairy* et *thread*. Les souches recombinées mutantes et la souche l(3R)4830b ont donc été croisées avec plusieurs souches contenant des déficiences comprises dans la région située entre *hairy* et *thread* (pour le génotype des souches voir matériel et méthode) afin de rétrécir la région d'intérêt (figure 51A).

Les souches $ru^-h^-th^-$, ru^-h^- létales (dite h1-m) et l(3R)4830b sont viables contre la plupart des souches déficientes. Cependant, face à la déficience Df(3L)AC1 (67A2-67D11-13) (figure 51A) les différentes souches mutées sont semi létales car quelques adultes de phénotype sauvage éclosent très tardivement (16-18 jours après la ponte). Nous en avons conclu que le gène muté entre *hairy* et *thread* sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b est compris dans la région couverte par Df(3L)AC1.

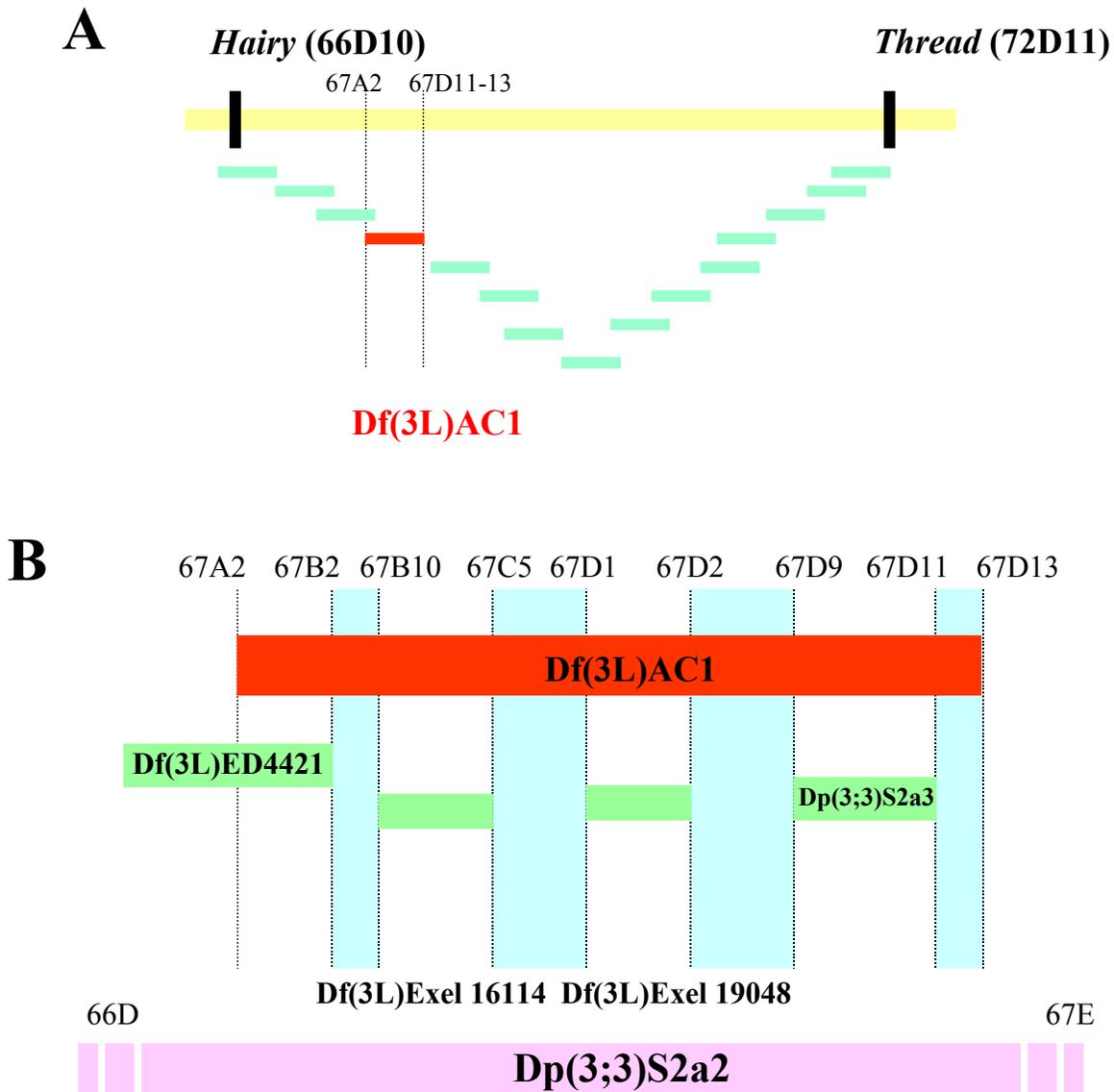


Figure 51 : Carte de la région mutée sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche *l(3R)4830b*.

(A) Carte de la région comprise entre les gènes *hairy* et *thread*. La souche *l(3R)4830b* a été croisée avec plusieurs souches contenant des délétions dans cette région. Seule la progéniture du croisement avec la souche *Df(3R)AC1* présente un phénotype (semi-létal).

(B) Carte de la région couverte par *Df(3R)AC1*. La souche *l(3R)4830b* est croisée avec plusieurs souches contenant des petites délétions dans cette région. La progéniture est létale avec *Dp(3;3)S2a2* mais pas avec les autres souches.

La délétion Df(3L)AC1 enlève 900 kilobases dans la région 67A2-D11-13 comprenant 142 gènes. On a donc voulu subdiviser cette région en plusieurs parties pour restreindre encore la région d'intérêt (figure 51B). Ainsi, nous avons croisé les différentes souches mutantes contre des souches contenant des petites déficiences (en vert sur la figure 51B). Tous les croisements ont révélés que les souches mutantes sont viables contre les souches déficientes. Aussi, nous pouvons en conclure que la mutation est contenue dans les parties bleues de la figure 51B non couverte par des déficiences. Ces régions bleues couvrent 500 kilobases et 61 gènes. Enfin, le croisement des souches mutantes ru^hth^h ou h1-m létales avec la grande déficience Dp(3 ;3)S2a2 est léthal. Ce résultat nous oriente vers l'hypothèse d'un gène muté au niveau d'un point de cassure de la déficience Df(3L)AC1. Cette hypothèse est en cours d'analyse (voir discussion).

5.3/ Phénotype cuticulaire de souches contenant la mutation dans la région 67A2-67D13 (h1-m) :

L'analyse des cuticules des embryons de la souche h1-m non éclos 72 heures après la ponte a révélé que seul 1% des embryons présente le phénotype « A4 sans denticule » alors que 11% des embryons présentent un phénotype « fantôme » et 11% « double ligne » traduisant potentiellement des défauts de gastrulation (figure 52B et tableau 13). On peut donc en conclure, que le phénotype « A4 sans denticule » n'est pas le fait de la seule mutation dans la région 67A2-67D11-13 dans la souche l(3R)4830b qui contient cette mutation et celle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le produit du gène muté dans la région 67A2-67D11-13 interagirait génétiquement avec celui du récepteur 5-HT2Dro, on a effectué des recombinaisons entre une souche h1-m et la souche M51 (figure 52A). L'analyse de ces souches a montré que 9% des embryons présentent un phénotype « A4 sans denticule ». Ce résultat confirme l'hypothèse d'une interaction entre le deuxième gène muté et la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

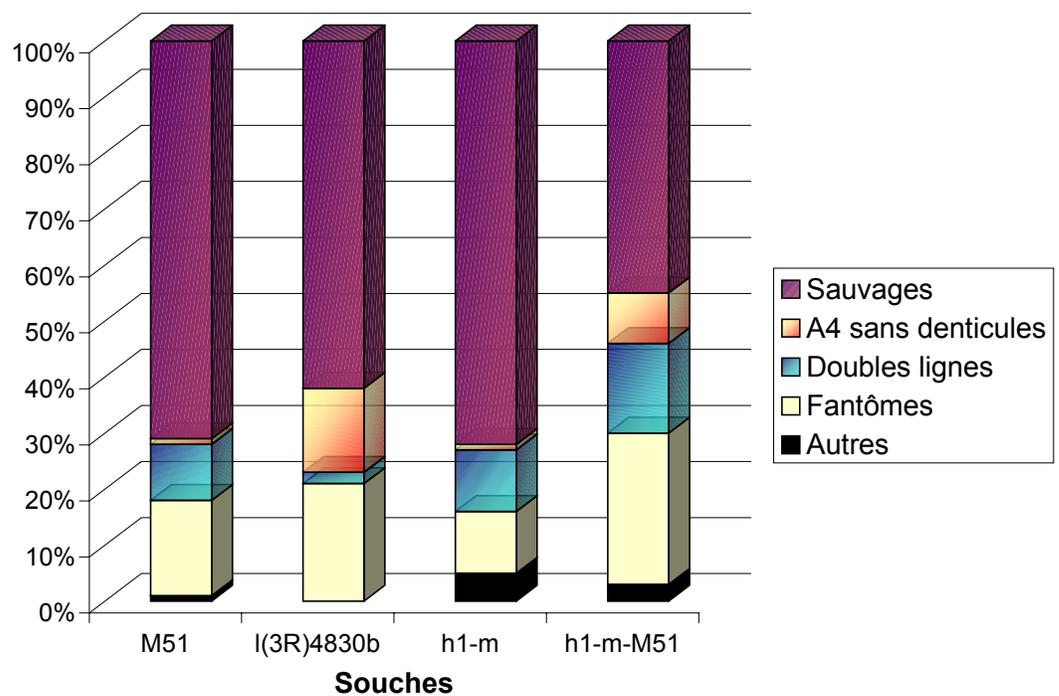
A**B**

Figure 52 : Génotype et Phénotype des souches $ru^- h^-$ -M51 (dite h1-m-M51).

(A) Génotype d'une souche $ru^- h^-$ contenant la mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3, de la souche M51 et d'une souche produite par la recombinaison entre $ru^- h^-$ et M51 (souche h1-m-M51).

(B) Répartition des phénotypes cuticulaires de chaque souche observée.

	M51 n=214	l(3R)4830b n=2500	h1-m n=161	h1-m-M51 n=143
Sauvages	71%	63%	72%	45%
A4 sans denticules	1%	15%	1%	9%
Doubles lignes	10%	2%	11%	16%
Fantômes	17%	22%	11%	27%
Autres	1%	0%	5%	2%

Tableau 13 : Répartition des différentes classes phénotypiques cuticulaires dans les souches M51, l(3R)4830b, h1-m et h1-m-M51.

On a mis en évidence une mutation létale sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b dans un gène non identifié situé dans la région couverte par Df(3L)AC1 (67A2-67D11-13). L'analyse des phénotypes cuticulaires d'une souche mutante dans cette région a montré que le phénotype « A4 sans denticule » n'est pas le seul fait de cette mutation car seul 1% des embryons n'ont pas de denticules dans le quatrième segment abdominal. La construction d'une souche comprenant cette mutation et celle située dans le gène du récepteur 5-HT2Dro par recombinaison a permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle les produits de ces deux gènes agissent ensemble dans le même processus biologique ayant pour conséquence l'absence de denticule dans le segment abdominal 4.

Chapitre 2

Recherche des effecteurs secondaires du récepteur 5-HT2Dro par la technique du double-hybride

Afin de mettre en évidence des protéines susceptibles d'interagir directement avec le récepteur 5-HT2Dro, un crible double hybride a été effectué sur une banque d'ADNc d'embryons de drosophiles âgés entre 3 et 18 heures. Ce crible a permis de mettre en lumière une interaction entre le domaine C-terminal du récepteur et la sous unité régulatrice de la PKA (PKA-R1).

1/ Principe de l'expérience de double hybride :

L'expérience de double hybride dans les levures a d'abord été mise au point pour mettre en évidence des interactions protéiques directes entre différents facteurs de transcription. Par la suite, cette technique a été développée pour l'étude de toutes sortes d'interactions protéiques directes.

Pour cela deux vecteurs contenant des gènes de protéines de fusions sont transfectés dans les levures. La première protéine de fusion contient l'appât qui correspond à notre protéine d'intérêt (5-HT2Dro sur la figure 53) fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription LexA. La deuxième protéine de fusion comprend des protéines issues d'une banque (ici venant d'ARNm d'embryons de drosophile âgés de 3 à 18 heures) fusionnées avec le domaine d'activation du facteur de transcription VP16. Lex A et VP16 n'ont pas la capacité d'interagir entre eux sans le rapprochement préalable des deux domaines auxquels ils sont liés. Ainsi l'interaction protéique entre l'appât et la protéine de la banque permet l'activation de la transcription des gènes cibles tels que le gène de synthèse de l'histidine ou la β -galactosidase (figure 53B). En revanche, si les deux protéines d'intérêt n'interagissent pas, les gènes cibles ne sont pas transcrits (figure 53C).

L'étude des interactions directes entre un récepteur couplé aux protéines G et d'autres molécules par la méthode du double hybride dans les levures est délicate. En effet, les RCPG contiennent 7 hélices transmembranaires qui empêchent l'entrée correcte de la protéine de fusion dans le noyau. Comme la troisième boucle intracellulaire et le domaine C-terminal des RCPG sont connus pour être les domaines d'interactions privilégiés avec les protéines intracellulaires, les chercheurs ont commencé à isoler ces domaines protéiques et à les utiliser comme appât. Aussi, depuis plusieurs années, les

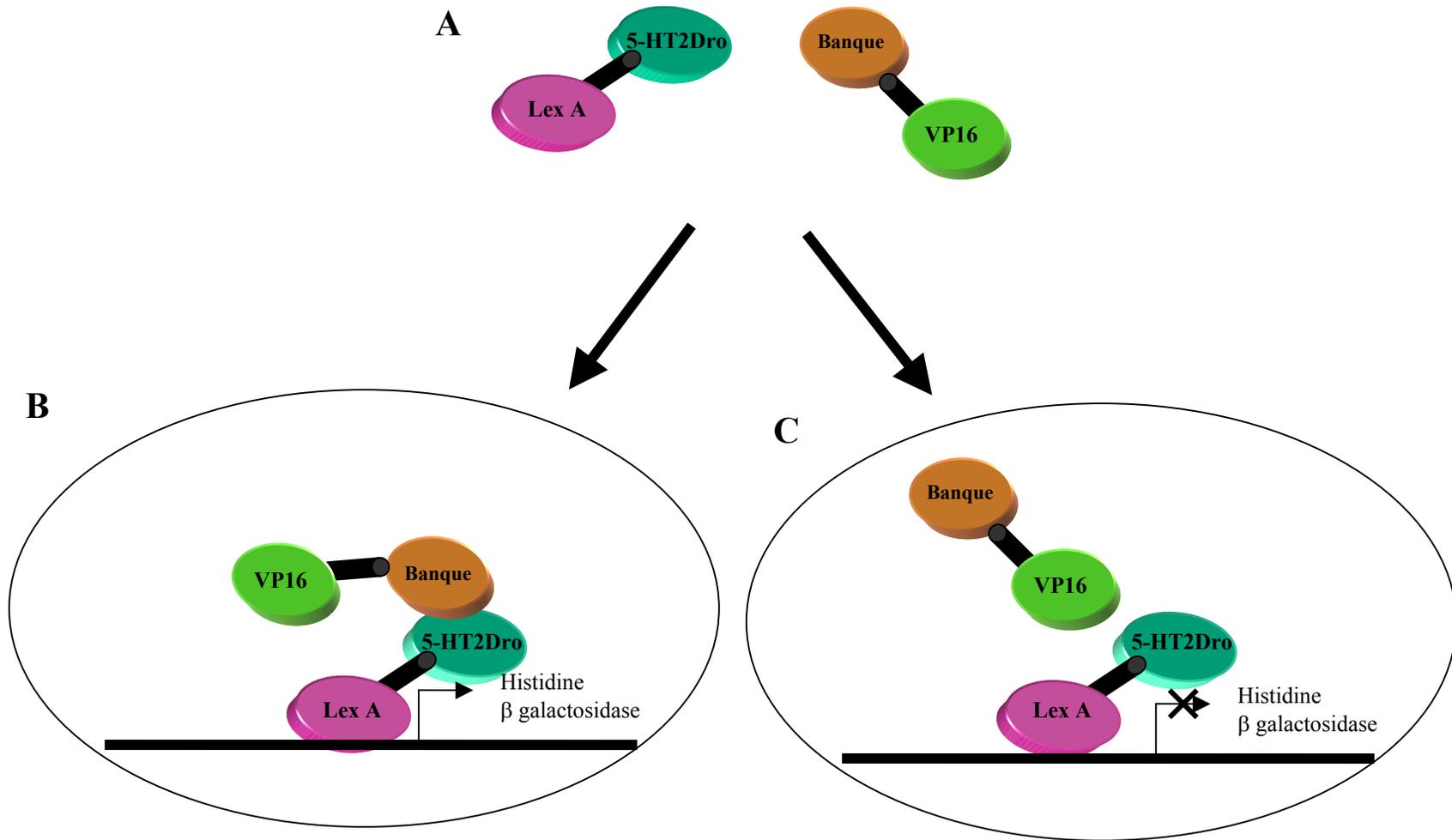


Figure 53 : Principe du double hybride.

Des vecteurs contenant des gènes de protéines de fusion sont transfectés dans des levures. (A) On distingue les domaines du récepteur 5-HT2Dro (dit 5-HT2Dro) liés à un domaine de liaison à l'ADN (LexA) et différentes protéines venant d'une banque d'ARNm d'embryons de 3-18 heures liés au domaine d'activation de la transcription (VP16). (B) L'interaction directe entre le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro et le produit de la banque permet la transcription des gènes cibles alors qu'en absence de cette interaction, VP16 ne peut pas initier la transcription des gènes cibles (C).

cribles double hybride utilisant comme appât ces 2 domaines protéiques se sont multipliés et ont permis de mettre en évidence des interactions avec plusieurs protéines comme des Arrestines β , des protéines chaperonnes à domaine SH3 ou PDZ ou de nombreuses kinases par exemple (voir chapitre 2 de l'introduction).

Dans cette étude on a donc utilisé comme appât le petit domaine C-terminal (30 acides aminés) du récepteur 5-HT2Dro (figure 54) qui ne contient pas de domaine d'interaction protéine-protéine connu. Par manque de temps, le crible de la banque d'ADNc d'embryons de drosophiles âgés de 3 à 18 heures n'a pu être fait avec la protéine de fusion préparée avec la troisième boucle intracellulaire comme appât (figure 54).

2/ Résultats du crible de la banque embryonnaire de drosophile avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro :

Lors du criblage de la banque d'ADNc 2.10^5 vecteurs contenant l'ADN de protéines de fusion différentes ont été transformés dans une souche contenant déjà la protéine appât. Seulement 200 souches transformées par les 2 vecteurs ont la capacité de pousser sur un milieu sans histidine parmi lesquelles seules 24 colonies étaient positives lors du test de la β -galactosidase qualitatif.

Le séquençage des souches positives pour les 2 tests d'activation a permis de mettre en évidence plusieurs protéines (tableau 14). La plupart d'entre elles étaient clonées en sens inverse de celui de leur expression sauvage. Parmi les gènes isolés, celui codant pour la sous unité de la PKA (PKA-R1) qui était cloné en phase avec VP16 a retenu notre attention. En effet, la PKA est connue pour être un effecteur des voies de signalisation des RCPG. Cependant, aucune interaction directe n'a à ce jour été suggérée.

Afin de confirmer l'interaction protéique entre le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro et la PKA-R1, une souche de levure a d'abord été transfectée avec le vecteur contenant la PKA-R1 puis celui contenant le domaine C-terminal (ou le vecteur vide ne contenant que Lex A comme témoin négatif).

```

1 MEMQSYSGRG PSTGTSETAT ATAAVASASA SDTAAFTFLR HENCRLEED WPGPRQPFID CEGSHTNSTS YTPSSLPTSK NLIEGPNNTF QCARQAIDEA 100
101 EHNAFYSCDG ESPLSENCTL RLKARLLRWP YEAYEHIRLA INGALSDYAS DKLSDSSSCD EGGMVLQCKL GQAHELLLCH LQQLEREPLR EVGSAEESFS 200
201 NDSLLQAFQI ELGAERDGLW SFLNLSELME PDHGFLGIMN VTNTSLDMFL ENLTALNTS TASTADMATE FAVTKSELDY SPHGYD DFLEFL FVFFIFAGG 300
301 LGNILVCLAV ALDRKLNVT NYFLE FSLAIA DLLVSLFVMP MGAIPAFLEY WPLGFTW CNI YVTCVDLACS SSILHMCFIG LGRYMGIRNP LGSRRHRSTKR 400
401 LTGIKIAIVW VMAMMVSSSI TVLGLVNEKS IMPEPNICVI NNRAFF VFGS LVAFYIPLM MVTTYALTIP LLRKKAR FAA EHPSEPFRR LGGRFTLRPQ 500
501 HSQQQLQMF S FSGSNNKFL SMGDGNRNFN TEGEMEEGGA PSRRSGVEPA ERPLMQORTA SSRSMGTVSE RNVVNGTSGA AGSGRRTTGT AHSSFRFSGA 600
601 GILRHSSSSP ASSCHSTSTS RSSSEWRKHG GYPNLMURLA IHLRLSLVPP SSSHPNRRASV RVTISQPQLG YPTNVGGNGG RTVGATEVGA GNGSSAGRT 700
701 SNSSLGGTSL MKIATIQGPI LNQSQAAGGN HMVQVKVPTA LKPEEPQRNK VRPFKFAFNR VATPTINLRF LNNRSKRNSL SANAVATEQK AT KVLGLVFF 800
801 TFVLCWSPFF ILNIIFAACP ECQVPEH VFN TCLWLGYVSS TINPIIYTIF NRTFRAAFIR LLKCNCKR* 869

```

I
II
III
I

IV
V

VI
VII
VI

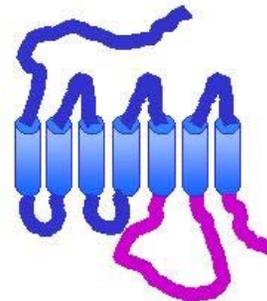


Figure 54 : Schématisation des parties utilisées comme appât lors de l'expérience de double hybride.

La structure protéique primaire du récepteur 5-HT2Dro est représentée en haut. Les parties encadrées délimitent les hélices transmembranaires dont les numéros sont indiqués en chiffres romains. Les parties vertes et violettes correspondant à la troisième boucle intracellulaire et au domaine C-terminal respectivement prévus comme appâts lors de l'expérience de double hybride. Ce sont les domaines d'interactions protéiques connus des RCPG. Seul le crible utilisant le domaine C-terminal a été effectué.

Un test d'activation à la β -galactosidase quantitatif a montré que l'interaction entre ces 2 protéines est spécifique (figure 55). Cette expérience a été répétée 5 fois sur des colonies différentes.

NOM	Fonction	Sens ou anti-sens
Protéine de liaison au rétinolaldehyde	Recyclage du rétinolaldehyde après activation de la rhodopsine	Anti-sens
eFIIb	Facteur d'élongation de la transcription	Sens
Protéine ribosomale S2	Protéine de structure des ribosomes	Anti-Sens
Tubuline β 1	Protéine du cytosquelette	Anti-sens
Pyruvate deshydrogénase	Catalyse d'une réaction du cycle de Krebs	Anti-sens
Rab 11	Petite protéine G	Anti-sens
Protéine kinase A (sous unité régulatrice)	Phosphorylation	Sens
ATPase vacuolaire	Exocytose	Anti-sens

Tableau 14 : Nature des protéines traduites par les ADN mis en évidence par analyse double hybride.

La recherche de protéines intracellulaires susceptibles d'interagir avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT_{2Dro} a permis de mettre en lumière une interaction directe entre le récepteur 5-HT_{2Dro} et la sous unité régulatrice de la PKA. Cette interaction doit encore être confirmée dans des cellules par co-immunoprécipitation.

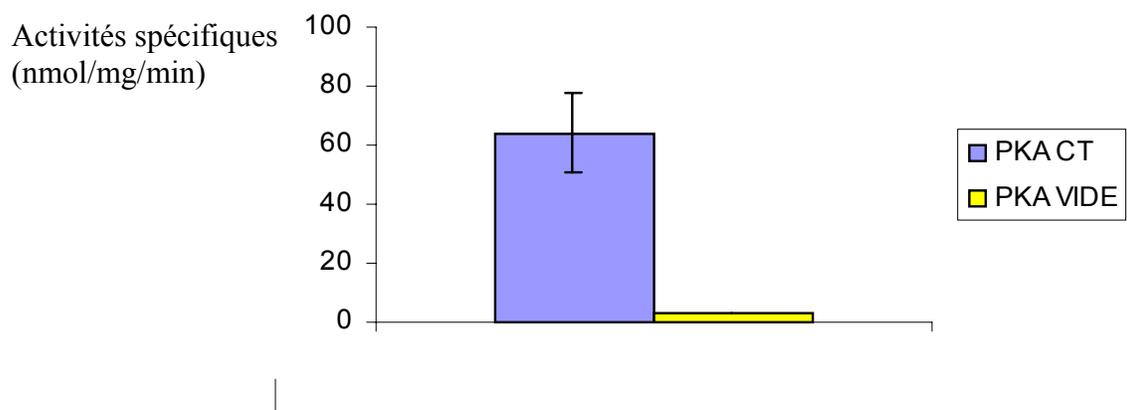


Figure 55 : Activité spécifique.

Activité spécifique de levures co-transfectées avec le vecteur pASV4 contenant la PKA et le vecteur pBTM116 vide (seulement LexA) (jaune) et d'autres co-transfectées avec la PKA et le vecteur pBTM116 contenant le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro (bleu).

L'activité spécifique est mesurée par une technique quantitative de détection de la coloration du X-Gal sous l'effet de la β -galactosidase.

DISCUSSION

Chapitre 1

La mutation ponctuelle, gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro influence la gastrulation et l'expression de Wingless

1/ Le domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro est nécessaire à la régulation de l'interaction ligand-récepteur :

1.1/ Comparaison des affinités du récepteur 5-HT2Dro sauvage, muté ou sans domaine N-terminal:

L'étude pharmacologique du récepteur 5-HT2Dro muté (récepteur M51) a montré que l'affinité de la sérotonine pour ce récepteur est plus forte que pour le récepteur sauvage. Ces résultats rappellent ceux observés lors d'études pharmacologiques faites avec un récepteur 5-HT2Dro au domaine N-terminal délété (5-HT2Dro N) ((Colas et al. 1997) et tableau 15).

	5-HT2Dro	5-HT2Dro muté	5-HT2Dro N
Agonistes			
Tryptamine	5,69	5,71	5,8
5-HT	6,69	7,95	7,8
α -méthyl 5-HT	6,38	6,43	6,8
5-CT	5,77	4,55	4,4
Dexfenfluramine	7,76	8,28	-
Antagonistes			
Ritansérine	8,10	8,17	8,3
Mélusergine	7,11	7,15	7,2
Kétansérine	7,39	8,07	8,2
Bufoténine	6,68	5,87	6,0
Yohimbine	6,51	6,47	6,4

Tableau 15 : Comparaison de l'affinité de certains composés chimiques pour les récepteur 5-HT2Dro sauvage, M51 et 5-HT2Dro N.

En effet, comme pour le récepteur M51, l'affinité de la sérotonine pour le récepteur 5-HT2Dro N est plus forte que pour le récepteur sauvage (il faut 10 fois moins de sérotonine pour activer les 2 récepteurs mutants que le sauvage). Il en est de même pour la kétansérine qui est un antagoniste qui présente plus d'affinité pour les récepteurs 5-HT2Dro mutés que pour la sauvage. En revanche, l'agoniste 5-CT et l'antagoniste bufoténine voient leur affinité diminuer chez les récepteurs mutés par rapport au récepteur 5-HT2Dro sauvage.

Pour conclure, le récepteur muté 5-HT2Dro M51 et le récepteur sans domaine N-terminal peuvent plus facilement interagir avec la sérotonine que le récepteur sauvage. De plus, les récepteurs mutés présentent des affinités variables vis à vis des différents agonistes et antagonistes. On peut en conclure que le domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro est important au cours de l'interaction ligand-récepteur.

1.2/ Etude des domaines N-terminaux des RCPG de drosophile :

Plusieurs études ont montré que la sérotonine interagit avec les domaines transmembranaires des récepteurs à l'aide de liaisons hydrogènes. Il en est ainsi des récepteurs 5-HT2B humains et murins comme l'a indiqué une étude de mutagenèse ciblée de ces récepteurs qui remplace certains acides aminés, détruit certaines liaisons hydrogènes dans les domaines transmembranaires et empêche la sérotonine de se lier aux récepteurs mutés (Manivet, Schneider et al. 2002).

Contrairement au domaine N-terminal des récepteurs de la sérotonine de mammifères qui sont courts, celui du récepteur 5-HT2Dro est très long (282 acides aminés). Cette caractéristique est partagée par la plupart des récepteurs des amines biogènes clonés à ce jour chez la drosophile (tableau 16). Le rôle du domaine N-terminal des récepteurs de drosophile est encore mal connu.

Dans tous les organismes vivants les récepteurs couplés aux protéines G qui présentent un long domaine N-terminal interagissent avec de gros ligands tels que les

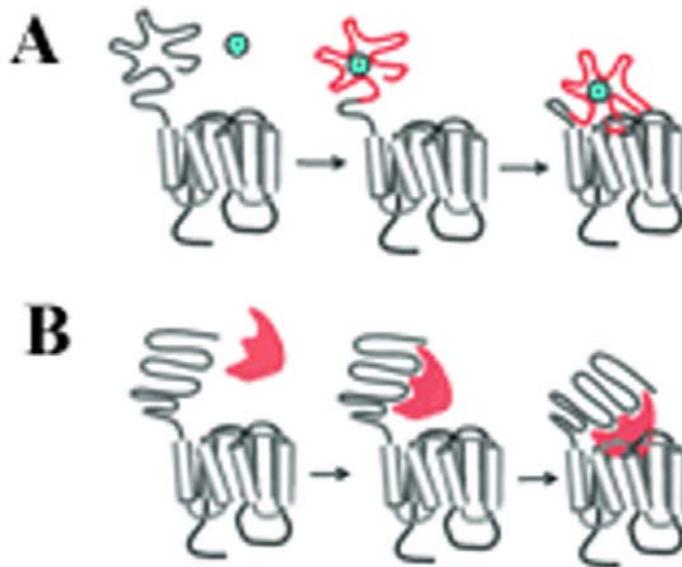


Figure 56 : Activation des récepteurs à long domaine N-terminal (d'après Ji et al. 1998).

(A) Récepteurs de neurotransmetteurs comme le calcium, le GABA et le glutamate.

(B) Récepteurs des peptides et protéines.

peptides ou les protéines ou certains neurotransmetteurs comme le GABA ou le glutamate. Le domaine N-terminal joue alors un rôle essentiel au cours de l'interaction ligand-récepteur (figure 56A et B). En effet, l'activation de ces récepteurs est faite en 2 temps : l'interaction entre le ligand et le domaine N-terminal de ces récepteurs permet d'abord un changement conformationnel de ce domaine extracellulaire qui va ensuite rapprocher le ligand des domaines transmembranaires auxquels les ligands se lient et permettent la transduction du signal ((Ji et al. 1998) et figure 56A et B).

Chez la drosophile, peu d'études ont porté sur le rôle du long domaine N-terminal des RCPG. En 1996, Gotzes et ses collègues ont étudié le rôle du domaine N-terminal du récepteur de la dopamine DmDop1 sur l'activation des effecteurs cellulaires. Ainsi, les délétions successives du domaine N-terminal du récepteur n'influencent pas l'interaction de la dopamine avec son récepteur. De plus, il s'est avéré que ce domaine extracellulaire présente des tailles différentes selon les souches sauvages utilisées. En effet, alors que le domaine N-terminal du récepteur DmDop1 des mouches *Berlin* ou *Oregon R* est long, celui des mouches *Canton S* est court. Malgré leur différence dans leur domaine N-terminal des récepteurs DmDop1 dans ces souches, ils présentent les mêmes propriétés pharmacologiques (Gotzes and Baumann 1996).

Récepteur	Ligand	Taille du domaine N-terminal	Référence
5-HT1ADro	Sérotonine	229 aa	Saudou 1992
5-HT1BDro	Sérotonine	121 aa	Saudou 1992
5-HT2Dro	Sérotonine	282 aa	Colas 1995
5-HT7Dro	Sérotonine	229 aa	Witz 1990
DmDop1	Dopamine	142 aa	Gotzes 1996
TyrDro	Tyramine	112 aa	Saudou 1990
muscarinique	Acétylcholine	111 aa	Onai 1989

Tableau 16 : Récepteurs des amines biogènes de drosophile aux domaines N-terminaux longs.

Comme tous les récepteurs des amines biogènes chez la drosophile, le récepteur 5-HT2Dro présente un domaine N-terminal long dont le rôle est encore mal connu chez la drosophile. L'analyse du domaine N-terminal du récepteur de la dopamine DmDop1 a montré qu'il n'influence ni la liaison ligand-récepteur, ni son activation.

1.3/ Modèle d'interaction entre la sérotonine et le récepteur 5-HT2Dro :

A la vue des résultats obtenus et des données bibliographiques, nous avons pu élaborer un modèle décrit dans la figure 57. Ainsi, le récepteur 5-HT2Dro présente, dans la souche M51, une mutation dans le domaine N-terminal qui change la proline 52 en sérine. Les prolines sont importantes pour la structure secondaire des protéines en permettant de former des boucles. La mutation ponctuelle dans la souche M51 change donc la conformation du domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro.

L'étude pharmacologique du récepteur mutant montre qu'il se comporte comme un récepteur sans domaine N-terminal vis à vis des différents composés chimiques. Le changement conformationnel du domaine N-terminal du récepteur M51 facilite donc l'association de la sérotonine à son site de liaison entre les hélices transmembranaires du récepteur 5-HT2Dro (figure 57B et C). Il en est de même pour la dexfenfluramine et la kétansérine.

On peut donc en conclure que le domaine N-terminal du récepteur sauvage limite l'association de la sérotonine avec le récepteur 5-HT2Dro (figure 57A). Comme la souche M51 est létale, cette limitation apparaît cruciale pour le bon déroulement du développement embryonnaire de la drosophile.

En revanche, la mutation dans le domaine N-terminal du récepteur 5-HT2Dro diminue l'affinité de la bufoténine ou de la 5-CT pour ce récepteur par rapport au sauvage. Dans ce cas la mutation semble empêcher la liaison du composé chimique au récepteur.

La bufoténine et la 5-CT ont des structures très proches de celles de la sérotonine alors que la kétansérine (dont l'affinité est plus forte pour le récepteur mutant que le

sauvage) est une plus grande molécule. On peut en conclure que la sélectivité de liaison des composés chimiques au récepteur mutant 5-HT2Dro (M51) ne dépend pas de l'encombrement stérique des molécules étudiées. Il en est de même pour la charge totale de chaque composé chimique qui ne joue pas de rôle dans leur liaison au récepteur.

Pour conclure, cette étude a montré que, contrairement au récepteur DmDop1, le domaine long N-terminal du récepteur 5-HT2Dro joue un rôle majeur au cours de l'association ligand-récepteur. En effet, il limite la liaison du récepteur à la sérotonine, son ligand naturel.

2/ Rôle du récepteur 5-HT2Dro au cours de l'extension de la bandelette germinative :

2.1/ Comparaison de la gastrulation des embryons l(3R)4830b et M51 :

Les deux souches l(3R)4830b et M51 contiennent la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro mais avec des fonds génétiques différents. En comparant l'extension de la bandelette germinative des embryons homozygotes et hétérozygotes pour chacune des souches, on a remarqué que ces deux souches présentent des défauts de gastrulation similaires. Cependant les cellules situées ventralement par rapport aux cellules polaires des embryons homozygotes M51 présentent une forte accélération (4 fois plus importante que celle des embryons sauvages) alors que les cellules des embryons homozygotes l(3R)4830b ne subissent qu'une accélération 3 fois plus élevée par rapport à celles des embryons sauvages (figures 42 et 47). A l'état hétérozygote, on observe aussi une augmentation de la vitesse des cellules v2 dans chacune des souches. Les cellules des embryons hétérozygotes M51 et l(3R)4830b ont une vitesse v2 respectivement 2 fois et 1,5 fois plus élevée par rapport à celle d'un embryon sauvage.

Les différences de vitesse de déplacement cellulaire entre les deux souches, statistiquement significatives, démontrent que la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro agit sur la vitesse de migration des cellules au cours de l'extension de la bandelette germinative dans les deux souches, mais dans des proportions

différentes. Comme la souche M51 a été isogénéisée, on peut en conclure que la souche l(3R)4830b contient une deuxième mutation qui compense l'effet de la mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

La mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro présente dans les deux souches M51 et l(3R)4830b influence la vitesse de migration des cellules ectodermiques lors de l'extension de la bandelette germinative. De plus, la différence de phénotype entre les souches M51 et l(3R)4830b nous laisse conclure que la souche l(3R)4830b contient une mutation supplémentaire qui compense l'effet de la mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

2.2/ Comparaison de la gastrulation des embryons Df(3R)HTRI et M51 :

La gastrulation des embryons sauvages commence par l'invagination des cellules mésodermiques dans la partie ventrale des embryons, puis le déclenchement de l'extension de la bandelette germinative. Dans la figure 42, ce relais est caractérisé par une contraction de la partie mésodermique au temps t=0 minute. Au début de l'invagination du mésoderme, les cellules subissent un changement de forme et deviennent triangulaires après avoir été rectangulaires (figure 58). Il est probable que dans le plan focal observé, la surface des cellules apparaisse plus petite au cours de ce processus et explique la contraction de la partie mésodermique observée sur la figure 42.

En comparant l'initiation de la gastrulation des embryons homozygotes déficients qui n'expriment pas le récepteur 5-HT2Dro avec des embryons sauvages, on a pu constater que la sérotonine n'est ni nécessaire à l'invagination du mésoderme, ni au déclenchement de l'extension de la bandelette germinative (figure 42 et (Colas et al. 1999)). En revanche, le sillon céphalique est élargi et la migration des cellules est anormale, traduisant un défaut des forces contrôlant l'extension de la bandelette germinative, probablement en régulant l'intercalation des cellules ectodermiques entre elles (voir chapitre 3 de l'introduction).

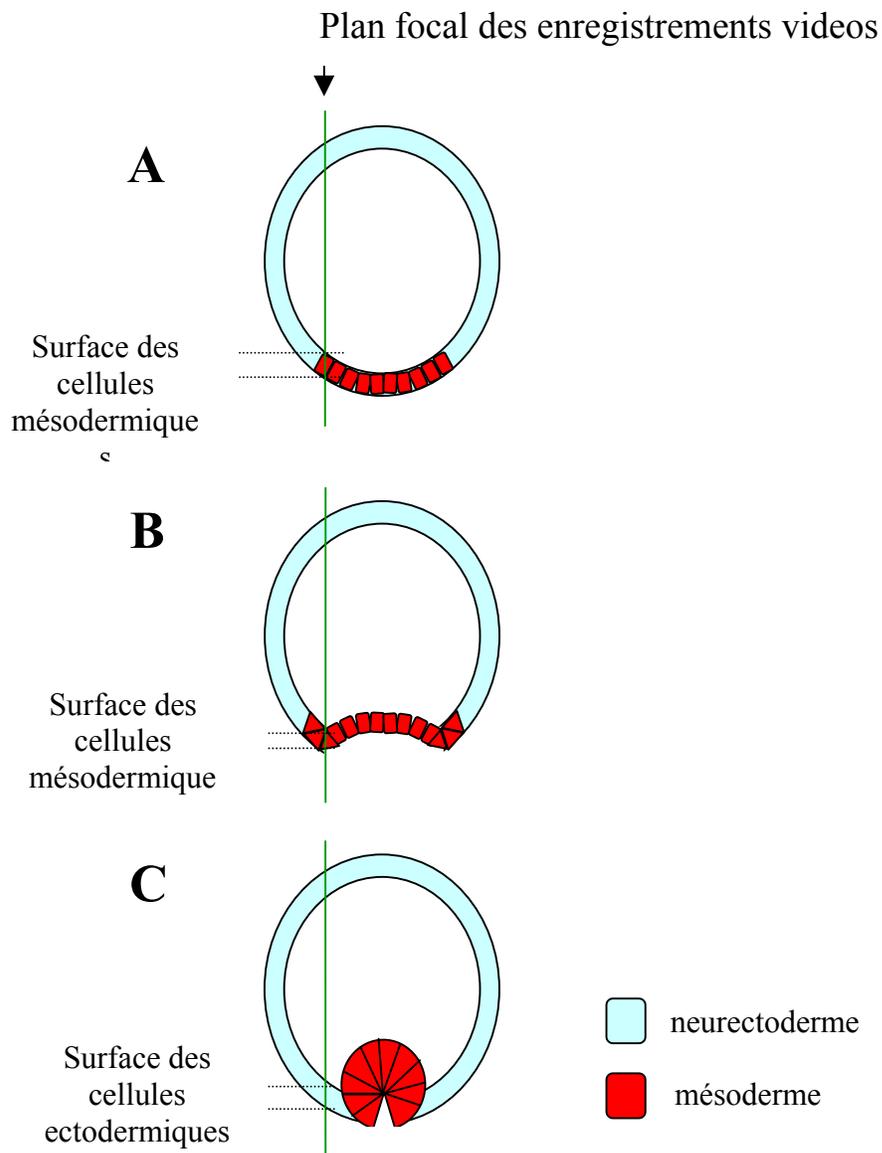


Figure 58 : Mise en évidence de l'invagination du mésoderme sur les enregistrements vidéo.

(A) Coupe transversale d'un embryon au stade blastoderme cellulaire.

(B) Coupe transversale d'un embryon au début de l'invagination du mésoderme.

Pendant l'invagination du mésoderme, certaines cellules mésodermiques changent de forme et deviennent triangulaires. Au cours des enregistrements vidéo, la surface des cellules mésodermiques du plan focal diminue. Cette diminution est visualisée par une contraction du mésoderme sur la figure 42.

Les embryons de la souche M51 ne présentent pas de contraction de la partie mésodermique au début de la gastrulation et les cellules de cette partie commencent directement l'extension de la bandelette germinative (figure 42). Ce phénotype pourrait être expliqué par une hypothèse selon laquelle le récepteur serait activé plus tôt dans le temps par rapport aux embryons sauvages. En effet, la sérotonine est synthétisée transitoirement avec un pic de synthèse 3 heures 15 minutes après le dépôt des oeufs ((Colas, Launay et al. 1999) et figure 59). Les récepteurs 5-HT2Dro des embryons homozygotes pour la mutation M51 peuvent être activés par une concentration de sérotonine 10 fois plus faible que le récepteur sauvage. Les cellules ectodermiques commenceraient donc leur intercalation avant que le signal d'invagination du mésoderme ou même le premier signal d'extension de la bandelette germinative ne soient donnés respectivement aux cellules mésodermiques et ectodermiques. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée car nous n'avons aucun moyen de connaître avec précision le moment de la ponte et donc le moment du début de la gastrulation par rapport à la fertilisation.

En conclusion, la sérotonine et le récepteur 5-HT2Dro jouent un rôle majeur dans la régulation des forces impliquées au cours de l'extension de la bandelette germinative. Cependant, comme la bandelette germinative des embryons homozygotes pour la déficience Df(3R)HTRI s'étend malgré l'absence du récepteur 5-HT2Dro on peut en déduire que la voie de la sérotonine n'est ni la seule voie mise en jeu dans ce processus, ni nécessaire au déclenchement de l'extension de la bandelette germinative. Dans les embryons homozygotes M51, les cellules ectodermiques semblent recevoir un signal qui induit l'intercalation cellulaire précocement par rapport à l'invagination du mésoderme et à l'extension de la bandelette germinative semble commencer plus tôt.

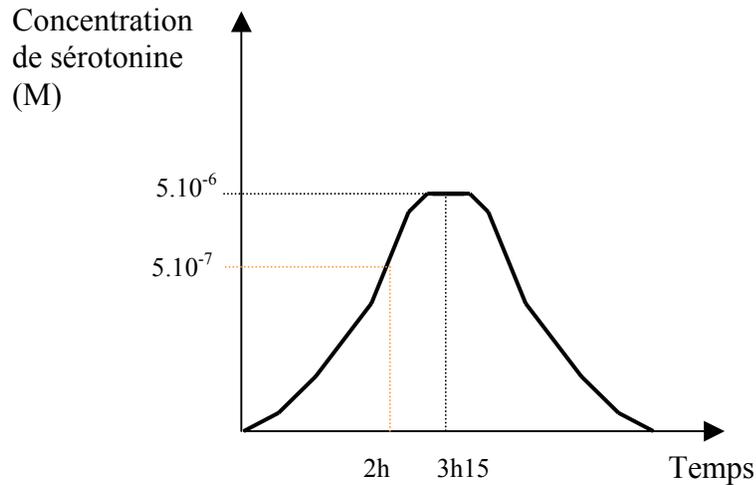


Figure 59 : Synthèse de la sérotonine dans l'embryon de drosophile (d'après Colas et al. 1999).

La sérotonine est synthétisée transitoirement au début du développement embryonnaire de la drosophile (pic à 3h15 au début de l'extension de la bandelette germinative). Le récepteur sauvage est activé par la sérotonine à la concentration de 10^{-6} M soit peu de temps avant le début de l'extension de la bandelette germinative. En revanche, le récepteur muté M51 est activé par une concentration de sérotonine 10 fois plus faible (10^{-7} M) et pourrait donc être activé plus tôt au cours du développement. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse.

2.3/ Comparaison des souches mutantes avec la souche Kr-5-HT2Dro :

Les défauts de gastrulation des souches mutantes M51 et l(3R)4830b sont similaires à ceux de la souche transgénique Kr-5-HT2Dro dans laquelle le récepteur 5-HT2Dro est surexprimé dans la partie centrale de l'embryon. En effet, on remarque d'abord que les cellules ectodermiques commencent leur migration avant le début de l'invagination du mésoderme dans les 3 souches. Dans la souche transgénique, le phénotype peut être expliqué par le fait que le récepteur 5-HT2Dro est sous la dépendance d'un promoteur UAS lui-même contrôlé par la protéine Gal4 sous la dépendance du promoteur du gène *Krüppel*. *Krüppel* est un gène « gap » exprimé au cours de la cellularisation. La protéine Gal 4 est donc exprimée au même moment et au même endroit que *Krüppel* et induit la surexpression du récepteur 5-HT2Dro sauvage plus tôt que son expression normale. De plus, la région de l'embryon dans laquelle le récepteur est surexprimé ne présente normalement que peu de récepteur. Cette surexpression précoce pourrait entraîner une activation prématurée du récepteur et donc l'initiation de l'intercalation cellulaire plus tôt au cours du développement embryonnaire. Des observations au microscope électronique ont mis en évidence une forme « en poire » dans les embryons Kr-5-HT2Dro caractéristique d'un défaut de l'invagination du mésoderme. Les cellules ectodermiques repoussent les cellules mésodermiques vers l'extérieur de l'embryons car les cellules n'ont pas bougé dû au manque de signal d'invagination du mésoderme (Colas et al. 1999).

Dans un deuxième temps, on remarque que le sillon céphalique est élargit, traduisant un défaut d'intercalation cellulaire. De plus, la vitesse v_2 des cellules ventrales aux cellules polaires est augmentée non seulement dans les souches M51 et l(3R)4830b mais aussi dans la souche Kr-5-HT2Dro (95,5 $\mu\text{m}/\text{sec} +11,5$). La vitesse v_2 des cellules des embryons Kr-5-HT2Dro est comparable à celles des embryons hétérozygotes pour la souche M51. Comme la souche Kr-5-HT2Dro et les mouches hétérozygotes pour les mutants ponctuels sont viables, on peut en déduire que l'augmentation de la vitesse v_2 observée dans ces embryons n'est pas létale.

Enfin, la présence d'un phénotype hétérozygote dans les embryons des souches M51 et l(3R)4830b avec des vitesses v_2 moins importantes que chez les embryons homozygotes mais comparables à celles observées dans les embryons Kr-5-HT2Dro nous permet de conclure que la mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro ne confère pas seulement un gain d'affinité mais aussi un gain de fonction au récepteur.

Pour conclure, la souche transgénique Kr-5-HT2Dro présente un défaut de gastrulation identique aux embryons homozygotes pour M51 et l(3R)4830b mais moins sévère. Comme la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro est homozygote létale embryonnaire mais hétérozygote viable et que la souche Kr-5-HT2Dro est viable, on peut conclure que l'augmentation de la vitesse v_2 des cellules ectodermiques est létale au delà d'un certain seuil. Enfin, ces résultats montrent que la mutation dans le gène du récepteur 5-HT2Dro confère au récepteur un gain de fonction.

2.4/ Rôles possibles du récepteur 5-HT2Dro au cours de la gastrulation :

L'extension de la bandelette germinative est principalement expliquée par l'intercalation des cellules ectodermiques dorsales entre leurs voisines ventrales (voir chapitre 3 de l'introduction et (Irvine and Wieschaus 1994)). Peu de divisions cellulaires ou de changements de forme des cellules ectodermiques sont observés à cette étape. D'après le modèle d'Irvine et Wieschaus, l'intercalation cellulaire est contrôlée par des forces d'adhésion différentes entre des bandes de cellules ectodermiques situées le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Armadillo (orthologue de la β -caténine des mammifères) permet la liaison des cadhérines (protéines d'adhésion cellulaire Ca^{2+} dépendantes) au cytosquelette. Les embryons Df(3R)HTRI présentent une distribution apico-basale d'Armadillo plus étendue le long des membranes latérales par rapport aux cellules des embryons sauvages où Armadillo uniquement est située dans la partie apicale des membranes latérales (Colas et al. 1999). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation activée par le récepteur 5-HT2Dro régule la localisation apico-basale d'Armadillo dans la membrane latérale des cellules ectodermiques et donc

potentiellement la force d'adhésion des cadhérines au cours de l'extension de la bandelette germinative.

Il est donc possible que dans les embryons homozygotes M51 et l(3R)4830b la force d'adhésion soit plus forte que dans les embryons sauvages au début de l'intercalation cellulaire. La libération soudaine de cette tension expliquerait alors la forte accélération des cellules visualisée par la vitesse v_2 . On peut comparer ce phénomène à un élastique plus ou moins tendu entre 2 points fixes. Au moment de lâcher cet élastique d'un côté, celui-ci rejoint le deuxième point d'attache plus ou moins rapidement en fonction de la tension exercée sur l'élastique au départ. Cette explication n'exclut pas d'autres hypothèses : d'une part, la voie de signalisation du récepteur 5-HT2Dro peut aussi contrôler directement les mécanismes impliqués dans la migration cellulaire. D'autre part, il est aussi possible que le déclenchement prématuré de l'extension de la bandelette germinative implique une localisation différente des cellules par rapport à celle qu'elles devraient avoir dans un embryon sauvage. Les cellules seraient alors soumises à des signaux différents, ce qui pourrait induire la forte accélération des cellules ectodermiques dans les embryons homozygotes mutants M51 et l(3R)4830b.

Il a été montré que plusieurs protéines telles que Slam et Bazooka présentent une asymétrie dans leur distribution intracellulaire (Zallen and Wieschaus 2004) et que Bazooka régule la localisation apico-basale d'Armadillo (Muller and Wieschaus 1996). De plus, la régulation de la polarité planaire est faite par l'intermédiaire de Frizzled qui permet notamment la polarisation de Bazooka. Une étude a montré que cette régulation implique la protéine G α i (Bellaïche et al. 2001). Il est possible que lors de l'intercalation cellulaire le récepteur 5-HT2Dro de la sérotonine régule la localisation asymétrique de Slam et Bazooka via l'intervention des protéines G. Ceci agirait sur la localisation apico-basale d'Armadillo et probablement la force d'adhésion des cellules.

Le démarrage précoce de l'extension de l'intercalation cellulaire est donc la conséquence de l'activation prématurée de la voie de transduction du récepteur 5-HT2Dro. Les voies de signalisation du récepteur 5-HT2Dro ne sont pas encore connues. Cependant comme ce récepteur est très proche du récepteur 5-HT2B de mammifères, nous pouvons penser que les voies de transduction sont similaires entre les

2 récepteurs. L'étude du phénotype cardiaque des souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B ou des souris transgéniques surexprimant le récepteur dans le coeur a montré un défaut de l'expression des N-cadhérines dans les cardiomyocytes de ces animaux (Nebigil, Hickel et al. 2001). Cette mauvaise expression des N-cadhérines induit une désorganisation des myofibrilles et peut être dû à un défaut de différenciation. Ce phénotype peut impliquer des kinases comme la PKC ou des cascades de phosphorylation.

Enfin, les souches M51 et l(3R)4830b présentent un phénotype hétérozygote avec une augmentation des vitesses v2 plus importante que chez les embryons sauvages et comparable aux embryons Kr-5-HT2Dro. Ce phénotype nous laisse penser que la réponse des cellules à l'activation du récepteur 5-HT2Dro présente un effet dose-réponse. Ainsi, il est possible que le signal intracellulaire comme la libération de calcium intracellulaire soit proportionnelle au nombre de récepteur activé (hétérozygotes M51 ou l(3R)4830b et Kr-5-HT2Dro) et/ou de la quantité de sérotonine susceptibles d'activer le récepteur (homozygotes M51 ou l(3R)4830b). Le signal moléculaire mis en jeu lors de l'activation du récepteur 5-HT2Dro reste à déterminer.

Pour conclure, cette étude a montré que l'activation du récepteur 5-HT2Dro régule la vitesse de la migration des cellules ectodermiques au cours de l'extension de la bandelette germinative ainsi que la localisation apico-basale des jonctions adhérentes. Des expériences supplémentaires nous permettront de savoir si la polarisation intracellulaire de Slam est Bazooka est altérée dans les embryons mutants M51 et l(3R)4830b.

3/ Rôle du récepteur 5-HT2Dro dans la régulation de l'expression de Wingless :

3.1/ Comparaison des cuticules des souches M51, l(3R)4830b et Df(3R)HTRI :

La souche M51 présente deux phases de létalité : la première au cours de la gastrulation et la deuxième pendant le premier stade larvaire. La cause de la létalité larvaire n'a pas été étudiée. Comme la sérotonine contrôle la prise alimentaire ou le rythme cardiaque chez la larve, il se peut que le récepteur 5-HT2Dro soit également impliqué et qu'un défaut dans l'un de ces processus soit la cause de la létalité larvaire.

En revanche, les embryons homozygotes M51 qui n'éclosent pas présentent un phénotype soit « double ligne », soit « fantôme ». Le phénotype « double ligne » est observé chez des embryons dont les défauts d'extension de la bandelette germinative ne sont visibles que lors de la rétraction de la bandelette germinative et de la fermeture dorsale visualisées par l'absence des structures céphaliques et la présence de 2 rangées de denticules dans chaque segment. En revanche, les embryons qui présentent le phénotype « fantôme » ne subissent jamais de rétraction de la bandelette germinative et meurent après son extension. Dans ce cas, même si les expressions d'Engrailed et de Wingless sont identiques aux embryons sauvages, les cellules ectodermiques ne sont pas à la bonne localisation lors de la formation de la cuticule et donc non soumises aux signaux permettant la formation des différents types de cuticule.

Les embryons mutants pour la déficience Df(3R)HTRI (Colas et al. 1999) présentent les mêmes phénotypes cuticulaires que les embryons homozygotes M51 contenant la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro. Ce constat n'est pas surprenant car les phénotypes cuticulaires reflètent les défauts d'extension de la bandelette germinative. En effet, l'embryon présente le long de l'axe antéro-postérieur des bandes de cellules de forces d'adhésion différentes. Ce ne sont pas les forces d'adhésion mais la différence entre les forces de 2 bandes de cellules qui est importante au cours de l'extension de la bandelette germinative. Le défaut de synthèse du récepteur 5-HT2Dro et l'expression du mutant gain de fonction auraient pour conséquence une augmentation de cette différence d'adhésion. En effet, les cellules qui n'expriment pas le récepteur 5-HT2Dro présenteraient toujours la même force d'adhésion alors que celles qui expriment le récepteur diminueraient ou augmenteraient leur force d'adhésion selon la mutation étudiée. Ainsi, dans les 2 cas, la différence des forces d'adhésion s'accroîtrait et conduirait à un défaut de gastrulation traduit par des phénotypes cuticulaires similaires.

Les embryons homozygotes de la souche l(3R)4830b qui contiennent la même mutation ponctuelle que les embryons M51 mais dans un fond génétique différent, présentent non seulement des phénotypes cuticulaires « double ligne » et « fantôme », mais aussi un phénotype sans denticules dans le quatrième segment abdominal (« A4 sans denticule »). Ce phénotype cuticulaire, moins sévère que les « fantômes » ou « double ligne », reflète un défaut de gastrulation moins important que celui des embryons M51 qui meurent plus tôt que les embryons l(3R)4830b. Le phénotype « A4 sans denticule » a aussi été observé dans les embryons transgéniques Kr-5-HT2Dro qui surexpriment le récepteur 5-HT2Dro sauvage.

L'observation des phénotypes cuticulaires confirme l'hypothèse de l'existence d'une deuxième mutation sur le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b qui compenserait l'effet de la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

Alors que les phénotypes cuticulaires des embryons homozygotes Df(3R)HTRI ou M51 sont similaires, les embryons l(3R)4830b présentent un phénotype cuticulaire moins sévère sans denticule dans le quatrième segment abdominal, confirmant l'hypothèse selon laquelle il existe une deuxième mutation sur le chromosome 3 de la souche l(3R)4830b. Cette deuxième mutation semble compenser partiellement le défaut de gastrulation induit par la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro.

3.2/ Etude de l'interaction potentielle entre Hairy et le récepteur 5-HT2Dro :

La mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro a été produite par EMS sur le chromosome 3 d'une souche contenant plusieurs marqueurs. Ce chromosome est appelé rucuca et contient notamment une mutation hypomorphe dans le gène *hairy* appelé *hairy 1* (h1). *Hairy* joue un rôle dans deux processus indépendants au cours du développement. Il est soit impliqué dans la formation des soies sur le corps de l'adulte et notamment sur les ailes, soit dans la segmentation de l'embryon. Il a été montré par Ingham et ses collègues que la mutation h1 qui affecte plus particulièrement

la formation des soies, présente parfois certains défauts de segmentation comme la délétion d'un segment. Ce phénotype affecte le plus souvent le quatrième segment abdominal (Ingham et al. 1995).

Nous avons voulu savoir si le phénotype « A4 sans denticule » des embryons homozygotes l(3R)4830b dépendait de la présence de la mutation h1. L'étude d'une souche isogénique h1 n'a pas permis d'observer le phénotype « A4 sans denticule ». Les expériences de P. Ingham ont été faites sur une souche contenant un chromosome rucuca et pas une souche isogénique. Il est possible que le fond génétique du chromosome rucuca soit important dans l'apparition du phénotype « A4 sans denticule ».

L'étude des cuticules d'autres souches mutantes (l(3R)4831d, l(3R)4832c et l(3R)4833c) a montré que ces souches ne présentent qu'un très faible pourcentage d'embryons « A4 sans denticule ». Ces souches proviennent de la même mutagenèse EMS que la souche l(3R)4830b contenant la mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro et contiennent donc aussi le chromosome rucuca. De plus, certains embryons de la souche transgénique Kr-5-HT2dro présentent aussi le phénotype « A4 sans denticule ». Ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT2Dro est impliqué dans la formation de ce phénotype.

L'hypothèse d'une interaction génétique entre le récepteur 5-HT2Dro et le facteur de transcription Hairy a donc été faite. En effet, Hairy est un gène « pair rule » exprimé en 7 bandes transversales le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon au même moment que le récepteur 5-HT2Dro. Cependant, les patrons d'expression des 2 protéines ne présentent que 2 cellules en commun dans chaque segment. Il serait donc possible que Hairy et le récepteur 5-HT2Dro jouent un rôle commun dans ces cellules.

L'étude des souches recombinées contenant h1 et la mutation M51 dans le gène du récepteur sur un chromosome isogénique a montré que ces 2 protéines n'interagissent pas ensemble pour former le phénotype « A4 sans denticules ».

Pour conclure, bien que le mutant hypomorphe h1 affecte dans certains cas la formation du quatrième segment abdominal, il n'est impliqué dans ce phénotype dans la souche l(3R)4830b. De plus, l'étude de P. Ingham et ses collègues a montré que chez le mutant h1 le phénotype « A4 sans denticule » est la conséquence de la fusion de 2

segments adjacents. Dans le cas, de la souche l(3R)4830b ce n'est pas le fusion de 2 segments mais l'expression ectopique de Wingless qui explique ce phénotype

3.3/ L'expression ectopique de Wingless induit la formation de cuticule nue dans le segment A4 :

3.3.1/Régulation de Wingless au cours du développement embryonnaire :

L'analyse de l'expression de Wingless dans les embryons homozygotes l(3R)4830b a montré que pendant l'extension de la bandelette germinative, la dixième bande Wingless s'élargit et se divise pour donner une bande d'expression ectopique de Wingless entre les bandes 9 et 10. Cette expression ectopique de Wingless est la cause de la formation de la cuticule nue dans le quatrième segment abdominal car ce segment est délimité par les expressions 9 et 10 d'Engrailed et de Wingless (parasegments 9 et 10) et correspond à la cinquième bande du récepteur 5-HT2Dro (figure 60).

La figure 61 permet la comparaison de l'expression de différents gènes dans les parasegments 9 et 10. L'expression d'Engrailed est inchangée dans les embryons homozygotes l(3R)4830b. La seule protéine à être exprimée ectopiquement est Wingless. Cette expression est donc régulée transcriptionnellement car elle aussi observée par hybridation *in situ*. Comme le quatrième segment abdominal est recouvert de cuticule nue, il est possible que Wingless inhibe l'expression de Rhomboid et de Serrate, normalement exprimés à cet endroit et impliqués dans la formation des denticules. L'expression de ces protéines reste à déterminer dans nos mutants. Une autre hypothèse impliquerait la répression directe du facteur de transcription Shavenbaby par Wingless, responsable de la formation des denticules sans changer l'expression de Rhomboid ou Serrate.

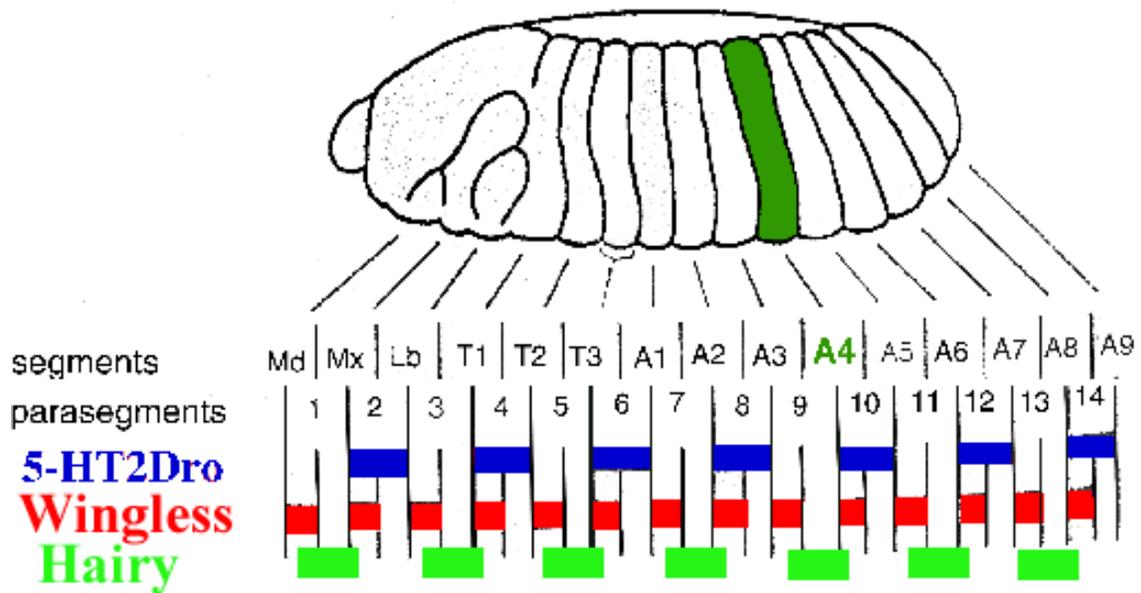


Figure 60 : Correspondance entre la segmentation de l'embryon, l'expression de Wingless de Hairy et du récepteur 5-HT2Dro :

Le quatrième segment abdominal de l'embryon correspond à la cinquième bande d'expression du récepteur 5-HT2Dro et à la dixième bande de Wingless.

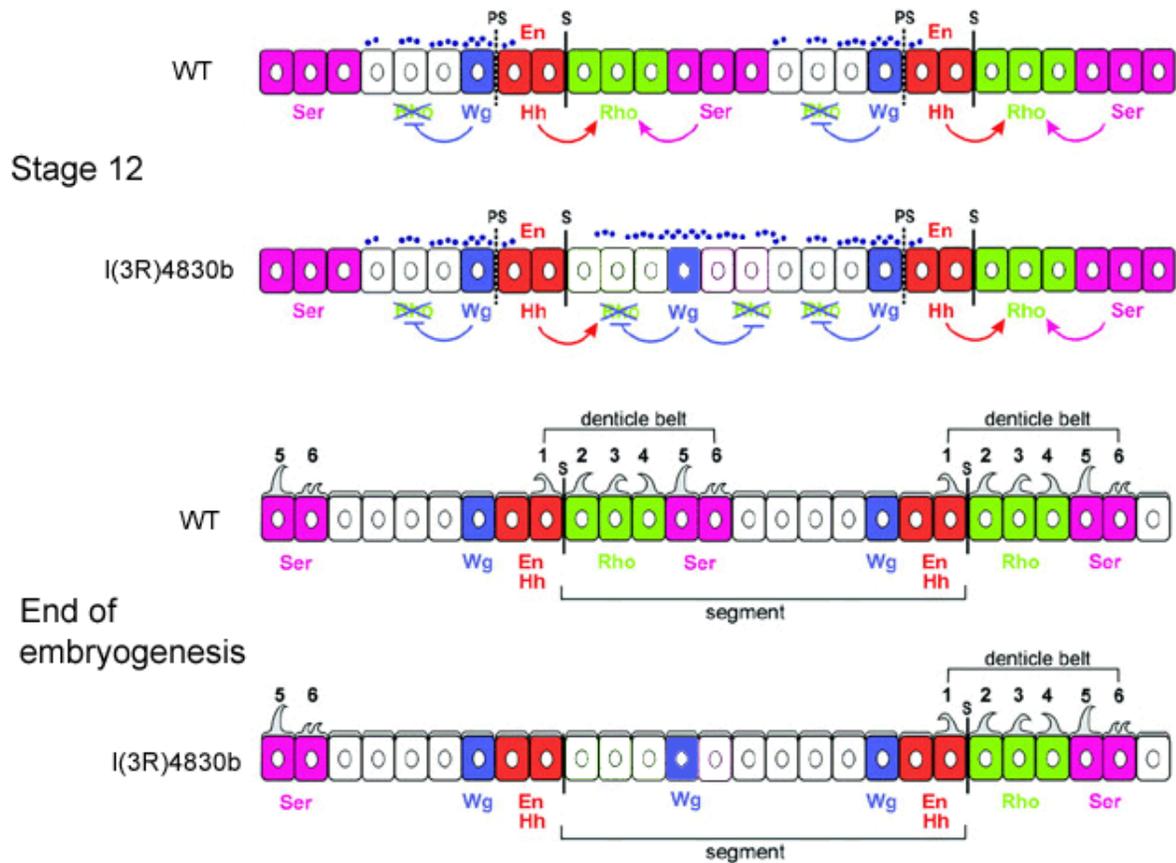


Figure 61 : L'expression ectopique de Wingless dans la souche I(3R)4830b induit la formation de cuticule nue dans le segment A4 (d'après Sanson 2001) :

L'expression ectopique de Wingless est mise en place tardivement dans les embryons de la souche I(3R)4830b. Elle contrôle la formation de la cuticule nue dans ce segment soit en réprimant l'expression de Serrate et Rhomboid, soit en agissant directement sur Shavenbaby.

L'expression de *Wingless* est régulée différemment au cours de l'embryogenèse (figure 62). En effet, *Wingless* est d'abord sous la dépendance des gènes « pair rule » puis de *Engrailed* et enfin de *Gooseberry*. Ainsi, dans un premier temps, les produits des gènes « pair rule » *paired*, *fushi-tarazu* et *even skipped* régulent l'expression de *Wingless*. En effet, alors que *Paired* active l'expression de *Wingless*, et que *Fushi tarazu* et *Even skipped* la répriment et définissent ses bordures antérieures et postérieures (Ingham and Hidalgo 1993).

Dans un deuxième temps, entre 3 et 5 heures après la ponte, une boucle de rétrocontrôle s'installe entre les cellules exprimant *Wingless* et *Engrailed*. *Wingless* agit directement sur les cellules voisines exprimant *Engrailed*, alors que ces dernières activent l'expression de *Hedgehog* qui à son tour active l'expression de *Wingless* (DiNardo, Heemskerk et al. 1994). Enfin, les expressions des 2 gènes de polarité segmentaire deviennent indépendantes l'une par rapport à l'autre (figure 62).

Gooseberry, un facteur de transcription, est ensuite impliqué dans la boucle d'autorégulation de *Wingless*. En effet, 6 heures après le dépôt des oeufs, *Wingless* régule l'expression de *Gooseberry* dans les mêmes cellules que *Wingless*, ainsi que celles qui leur sont directement antérieures. *Gooseberry* va ensuite activer l'expression de *Wingless* (Li and Noll 1993) (figure 62).

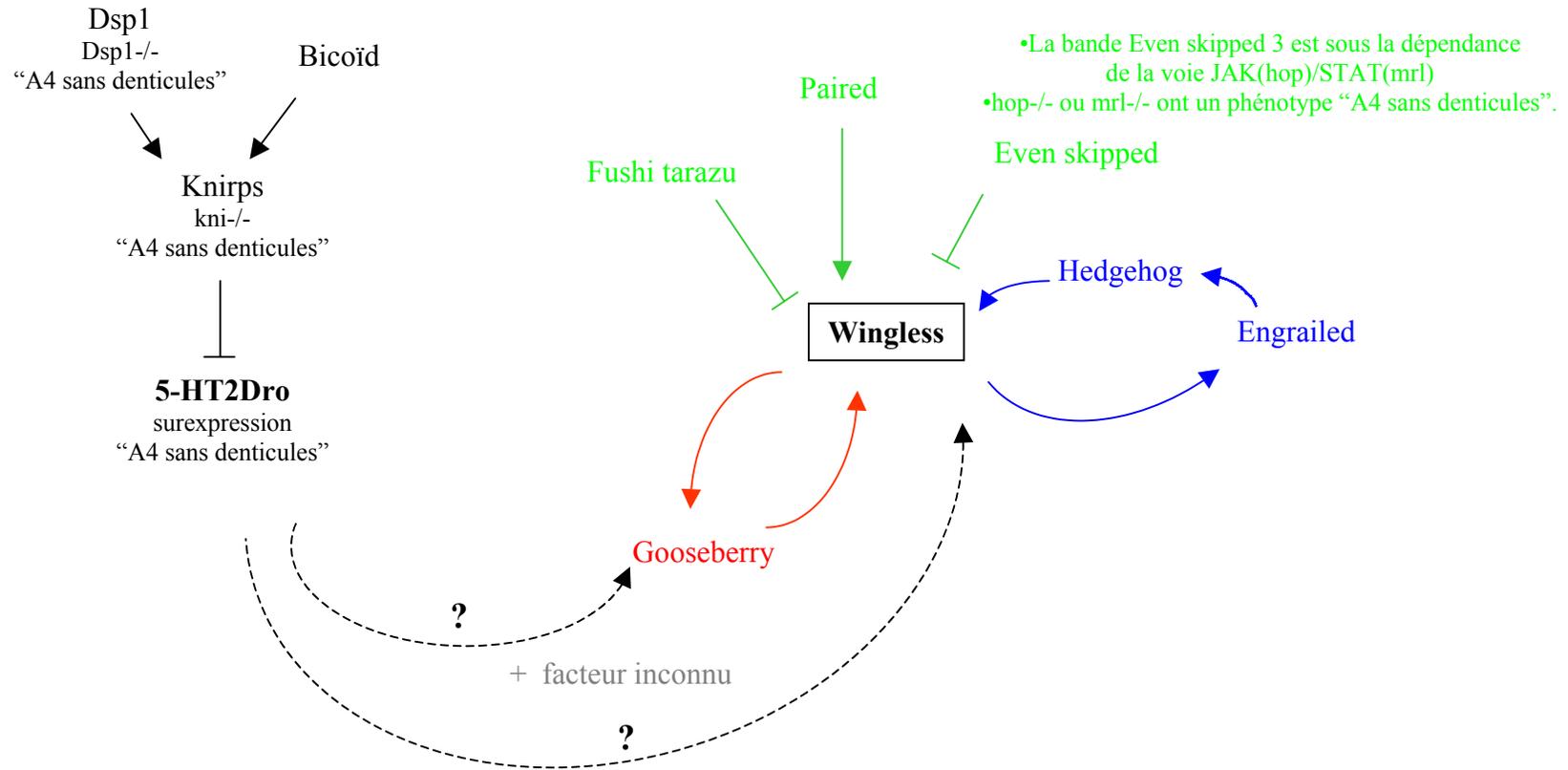


Figure 62 : Régulation de Wingless au cours du temps dans l’embryon de drosophile.

Wingless est d’abord sous la dépendance des gènes « pair rule » (en vert). Puis, entre 2 et 5 heures après le dépôt des oeufs, une boucle de rétrocontrôle existe entre Engrailed et Wingless (en bleu). Enfin, 6 heures après le dépôt des oeufs, alors que l’expression de Wingless devient indépendante d’Engrailed, une deuxième boucle de rétrocontrôle est mise en place entre Wingless et Gooseberry (en rouge). En noir est représentée la voie éventuelle dans laquelle le récepteur 5-HT2Dro serait impliquée lors de l’activation de Wingless.

3.3.2/ Gènes présentant un phénotype « A4 sans denticule » :

Il peut aussi être intéressant d'étudier des gènes dont les mutants présentent le phénotype « A4 sans denticule ». La régulation de chaque bande Even skipped est indépendante car c'est un gène « pair-rule » primaire. Par exemple, la troisième bande Even skipped est contrôlée par la voie des JAK/STAT. Des mutants dans les gènes *hopscotch* (hop) ou *marelle* (mrl) codant respectivement pour les orthologues des protéines Jak et STAT de mammifères présentent un défaut d'expression de la troisième bande Even skipped (Binari and Perrimon 1994) (Hou, Melnick et al. 1996). Il a été montré que les embryons mutants pour ces 2 protéines présentent un phénotype « A4 sans denticule » (figure 62).

De même, les mutants pour le gène « gap » *knirps* ou pour le gène *Dspl 1* qui régule l'expression de *knirps* présentent le phénotype cuticulaire « A4 sans denticule » (Nauber, Pankratz et al. 1988; Mosrin-Huaman, Canaple et al. 1998) (figure 62).

3.3.3/ Rôle probable du récepteur 5-HT2Dro dans la régulation de l'expression de Wingless :

Il a été montré au laboratoire que l'expression des bandes 3, 4 et 5 du récepteur 5-HT2Dro est réprimée par Knirps (Colas, Launay et al. 1995). Il apparaît aussi que les embryons de la souche transgéniques Kr-5-HT2Dro qui surexprime le récepteur sauvage dans les bandes 3, 4 et 5 dans les mêmes proportions que les mutants *knirps* présentent aussi le phénotype « A4 sans denticule ». Il est donc possible que le phénotype « A4 sans denticule » observé dans les souches mutantes pour *knirps* et *Dlp 1* soient la conséquence d'un défaut de répression du récepteur 5-HT2Dro.

Enfin, le constat que l'expression ectopique de Wingless n'affecte pas l'expression d'Engrailed, nous a permis de déduire que la régulation de Wingless par le récepteur 5-HT2Dro est mise en place après que la boucle de rétrocontrôle entre Engrailed et Wingless ait été réprimée, 5 heures après le dépôt des oeufs. A ce stade, le récepteur 5-HT2Dro n'est plus transcrit dans l'embryon. Le récepteur 5-HT2Dro ne

semble donc pas contrôler directement l'expression de *Wingless* mais un facteur intermédiaire qui ferait la médiation entre l'activation du récepteur et le contrôle de la bande ectopique *Wingless*. Un candidat possible serait *Gooseberry* qui est connu pour participer à la boucle de rétrocontrôle de *Wingless* 6 heures après le dépôt des oeufs. Mais on ne peut exclure la participation d'un autre facteur qui agirait indépendamment ou en synergie avec *Gooseberry* pour contrôler l'expression de *Wingless* dans ce segment. Il reste à déterminer le patron d'expression de *Gooseberry* dans la souche l(3R)4830b.

Enfin, bien que la souche l(3R)4830b semble contenir une deuxième mutation qui compense le phénotype de la mutation gain de fonction dans le gène du récepteur 5-HT2Dro, cela n'implique pas forcément que cette deuxième mutation participe au contrôle de l'expression de *Wingless*. En effet, les mutants pour les gènes *Dspl 1* ou *knirps* qui participent à la répression du récepteur 5-HT2Dro dans certains segments présentent un phénotype « A4 sans denticule ». Il en est de même de la souche transgénique Kr-5-HT2Dro. On a montré précédemment que le défaut de gastrulation observé dans les embryons transgéniques ou les embryons l(3R)4830b est moins sévère que dans les embryons M51. La létalité très précoce des embryons M51 masquerait donc le deuxième rôle de la sérotonine dans la régulation du gène de polarité segmentaire *wingless*. En revanche, la compensation du phénotype de gastrulation dans la souche l(3R)4830b permettrait aux embryons de dépasser le stade de l'extension de la bandelette germinative et donc de mettre en lumière ce deuxième rôle de la sérotonine. On ne peut cependant pas exclure l'implication directe de cette deuxième mutation dans la régulation de *wingless*.

Pour conclure, on a montré que la souche l(3R)4830b présente un phénotype particulier sans denticule dans le quatrième segment abdominal. Ce phénotype est la conséquence de l'expression ectopique de Wingless spécifique à ce segment. Comme l'expression d'Engrailed n'est pas affectée par l'expression ectopique de Wingless, la régulation de ce dernier est faite après que l'expression de ces 2 gènes soit devenue indépendante. On peut faire l'hypothèse que l'activation du récepteur 5-HT2Dro par la sérotonine régule l'activité de Gooseberry et/ou d'un autre facteur, qui reste à déterminer, qui à son tour va réguler l'expression de Wingless. Le phénotype « A4 sans

denticule » des souches mutantes *Dspl 1* et *knirps* qui empêchent la répression de l'expression du récepteur 5-HT2Dro et de la souche transgénique *Kr-5-HT2Dro* semblent confirmer cette hypothèse.

4/ Recherche de la mutation mise en évidence sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b :

Une mutation létale a été mise en évidence sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b. Le produit du gène muté pourrait avoir la possibilité de coopérer avec le récepteur 5-HT2Dro. En effet, l'étude d'une souche isogénique contenant la mutation M51 et la mutation sur le bras gauche du chromosome 3 a montré qu'elle présente le phénotype « A4 sans denticule » comme la souche l(3R)4830b. A l'aide des marqueurs présents sur le chromosome rucuca puis de plusieurs souches déficientes dans la région chromosomique isolée, cette mutation a été localisée dans la région 67A2-67D11-13. En effet, alors que toutes les souches déficientes entre les marqueurs *hairy* et *thread* sont viables lorsqu'elles sont croisées avec les souches h1-m et l(3R)4830b, la déficience Df(3L)AC1 présente un phénotype particulier : la progéniture du croisement des souches mutantes avec la souche Df(3L)AC1 est semi létale car quelques mouches de phénotype sauvage éclosent très tardivement (18 jours après le dépôt des oeufs). Nous en avons conclu que la mutation présente sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b est localisé dans la région couverte par la déficience Df(3L)AC1. Cette région couvre près de 900 kilobases et comprend 146 gènes. Afin de mieux préciser la région d'intérêt, les souches mutantes ont été croisées avec d'autres souches contenant des petites délétions à l'intérieur de la région 67A2-67D11-13. Tous ces croisements ont permis d'éliminer plusieurs parties du chromosomes (figure 51).

Les souches mutantes ont aussi été croisées avec celle contenant la grande déficience Dp(3;3)S2a2 qui couvre la région 66D-67E incluant la région chromosomique de la déficience Df(3L)AC1. Ces croisements ont montré que les souches contenant la mutation à mettre en évidence sont létales contre cette grande déficience.



Figure 63 : Cartographie de la région 67A2-67D11-13 :

La souche Df(3L)AC1 est semi létale lorsqu'elle est croisée avec les souches l(3R)4830b et h1-m. En revanche, la souche Dp(3;3)S2a2 est létale. Un gène candidat pourrait être le gène CG6559 car il est situé à la limite droite de la déficience Df(3L)AC1 et ne serait donc pas complètement déléetée dans cette souche.

A la vue de ces résultats, nous faisons l'hypothèse que le gène muté dans la souche *l(3R)4830b* se trouve à la limite de la déficience *Df(3L)AC1* (figure 63). En effet, il est possible que la déficience *Df(3L)AC1* n'enlève que partiellement un gène à l'une de ses limites. Le transcrit de ce gène, bien que tronqué pourrait alors encore être actif. Seulement lorsque la délétion est en trans-hétérozygote face à un mutant perte de fonction dans le même gène, la présence d'une seule copie du gène qui permet la transcription d'une protéine active mais tronquée expliquerait le ralentissement du développement des mouches et donc leur retard à l'éclosion. De même l'absence totale de cette protéine dans la souche déficiente *Dp(3;3)S2a2* expliquerait la létalité observée dans les croisements avec les souches mutantes. Le croisement des souches mutantes avec la souche *Df(3L)ED4421* qui couvre la région 66E-67B1 a permis d'éliminer la limite gauche de la déficience *Df(3L)AC1*.

Les limites de la déficience *Df(3R)AC1* n'ont pas été cartographiées précisément (Landecker et al. 1994) et peu de gènes candidats sont présents à la limite droite de la déficience *Df(3L)AC1* (figure 63). Afin de vérifier cette hypothèse et d'isoler le gène muté, il faudra croiser les souches mutantes avec d'autres souches contenant des déficiences dont les limites droites sont cartographiées dans cette région. Un gène candidat pourrait être le gène *CG6559* codant pour une protéine de 341 acides aminés dont la fonction n'a pas encore été caractérisée. La structure protéique du produit de *CG6559* ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Cependant c'est le seul gène dans la partie 67D11-67D13 du chromosome 3 dont l'orientation serait en accord avec cette hypothèse.

Pour conclure, le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b contient une mutation dans la région 67A2-67D11-13. Plusieurs résultats nous font penser que le gène muté se trouve plus particulièrement dans la partie 67D11-67D13 mais cette hypothèse reste à démontrer et qu'il est impliqué dans les même processus cellulaires que le récepteur 5-HT2Dro.

Chapitre 2

Rôles potentiels d'une interaction PKA-R1/5-HT2Dro

1/ Structure de la Protéine kinase A (PKA) :

La Protéine kinase A est un hétérotétramère composé de 2 sous unités régulatrices et 2 sous unités catalytiques qui sont libérées soit par liaison de l'AMPc avec les sous unités régulatrices soit par leur phosphorylation. Les kinases libérées vont alors phosphoryler un grand nombre protéines cibles comme par exemple des facteurs de transcription (CREB ou Cubitus interruptus), d'autres kinases ou des enzymes impliquées dans le métabolisme (régulation du passage entre la fermentation et la respiration chez la levure).

Chez la drosophile, on distingue 2 sous unités régulatrices et 3 sous unités catalytiques appelées respectivement PKA-R1, PKA-R2, PKA-C1, PKA-C2 et PKA-C3.

L'épissage alternatif du gène codant pour la PKA-R1 conduit à la formation de 3 isoformes : RA qui correspond à la protéine entière, RB et RD dont le domaine N-terminal contenant le domaine de dimérisation est respectivement partiellement ou totalement tronqué (figure 64). Au cours du développement de l'oeuf, l'isoforme RA de la PKA-R1 est la plus abondante (Yoshida et al. 2004).

2/ Activation de la PKA par les RCPG :

Les récepteurs couplés aux protéines G α s sont connus pour activer l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc. L'AMPc se lie avec les sous unités régulatrices de la PKA et permet la libération des sous unités catalytiques qui phosphorylent les protéines cibles.

Il a été montré que la protéine chaperonne AKAP (« A-kinase anchor protein ») permet le rapprochement de la PKA avec les domaines intracellulaires de certains RCPG (figure 64 et (Griffioen and Thevelein 2002)). Ainsi, la proximité des protéines impliquées dans la transduction du signal joue un rôle important dans la rapidité de la réaction engendrée par l'activation du récepteur. De plus, la protéine chaperonne n'interagit pas seulement avec la PKA, mais aussi avec la PKC ou la Calcineurine (une phosphatase).

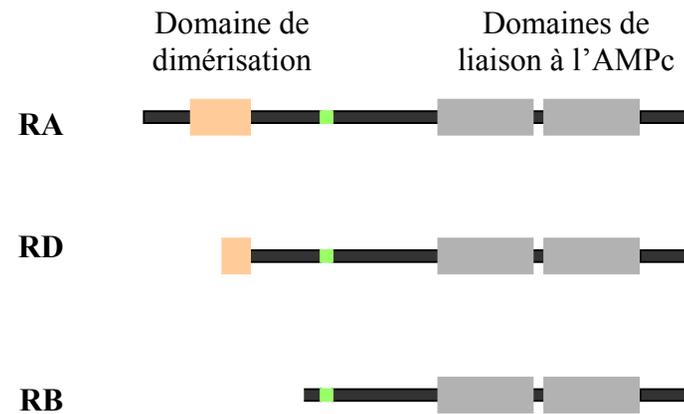
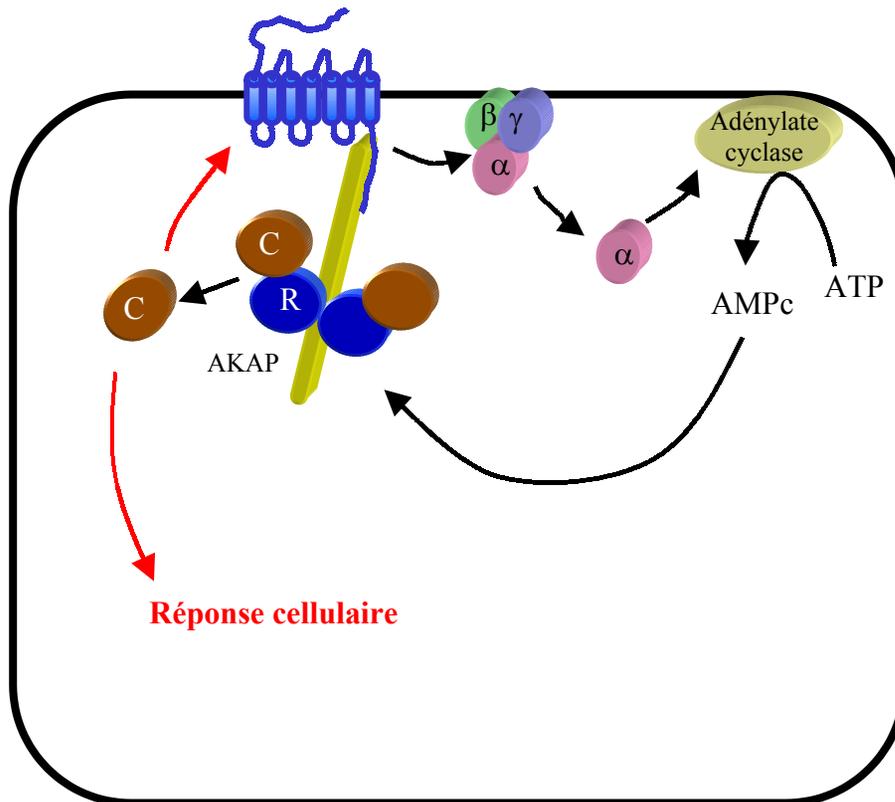


Figure 64 : Activation de la PKA par les récepteurs couplés aux protéines G.

La protéine chaperonne AKAP interagit avec le RCPG et la sous-unité régulatrice de la PKA (R). L'activation de l'adénylate cyclase par les protéines G α actives stimule la production d'AMPc qui se lie aux sous-unités R de la PKA. Les sous-unités catalytiques (C) de la PKA sont alors libérées et induisent la réponse cellulaire en phosphorylant leurs cibles.

A gauche sont représentées les 3 structures de la PKA-R1 (RA, RB et RD).

3/ Rôle de la PKA dans la voie Hedgehog :

Il a été montré que la PKA joue un rôle majeur lors du développement des disques imaginaux de la drosophile, en régulant la voie de transduction de Hedgehog. Ce rôle est indépendant de la concentration intracellulaire d'AMPc (Jiang and Struhl 1995; Li et al. 1995).

Au cours de l'embryogenèse, il a été montré par J. Ohlmeyer et ses collègues que la PKA phosphoryle le facteur de transcription Cubitus interruptus indépendamment du signal Hedgehog (Ohlmeyer and Kalderon 1997). En effet, les mutants Cubitus interruptus dans le site de phosphorylation de la PKA ne subissent pas de protéolyse et activent la transcription des gènes cibles de Hedgehog indépendamment du signal extracellulaire. La phosphorylation par la PKA inhibe donc la forme entière du facteur de transcription qui ne peut donc pas activer la transcription des gènes cibles comme *wingless* ou *decapentaplegic* (Chen et al. 1998).

De plus, la régulation de l'expression de Wingless par Cubitus interruptus nécessite l'interaction de ce dernier avec la protéine dCPB (« Drosophila CREB binding protein ») (Chen et al. 2000). Cette protéine interagit le plus souvent avec le facteur de transcription CREB activé par la PKA.

Enfin, une étude récente a montré que *Costal 1* qui est impliqué dans la régulation de la voie Hedgehog code en fait pour 2 protéines : la PKA-C1 et la PKA-R2. Ce travail montre aussi que la surexpression de la PKA-R2 est suffisante pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Hedgehog (Collier et al. 2004).

4/ Rôle de la PKA-R1 dans le développement précoce de la drosophile :

Il a été montré récemment par Yoshida et ses collègues que la sous unité régulatrice PKA-R1 est impliquée dans la régulation traductionnelle et la restriction postérieure d'*oskar*, un gène maternel impliqué dans la formation des axes embryonnaires, dans l'ovocyte (Yoshida et al. 2004). Comme la PKA est impliquée dans l'organisation des microtubules à ce stade, il est possible que le contrôle de la localisation d'Oskar soit dépendante de ce processus (Lane and Kalderon 1994).

D'autres études ont montré un rôle prépondérant de la PKA et notamment de la PKA-R1 pendant le développement du système nerveux central de la drosophile (Goodwin et al. 1997). De plus, l'analyse de mutants hypomorphes de la PKA-R1 a révélé qu'elle est impliquée dans la mémoire olfactive (Goodwin et al. 1997) ou lors de la parade nuptiale (O'Dell et al. 1999).

5/ Implications d'une interaction PKA-R1/5-HT2Dro :

L'étude double hybride faite au laboratoire a permis de mettre pour la première fois en évidence une interaction directe entre le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro et la sous unité régulatrice de la Protéine kinase A : PKA-R1. Cette interaction est surprenante car les récepteurs couplés aux protéines G qui activent la synthèse d'AMPc interagissent préférentiellement avec la protéine chaperonne AKAP. De plus les récepteurs 5-HT2 de la sérotonine, couplés aux protéines G α q, permettent la libération de calcium dans la cellule et ne régulent pas l'adénylate cyclase. Cependant plusieurs études ont montrés que les RCPG de drosophile avaient la capacité d'activer successivement la production d'AMPc et la libération de calcium.

Même si la PKA est impliquée dans le régulation de Wingless au cours de l'embryogenèse, 2 résultats nous laissent penser que le récepteur 5-HT2Dro n'est pas impliqué dans la régulation de la PKA à ce stade : la sous unité régulatrice de la PKA impliquée dans la régulation de *wingless* n'est pas la PKA-R1 mais la PKA-R2. De plus, l'expression sauvage d'Engrailed dans les embryons homozygotes l(3R)4830b nous fait penser que l'expression ectopique de Wingless dans ces embryons est régulée après que l'expression d'Engrailed et de Wingless soient devenues indépendantes l'une de l'autre. Cependant, il n'est pas exclu que la PKA-R1 interagisse avec le récepteur 5-HT2Dro plus tard, dans le système nerveux central par exemple.

Afin de confirmer l'interaction mise en évidence par double hybride, nous nous attacherons dans un premier temps à vérifier l'interaction PKA-R1/5-HT2Dro par co-immunoprécipitation dans des cellules exprimant les 2 protéines, puis nous regarderons l'induction de la luciférase sous la dépendance d'un promoteur activé par un facteur de transcription sensible à la phosphorylation par la PKA. Enfin, nous regarderons

si le rôle de la PKA dans une voie de signalisation du récepteur 5-HT2Dro est sensible à l'AMPC.

Pour conclure, l'interaction entre le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro et la sous unité régulatrice de la PKA pourrait nous permettre d'ouvrir un nouveau champ d'investigation concernant la régulation des gènes cibles de la PKA par les récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs résultats nous suggèrent que cette interaction n'est pas nécessaire dans la régulation de Wingless, cependant comme la sérotonine et la PKA sont impliquées lors du développement du système nerveux central, il est possible qu'elle soit nécessaire à ce moment.

En conclusion générale, l'étude d'un mutant ponctuel qui confère un gain de fonction au récepteur 5-HT2Dro a permis de confirmer le rôle du récepteur dans l'extension de la bandelette germinative au cours de la gastrulation de l'embryon de drosophile. En effet, les cellules ectodermiques migrent plus rapidement dans les embryons M51 ou l(3R)4830b contenant la même mutation ponctuelle dans le gène du récepteur 5-HT2Dro mais dans des fonds génétiques différents. Ce phénotype est observé non seulement à l'état homozygote, mais aussi dans une moindre mesure à l'état hétérozygote traduisant un effet dose-réponse entre la réponse cellulaire et le niveau d'activation du récepteur par la sérotonine. Il avait précédemment été montré que le récepteur 5-HT2Dro influence la localisation apico-basale des jonctions cellulaires importantes pour le contrôle de l'intercalation cellulaire. Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu, il reste à déterminer l'influence de l'activation du récepteur 5-HT2Dro sur la localisation ou l'expression de certaines protéines comme Bazooka ou Slam connus pour leur régulation des jonctions cellulaires.

La différence de phénotype entre les souches M51 et l(3R)4830b est due à la présence d'une deuxième mutation sur le bras gauche du chromosome 3 de la souche l(3R)4830b. Après avoir éliminé l'hypothèse selon laquelle Hairy et le récepteur 5-HT2Dro interagiraient génétiquement, une seconde mutation létale a été mise en évidence dans la région 67A2-67D11-13. De premiers résultats montrent que le gène muté dans cette région intervient dans le même processus que le récepteur 5-HT2Dro et que la mutation compense le phénotype des embryons M51. La nature du gène muté et son implication directe au cours de l'extension de la bandelette germinative.

La souche l(3R)4830b présente un phénotype particulier sans denticule dans le quatrième segment abdominal. Ce phénotype a certainement pu être mis en évidence car les embryons l(3R)4830b meurent plus tard que les embryons M51 au cours de la gastrulation. En effet, l'expression ectopique de Wingless qui explique le phénotype « A4 sans denticule » est observée tardivement au cours du développement des embryons. Le mécanisme moléculaire mis en place lors de la régulation de l'expression de Wingless reste à définir. Pour cela, il sera important de regarder l'expression de Gooseberry, Rhomboid et Serrate dans les embryons l(3R)4830b.

Ces résultats permettent l'ouverture d'un nouveau champ d'investigation sur le rôle de la sérotonine dans la régulation de Wingless. Ceci est en accord avec le rôle

ancestral de morphogène donné à la sérotonine. Chez les vertébrés comme le xénope ou le poulet, la sérotonine est impliquée dans le développement précoce des embryons. De plus, dans ces organismes l'extension convergente, qui correspond au processus d'intercalation cellulaire est régulé par la voie Wnt calcium dépendante. Il serait donc intéressant de vérifier si la régulation des mouvements cellulaires et la régulation de l'expression de Wingless par le récepteur 5-HT2Dro sont dépendants ou non.

Enfin, l'étude double hybride a permis de mettre en évidence pour la première fois une interaction directe entre la PKA-R1 et le domaine C-terminal du récepteur 5-HT2Dro dans les levures. Après avoir vérifié cette interaction par co-immunoprécipitation dans les cellules, il serait intéressant de vérifier non seulement l'activation de la transcription de gènes cibles sous la dépendance de facteur de transcription activés par la PKA, mais aussi la concentration d'AMPc dans ces cellules. Ainsi, nous pourrions vérifier si l'activation (ou inactivation) de la PKA par l'activation du récepteur 5-HT2Dro est AMPc dépendante ou non.

Bien que de nombreux récepteurs couplés aux protéines G activent la PKA, ce processus cellulaire dépend de la concentration d'AMPc dans la cellule. De plus, il a été montré que la protéine chaperonne AKAP permet le rapprochement de la PKA et du RCPG. Ces résultats permettraient donc de mettre en évidence un nouveau niveau de régulation de la PKA par les récepteurs couplés aux protéines G.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Alexandre, C., Lecourtois, M. and Vincent, J.** (1999). Wingless and Hedgehog pattern *Drosophila* denticle belts by regulating the production of short-range signals. *Development* **126**, 5689-98.
- Arancibia, S., Rage, F., Astier, H. and Tapia-Arancibia, L.** (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* **64**, 257-67.
- Ault, K. T., Durmowicz, G., Galione, A., Harger, P. L. and Busa, W. B.** (1996). Modulation of *Xenopus* embryo mesoderm-specific gene expression and dorsoanterior patterning by receptors that activate the phosphatidylinositol cycle signal transduction pathway. *Development* **122**, 2033-41.
- Baek, K. H. and Lee, K. Y.** (1999). Signal transduction pathway for anterior-posterior development in *Drosophila*. *J Biomed Sci* **6**, 314-9.
- Bale, A. E.** (2002). Hedgehog signaling and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**, 47-65.
- Bang, A. G. and Kintner, C.** (2000). Rhomboid and Star facilitate presentation and processing of the *Drosophila* TGF- α homolog Spitz. *Genes Dev* **14**, 177-86.
- Bejsovec, A. and Martinez Arias, A.** (1991). Roles of wingless in patterning the larval epidermis of *Drosophila*. *Development* **113**, 471-85.
- Bellaiche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H. and Schweisguth, F.** (2001a). Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* **3**, 50-7.
- Bellaiche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmentier, M. L., O'Kane, C. J., Bryant, P. J. and Schweisguth, F.** (2001b). The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* **106**, 355-66.
- Binari, R. and Perrimon, N.** (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev* **8**, 300-12.
- Birman, S., Morgan, B., Anzivino, M. and Hirsh, J.** (1994). A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. *J Biol Chem* **269**, 26559-67.
- Bitgood, M. J., Shen, L. and McMahon, A. P.** (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* **6**, 298-304.
- Blair, S. S.** (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* **17**, 299-309.
- Bloch Qazi, M. C., Heifetz, Y. and Wolfner, M. F.** (2003). The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **256**, 195-211.
- Bockaert, J. and Pin, J. P.** (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**, 1723-9.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J. and Basler, K.** (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**, 803-15.
- Buznikov, G. A., Lambert, H. W. and Lauder, J. M.** (2001). Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* **305**, 177-86.
- Campos-Ortega, J. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*, pp. 9-85.
- Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R. H. and Smolik, S. M.** (1998). Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2349-54.
- Chen, Y., Goodman, R. H. and Smolik, S. M.** (2000). Cubitus interruptus requires *Drosophila* CREB-binding protein to activate wingless expression in the *Drosophila* embryo. *Mol Cell Biol* **20**, 1616-25.
- Chiang, C., Y., L., E., L., Young, K. E. and J.L., C.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Choi, D. S. and Maroteaux, L.** (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett* **391**, 45-51.
- Choi, D. S., Ward, S. J., Messaddeq, N., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1997). 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* **124**, 1745-55.
- Clifford, R. and Schupbach, T.** (1992). The torpedo (DER) receptor tyrosine kinase is required at multiple times during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **115**, 853-72.

Cohen, E. (1987). Chitin biochemistry : synthesis and inhibition. *Ann. Rev. Entomol.* **32**, 71-93.

Colas, J. F., Choi, D. S., Launay, J. M. and Maroteaux, L. (1997). Evolutionary conservation of the 5-HT_{2B} receptors. *Ann N Y Acad Sci* **812**, 149-53.

Colas, J. F., Launay, J. M., Kellermann, O., Rosay, P. and Maroteaux, L. (1995). Drosophila 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5441-5.

Colas, J. F., Launay, J. M. and Maroteaux, L. (1999a). Maternal and zygotic control of serotonin biosynthesis are both necessary for Drosophila germband extension. *Mech Dev* **87**, 67-76.

Colas, J. F., Launay, J. M., Vonesch, J. L., Hickel, P. and Maroteaux, L. (1999b). Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in Drosophila. *Mech Dev* **87**, 77-91.

Collier, L. S., Suyama, K., Anderson, J. H. and Scott, M. P. (2004). Drosophila Costal1 mutations are alleles of protein kinase A that modulate hedgehog signaling. *genetics* **167**, 783-96.

del Alamo, D., Terriente, J. and Diaz-Benjumea, F. J. (2002). Spitz/EGFr signalling via the Ras/MAPK pathway mediates the induction of bract cells in Drosophila legs. *Development* **129**, 1975-82.

Dewhurst, S. A., Croker, S. G., Ikeda, K. and McCaman, R. E. (1972). Metabolism of biogenic amines in Drosophila nervous tissue. *Comp Biochem Physiol B* **43**, 975-81.

Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila. *Cell* **75**, 741-52.

DiNardo, S., Heemskerk, J., Dougan, S. and O'Farrell, P. H. (1994). The making of a maggot: patterning the Drosophila embryonic epidermis. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 529-34.

Dubois, L., Lecourtois, M., Alexandre, C., Hirst, E. and Vincent, J. P. (2001). Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in Drosophila embryos. *Cell* **105**, 613-24.

Egermayer, P., Town, G. I. and Peacock, A. J. (1999). Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension. *Thorax* **54**, 161-8.

Erspamer, V. and Boretti, G. (1950). Identification of enteramine and enteramine-related substances in extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* by paper chromatography. *Experientia* **6**, 348-9.

Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L. and Gershon, M. D. (2000). Serotonin and the 5-HT_{2B} receptor in the development of enteric neurons. *J Neurosci* **20**, 294-305.

Florence, B., Guichet, A., Ephrussi, A. and Laughon, A. (1997). Ftz-F1 is a cofactor in Ftz activation of the Drosophila engrailed gene. *Development* **124**, 839-47.

Freyburger, W. A., Graham, B. E., Rapport, M. M., Seay, P. H., Govier, W. M., Swoap, O. F. and Vander Brook, M. J. (1952). The pharmacology of 5-hydroxytryptamine (serotonin). *J Pharmacol Exp Ther* **105**, 80-6.

Friggi-Grelin, F., Iche, M. and Birman, S. (2003). Tissue-specific developmental requirements of Drosophila tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* **35**, 260-9.

Fristom, D. and Fristom, J. W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster. 1. General considerations. *Dev Biol* **43**, 1-23.

Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4**, 1002-12.

Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**, 17979-82.

Goldman-Levi, R., Miller, C., Greenberg, G., Gabai, E. and Zak, N. B. (1996). Cellular pathways acting along the germband and in the amnioserosa may participate in germband retraction of the Drosophila melanogaster embryo. *Int J Dev Biol* **40**, 1043-51.

Golembo, M., Raz, E. and Shilo, B. Z. (1996). The Drosophila embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* **122**, 3363-70.

Goodwin, S. F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S. R., Tully, T. and Kaiser, K. (1997). Defective learning in mutants of the Drosophila gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* **17**, 8817-27.

Gotzes, F. and Baumann, A. (1996). Functional properties of Drosophila dopamine D1-receptors are not altered by the size of the N-terminus. *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 121-6.

Griffioen, G. and Thevelein, J. M. (2002). Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet* **41**, 199-207.

Gritzan, U., Hatini, V. and DiNardo, S. (1999). Mutual antagonism between signals secreted by adjacent wingless and engrailed cells leads to specification of complementary regions of the Drosophila parasegment. *Development* **126**, 4107-15.

- Gustavson, E., Goldsborough, A. S., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1996). The Drosophila engrailed and invected genes: partners in regulation, expression and function. *genetics* **142**, 893-906.
- Hall, R. A., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J.** (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* **145**, 927-32.
- Hamel, E.** (1999). The biology of serotonin receptors: focus on migraine pathophysiology and treatment. *Can J Neurol Sci* **26**, S2-6.
- Hamlin, K. E. and Fisher, F. E.** (1951). The synthesis of 5-HT. *Journal of American Chemistry Society* **73**.
- Harris, R. C., Chung, E. and Coffey, R. J.** (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* **284**, 2-13.
- Haze, J. J.** (1991). Toward an understanding of the rationale for the use of dietary supplementation for chronic pain management: the serotonin model. *Cranio* **9**, 339-43.
- Heemskerk, J., DiNardo, S., Kostriken, R. and O'Farrell, P. H.** (1991). Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* **352**, 404-10.
- Hou, X. S., Melnick, M. B. and Perrimon, N.** (1996). Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* **84**, 411-9.
- Howard, K. R. and Struhl, G.** (1990). Decoding positional information: regulation of the pair-rule gene hairy. *Development* **110**, 1223-31.
- Hoyer, D., Hannon, J. P. and Martin, G. R.** (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 533-54.
- Ingham, P. W.** (1995). Genetic of the hairy locus of Drosophila melanogaster. *genetics* **111**, 463-486.
- Ingham, P. W. and Hidalgo, A.** (1993). Regulation of wingless transcription in the Drosophila embryo. *Development* **117**, 283-91.
- Ingham, P. W., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M. and Taylor, A. M.** (2000). Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol* **10**, 1315-8.
- Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). Cell intercalation during Drosophila germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-41.
- Jäckle, M. J. P. a. H.** (1993). Blastoderm segmentation. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. C. S. H. L. Press), pp. 467-516.
- Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I.** (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**, 17299-302.
- Jiang, J. and Struhl, G.** (1995). Protein kinase A and hedgehog signaling in Drosophila limb development. *Cell* **80**, 563-72.
- Jin, M. H., Sawamoto, K., Ito, M. and Okano, H.** (2000). The interaction between the Drosophila secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 2098-107.
- Kalderon, D.** (2004). Hedgehog signaling: Costal-2 bridges the transduction gap. *Curr Biol* **14**, R67-9.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. and Skoglund, P.** (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 897-922.
- Kellermann, O., Tournois, C., Richard, S., Manivet, P., Maroteaux, L., Launay, J. M. and Mutel, V.** (1998). Signaling pathways and targets of the 5-HT_{2B} receptor in the 1C11 serotonergic cell line. *Ann N Y Acad Sci* **861**:247
- Konrad, K. D. and Marsh, J. L.** (1987). Developmental expression and spatial distribution of dopa decarboxylase in Drosophila. *Dev Biol* **122**, 172-85.
- Kulke, M. H. and Mayer, R. J.** (1999). Carcinoid tumors. *N Engl J Med* **340**, 858-68.
- La Rosee, A., Hader, T., Taubert, H., Rivera-Pomar, R. and Jackle, H.** (1997). Mechanism and Bicoid-dependent control of hairy stripe 7 expression in the posterior region of the Drosophila embryo. *Embo J* **16**, 4403-11.
- Landecker, H. L., Sinclair, D. A. and Brock, H. W.** (1994). Screen for enhancers of Polycomb and Polycomblike in Drosophila melanogaster. *Dev Genet* **15**, 425-34.
- Lane, M. E. and Kalderon, D.** (1994). RNA localization along the anteroposterior axis of the Drosophila oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev* **8**, 2986-95.
- Larsen, C. W., Hirst, E., Alexandre, C. and Vincent, J. P.** (2003). Segment boundary formation in Drosophila embryos. *Development* **130**, 5625-35..

- Launay, J. M., Herve, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C. G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G. et al.** (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**, 1129-35.
- Le Douarin, B., Heery, D. M., Gaudon, C., vom Baur, E. and Losson, R.** (2001). Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with nuclear hormone receptors. *Methods Mol Biol* **176**, 227-48.
- Lesch, K. P. and Merschedorf, U.** (2000). Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective. *Behav Sci Law* **18**, 581-604.
- Li, W., Ohlmeyer, J. T., Lane, M. E. and Kalderon, D.** (1995). Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and Drosophila imaginal disc development. *Cell* **80**, 553-62.
- Loric, S., Launay, J. M., Colas, J. F. and Maroteaux, L.** (1992). New mouse 5-HT₂-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett* **312**, 203-7.
- Loric, S., Maroteaux, L., Kellermann, O. and Launay, J. M.** (1995). Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol* **47**, 458-66.
- Manivet, P., Mouillet-Richard, S., Callebert, J., Nebigil, C. G., Maroteaux, L., Hosoda, S., Kellermann, O. and Launay, J. M.** (2000). PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* **275**, 9324-31.
- Manivet, P., Schneider, B., Smith, J. C., Choi, D. S., Maroteaux, L., Kellermann, O. and Launay, J. M.** (2002). The serotonin binding site of human and murine 5-HT_{2B} receptors: molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **277**, 17170-8.
- Martinez-Arias, A.** (1993). Development and patterning of the larval epidermis of Drosophila. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. C. S. H. L. Press), pp. 517-608.
- Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G. and Carrillo, J. J.** (2003). GPCR dimerisation. *Life Sci* **74**, 181-8.
- Mirsky, R., Parmantier, E., McMahon, A. P. and Jessen, K. R.** (1999). Schwann cell-derived desert hedgehog signals nerve sheath formation. *Ann N Y Acad Sci* **883**, 196-202.
- Morin, L. P.** (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* **31**, 12-33.
- Mosrin-Huaman, C., Canaple, L., Locker, D. and Decoville, M.** (1998). DSP1 gene of Drosophila melanogaster encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev Genet* **23**, 324-34.
- Mossner, R. and Lesch, K. P.** (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* **12**, 249-71.
- Muller, H. A. and Wieschaus, E.** (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila. *J Cell Biol* **134**, 149-63.
- Nauber, U., Pankratz, M. J., Kienlin, A., Seifert, E., Klemm, U. and Jackle, H.** (1988). Abdominal segmentation of the Drosophila embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene knirps. *Nature* **336**, 489-92.
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2000a). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9508-13.
- Nebigil, C. G., Etienne, N., Messaddeq, N. and Maroteaux, L.** (2003). Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *Faseb J* **17**, 1373-5.
- Nebigil, C. G., Etienne, N., Schaerlinger, B., Hickel, P., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2001a). Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci* **19**, 365-72.
- Nebigil, C. G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Douchet, M. P., Monassier, L., Gyorgy, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P. et al.** (2001b). Ablation of serotonin 5-HT_{2B} receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* **103**, 2973-9.
- Nebigil, C. G., Launay, J. M., Hickel, P., Tournois, C. and Maroteaux, L.** (2000b). 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2591-6.
- Neckameyer, W. S. and Leal, S. M.** (2002). Biogenic amines as circulating hormones in insects. In *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 3 (ed. E. Science), pp. 141-165.
- Neckameyer, W. S. and White, K.** (1992). A single locus encodes both phenylalanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in Drosophila. *J Biol Chem* **267**, 4199-206.

- Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E. and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle of *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux Archive Developmental Biology* **193**, 267-282.
- O'Dell, K. M., Jamieson, D., Goodwin, S. F. and Kaiser, K.** (1999). Abnormal courtship conditioning in males mutant for the RI regulatory subunit of *Drosophila* protein kinase A. *J Neurogenet* **13**, 105-18.
- Ohlmeyer, J. T. and Kalderon, D.** (1997). Dual pathways for induction of wingless expression by protein kinase A and Hedgehog in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **11**, 2250-8.
- O'Keefe, L., Dougan, S. T., Gabay, L., Raz, E., Shilo, B. Z. and DiNardo, S.** (1997). Spitz and Wingless, emanating from distinct borders, cooperate to establish cell fate across the Engrailed domain in the *Drosophila* epidermis. *Development* **124**, 4837-45.
- Onai, T., FitzGerald, M. G., Arakawa, S., Gocayne, J. D., Urquhart, D. A., Hall, L. M., Fraser, C. M., McCombie, W. R. and Venter, J. C.** (1989). Cloning, sequence analysis and chromosome localization of a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* **255**, 219-25.
- Pankratz, M. J., Seifert, E., Gerwin, N., Billi, B., Nauber, U. and Jackle, H.** (1990). Gradients of Kruppel and knirps gene products direct pair-rule gene stripe patterning in the posterior region of the *Drosophila* embryo. *Cell* **61**, 309-17.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-15.
- Payre, F., Vincent, A. and Carreno, S.** (1999). ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* **400**, 271-5.
- Pazdera, T. M., Janardhan, P. and Minden, J. S.** (1998). Patterned epidermal cell death in wild-type and segment polarity mutant *Drosophila* embryos. *Development* **125**, 3427-36.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K. et al.** (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* **273**, 14037-45.
- Pesacreta, T. C., Byers, T. J., Dubreuil, R., Kiehart, D. P. and Branton, D.** (1989). *Drosophila* spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis. *J Cell Biol* **108**, 1697-709.
- Pick, L.** (1998). Segmentation: painting stripes from flies to vertebrates. *Dev Genet* **23**, 1-10. Order.
- Piepenburg, O., Vorbruggen, G. and Jackle, H.** (2000). *Drosophila* segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol Cell* **6**, 203-9.
- Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 727-33.
- Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S. M.** (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *Embo J* **17**, 2067-78.
- Porter, J. A., Ekker, S. C., Park, W. J., von Kessler, D. P., Young, K. E., Chen, C. H., Ma, Y., Woods, A. S., Cotter, R. J., Koonin, E. V. et al.** (1996). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* **86**, 21-34.
- Pourquie, O., Coltey, M., Teillet, M., Ordahl, C. and Douarin, N. L.** (1993). Control of dorsoventral patterning of somites derivatives by notochord and floor plate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5242-5246.
- Riddihough, G. and Ish-Horowicz, D.** (1991). Individual stripe regulatory elements in the *Drosophila* hairy promoter respond to maternal, gap, and pair-rule genes. *Genes Dev* **5**, 840-54.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R.** (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-57.
- Roux, C., Madani, M., Launay, J. M., Rey, F., Citadelle, D., Mulliez, N. and Kolf, M.** (1995). Serotonin deficiency in phenylketonuria embryopathy. *Toxicol. In vitro* **9**, 653-662.
- Ruangvoravat, C. P. and Lo, C. W.** (1992). Restrictions in gap junctional communication in the *Drosophila* larval epidermis. *Dev Dyn* **193**, 70-82.
- Sanson, B.** (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep* **2**, 1083-8.
- Sanson, B., Alexandre, C., Fascetti, N. and Vincent, J. P.** (1999). Engrailed and hedgehog make the range of Wingless asymmetric in *Drosophila* embryos. *Cell* **98**, 207-16.
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassat, J. L., Borrelli, E. and Hen, R.** (1990). Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *Embo J* **9**, 3611-7.

- Saudou, F., Boschert, U., Amlaiky, N., Plassat, J. L. and Hen, R.** (1992). A family of Drosophila serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *Embo J* **11**, 7-17.
- Schaerlinger, B., Hickel, P., Etienne, N., Guesnier, J.-L. and Maroteaux, L.** (2003). Agonist actions of dihydroergotamine at 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors and their relevance to antimigraine efficacy. *British Journal of Pharmacology*.
- Schejter, E. D. and Wieschaus, E.** (1993). bottleneck acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the Drosophila embryo. *Cell* **75**, 373-85.
- Schock, F. and Perrimon, N.** (2003). Retraction of the Drosophila germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev* **17**, 597-602.
- Schweisguth, F.** (2004). [Genetic basis of planar polarity]. *Med Sci (Paris)* **20**, 424-30.
- Schweisguth, F., Lepesant, J. A. and Vincent, A.** (1990). The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **4**, 922-31.
- Shore, P. A., Pletscher, A., Tomich, E. G., Kuntzman, R. and Brodie, B. B.** (1956). Release of blood platelet serotonin by reserpine and lack of effect on bleeding time. *J Pharmacol Exp Ther* **117**, 232-6.
- Shuey, D. L., Sadler, T. W., Tamir, H. and Lauder, J. M.** (1993). Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* **187**, 75-85.
- Slusarski, D. C., Corces, V. G. and Moon, R. T.** (1997a). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410-3.
- Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. and Moon, R. T.** (1997b). Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* **182**, 114-20.
- Stevens, L.** (1998). Twin peaks: Spitz and Argos star in patterning of the Drosophila egg. *Cell* **95**, 291-4.
- Straub, K. L., Stella, M. C. and Leptin, M.** (1996). The gelsolin-related flightless I protein is required for actin distribution during cellularisation in Drosophila. *J Cell Sci* **109**, 263-70.
- Szuts, D., Freeman, M. and Bienz, M.** (1997). Antagonism between EGFR and Wingless signalling in the larval cuticle of Drosophila. *Development* **124**, 3209-19.
- Talley, N. J.** (2001). Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* **358**, 2061-8.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tolwinski, N. S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S. and Wieschaus, E.** (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell* **4**, 407-18.
- Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J. M. and Kellermann, O.** (1998). Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **273**, 17498-503.
- Twarog, B. M. and Page, I. H.** (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**, 157-61.
- Urban, S., Brown, G. and Freeman, M.** (2004). EGF receptor signalling protects smooth-cuticle cells from apoptosis during Drosophila ventral epidermis development. *Development* **131**, 1835-45.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J.** (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613-22.
- Walter, M. F., Black, B. C., Afshar, G., Kermabon, A. Y., Wright, T. R. and Biessmann, H.** (1991). Temporal and spatial expression of the yellow gene in correlation with cuticle formation and dopa decarboxylase activity in Drosophila development. *Dev Biol* **147**, 32-45.
- Watts, S. and Cohen, M.** (1999). Vascular 5-HT Receptors: Pharmacology and Pathophysiology of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors. *Neurotransmission* **15**, 3-11.
- Wiellette, E. L. and McGinnis, W.** (1999). Hox genes differentially regulate Serrate to generate segment-specific structures. *Development* **126**, 1985-95.
- Witz, P., Amlaiky, N., Plassat, J. L., Maroteaux, L., Borrelli, E. and Hen, R.** (1990). Cloning and characterization of a Drosophila serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8940-4.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A. F. and Hirano, T.** (2002). Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* **2**, 363-75.

- Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W. and Lauder, J. M.** (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* **47**, 573-84.
- Yoshida, S., Muller, H. A., Wodarz, A. and Ephrussi, A.** (2004). PKA-R1 spatially restricts Oskar expression for Drosophila embryonic patterning. *Development* **131**, 1401-10.
- Zallen, J. A. and Wieschaus, E.** (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in Drosophila. *Dev Cell* **6**, 343-55.
- Zeidler, M. P., Bach, E. A. and Perrimon, N.** (2000). The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598-606.