

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie
Spécialité : Biologie du Développement

Présentée par
Cécile JACQUES

en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur

*Etude du rôle et du mécanisme d'action
des facteurs de transcription
Glial cell deficient/Glial cells missing
au cours du développement*

Soutenue le 22 octobre 2007 devant le jury composé de :

Professeur Claude DESPLAN
Docteur Michel GHO
Professeur Jean-Marc REICHHART
Docteur Angela GIANGRANDE

(Rapporteur)
(Rapporteur)
(Rapporteur)
(Directrice de thèse)

A mes parents,

A My Dear,

Je me suis toujours senti assez artiste pour puiser librement dans mon imagination. La connaissance est limitée, l'imagination saisit le monde. Je vous jure que mon don de fantaisie a eu plus d'importance pour moi que ma capacité d'absorber des connaissances. L'esprit intuitif est un don sacré et l'esprit rationnel son serviteur fidèle. Hélas, nous avons créé une société qui honore le serviteur et a oublié le don.

[Albert Einstein]

REMERCIEMENTS

Tout d'abord un grand merci **Professeur Claude DESPLAN**, **Professeur Jean-Marc REICHHART** et **Docteur Michel GHO** d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse. Merci aussi pour votre accessibilité !!

Je remercie ensuite **Docteur Angela GIANGRANDE** pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe et d'avoir pu ainsi évoluer dans un environnement scientifique exceptionnel. Un grand merci également pour vos conseils avisés.

Un grand merci à toutes les personnes de l'équipe, d'aujourd'hui et d'hier.. **Céline DIEBOLD** pour ton aide technique certes mais surtout pour ton amitié. Tu as toujours été là, dans les moments joyeux comme dans les difficiles !!! Tu es quelqu'un de précieux, ne l'oublie jamais !! **István NAGY** ou monsieur « hémocytes » pour ton aide sur le projet hématopoïétique et pour ton soutien moral.. **Benoît AIGOUY** qui m'a beaucoup aidée lors de mon DEA afin que je sois bien préparée à ce fameux concours.. **Rossana DE IACO** (un petit bout de femme adorable et très bonne cuisinière), **Bahar SAHIN** (la plus gentille fille que je connaisse), **Berra ERKOSAR** (ou mademoiselle paranormale ☺), **Abrar QURASHI** (j'espère que je te fais plus peur maintenant !!), **Stefano MONTELLI** (mon petit italien préféré, la force tranquiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiille.. à quand nos prochaines escapades au soleil ?), et tous les autres..

Merci aussi aux « petits gars » du service imagerie, **Didier HENTSCH**, **Pascal KESSLER**, **Marc KOCH**, **Marcel BOEGLIN** et **Jean-Luc VONESCH**, pour votre aide, votre gentillesse et pour les chocolats !!

Merci à **Luc VANOLST** pour avoir répondu à toutes mes questions (et elles furent nombreuses) sur la technique du double hybride.

Je remercie aussi tous mes amis qui ont toujours été là pour moi ! Vous êtes tous géniaux !! **Céline** (encore toi), **Peggy**, **Anne-Laure**, **Cathy**, **Alexis**, **Fabrice**, **Cyril** (Krill), **Sabrina**, **Caro**, **Sophie**.. et les autres..

Merci aussi à mes petits parents qui ont eu l'impression d'avoir perdu leur fille je ne sais où.. eh oui.. faire une thèse c'est faire don de son corps à la science de son vivant !!

Et le meilleur pour la fin.. **Laurent SOUSTELLE**, mon petit chef pendant ces 5 années. C'est à toi que je dois tout !!! Sincèrement tu es le petit chef idéal à mes yeux ! Passionné, rigoureux, critique.. Tu sais tirer le meilleur des gens et tu transmets tes connaissances avec passion.. Tout ce que j'ai appris je te le dois (enfin presque.. je me le dois aussi un peu quand même !! ☺) ! J'espère que la communauté scientifique saura t'apprécier à ta juste valeur, car tu es exceptionnel !! Et à côté du petit chef tu m'as aussi beaucoup appris humainement.. Tu es un ami sincère et fidèle ! Saches que tu garderas toujours une place de choix dans mon cœur.. Mais.. Allez **SOCHAUX** !! ☺ (ma thèse a peut être les couleurs de l'OM mais j'en resterai là.. !!)

ABBREVIATIONS

3-AT : 3-Amino-1,2,4-Triazole

AA : acide aminé

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

β-Gal : β-Galactosidase

bHLH : basic Helix Loop Helix

BrdU : BromodéoxyUridine

BTB : Bric-à-brac Tramtrack Broad

CG : Computed Genes

cbcs : central brain clusters

CSP : Centre de Signalisation Postérieur

DBD : domaine de liaison à l'ADN

EBF : Early B-cell Factor

EGF : Early Growth Factor

Egfr : Early growth factor receptor

EGR : Early Growth Response

ER : Engrailed Repressor

GB : glioblastes

GBS : Gcm Binding Sites

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GFP : Green Fluorescent Protein

GOF : Gain Of Function

GMC : Ganglion Mother Cell

GPCs : Glial Precursor Cells

GST : Glutathion S-Transferase

HBS : Huckebein Binding Sites

His : Histidine

IGPDH : Imidazole Glycerol Phosphate DeHydrationase

IPMDH : IsoPropylMalate DeHydrogenase

JAK/STAT : Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription

kb : kilobases

Leu : Leucine

LOF : Loss Of Function

LPCs : Lamina Precursor Cells

MARCM : Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker

MAP2 : Microtubule-Associated Protein 2

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MICAL : Molecule Interacting with CasL

NB : neuroblaste

nBLAST : nucleotid Basic Local Alignment Search Tool

NRSF : Neural Restricted Silencing Factor

NGB : neuroligoblaste

NLS : signal de localisation nucléaire

OPC : Outer Proliferation Center

PEST : proline (P) glutamate (E) sérine (S) thréonine (T)

PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT

Pro-PO : proPhénolOxydase

REST : Repressor Element RE-1 Silencing Transcription factor

RT-PCR : Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling

SOP : Sensory Organ Precursor

SPG : glie subpérineurale

TEV : Tobacco Etch Virus

Trp : tryptophane

UAS : Upstream Activating Sequence

VP16 : protéine 16 du virus de l'herpès

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

ZC : Zone Corticale

ZM : Zone Médulaire

Etude du rôle et du mécanisme d'action des facteurs de transcription Glial cell deficient/Glial cells missing au cours du développement

Directrice de Thèse : **Dr Angela GIANGRANDE**

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
CNRS/INSERM/ULP - 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch

Les facteurs de transcription Glial cell deficient/Glial cells missing (Gcm) et Gcm2 sont connus pour leur rôle de déterminants gliaux et dans la différenciation des plasmatocytes chez l'embryon de drosophile. Avant que je débute ma thèse, il avait été observé que ces facteurs de transcription sont également présents dans les cellules tendon de l'embryon. Le but de ma thèse fut de déterminer comment un facteur de transcription agit dans plusieurs voies développementales.

La première partie de ma thèse fut donc consacrée à déterminer le rôle de Gcm dans ces cellules. J'ai tout d'abord mis en évidence que les gènes *gcm* et *gcm2* sont exprimés dans une sous-population de cellules tendon et qu'ils sont requis pour leur différenciation terminale. En effet, en perte de fonction pour *gcm* et *gcm2*, l'attachement des muscles aux cellules tendon est altéré, bien que chez ces embryons, la cascade moléculaire induite par *stripe*, le déterminant des cellules tendon, est normale. J'ai ensuite mis en évidence que *gcm* induit une nouvelle voie de signalisation dans les cellules tendon qui est impliquée dans leur différenciation terminale, ce qui permet l'établissement d'un site d'attachement muscle/cellule tendon fonctionnel.

Dans un second temps, j'ai participé à une étude sur la spécification des cellules gliales chez l'embryon. En effet, le système nerveux comprend différents types de glie. La différenciation des cellules gliales est initiée par *gcm*, cependant est-il impliqué dans les mécanismes de spécification ? En suivant un lignage glial, nous avons montré que la spécification gliale fait intervenir de hauts niveaux d'expression de *gcm* et ceci grâce à un cofacteur lignage spécifique, Hucklebein, qui interagit physiquement avec Gcm entraînant ainsi son autorégulation.

Dans un troisième temps, en collaboration avec l'équipe du Dr Soula (Toulouse), nous avons cherché à déterminer un possible rôle des orthologues de Gcm dans le système nerveux des vertébrés, celui-ci étant toujours discuté. Nous avons montré pour la première fois que l'orthologue *c-GCM1* chez le poulet est exprimé dans les précurseurs neuraux de la moelle épinière durant l'embryogenèse et qu'il est requis pour que ceux-ci se différencient en neurones. De façon surprenante, ce rôle neurogénique n'est pas spécifique aux vertébrés. En effet, nous avons également mis en évidence que les gènes de type *gcm* sont exprimés et requis dans des

lignages neuronaux du cerveau de la drosophile aux stades post-embryonnaires. De même, *gcm* et ses orthologues *c-GCM1* et *m-GCM1* (souris) sont capables d'induire des marqueurs neuronaux dans les cellules HeLa.

Toutes ces études nous ont permis de montrer que le rôle spécifique des facteurs de transcription Gcm dépend du contexte cellulaire où ils sont exprimés. J'ai donc réalisé un crible double-hybride qui m'a permis l'identification de plusieurs cofacteurs de Gcm intéressants, dont *dpas*. L'étude de ce cofacteur m'a permis de montrer une implication de Gcm au cours l'hématopoïèse larvaire. En effet, en perte de fonction pour *gcm-gcm2*, il y a une différenciation massive de lamellocytes chez la larve, type d'hémocytes normalement absents en conditions non immunes. Cette différenciation de lamellocytes semble faire intervenir la voie de signalisation JAK/STAT. Cette étude est toujours en cours, mais à terme nous permettra de mettre en évidence une nouvelle fonction des gènes *gcm* au cours du développement.

Mots clés

Glial cell deficient/Glial cells missing, Drosophile, Vertébrés, Différenciation des cellules tendon, Spécification gliale, Gliogenèse, Neurogenèse, Hématopoïèse larvaire.

Ce travail a été financé par le Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT) et par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

Role and mechanisms action of Glial cell deficient/Glial cells missing transcription factors during development

Supervisor : **Dr Angela GIANGRANDE**
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
CNRS/INSERM/ULP - 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch

In the fly embryo, transcription factors (TFs) Glial cell deficient/Glial cells missing (Gcm) and Gcm2 are known glial determinants that are also necessary for plasmatocyte differentiation. Moreover, both TFs are expressed in embryonic tendon cells. Thus, the goal of my PhD was to determine how a single TF acts in several developmental pathways.

As first, I wanted to determine the role Gcm and Gcm2 plays in tendon cells. Here, I show that *gcm* and *gcm2* are expressed in a subpopulation of embryonic tendon cells and are required for their terminal differentiation. In *gcm-gcm2* loss of function mutants, the attachment of the muscle to tendon cells is altered, even though the molecular cascade induced by tendon cell determinant *stripe* is normal. I have determined that Gcm induces a previously unknown signaling pathway involved in terminal tendon cells differentiation, which allows the establishment of functional muscle attachment sites.

Second, I took part in a study aiming to understand the specification of glial cells in fly embryos in which different types of glial cells exist. It is well known that glial differentiation requires Gcm, but is Gcm also implicated in glia specification mechanisms? By following an identified glial lineage, I here show that high *gcm* expression levels trigger glia specification; which is mediated by cell-specific protein-protein interactions. Hucklebein, a lineage specific factor, physically interacts with Gcm and thereby triggers its autoregulation.

Third, in collaboration with the team of Dr. Soula (Toulouse), we sought to determine a possible role of Gcm orthologs in vertebrate nervous system. We have showed for the first time that the chicken ortholog of fly *gcm*, *c-GCM1*, is expressed in early neuronal lineages of the developing spinal cord and is required for neural progenitors to differentiate as neurons. Strikingly, this neurogenic role is not specific to the vertebrate gene, as fly *gcm* genes are expressed and required in post-embryonic brain neuronal lineage in *Drosophila*. We have discovered that *gcm* and its orthologs *c-GCM1* and mouse *m-GCM1* are able to induce the expression of neuronal markers when transfected into HeLa cells.

These studies enabled us to show that the specific role of Gcm TFs depends on the cellular context of their expression. I thus performed a double-hybrid screen, which allowed me

the identification of several Gcm cofactors, one of which being *dpas*. Further studies on *dpas* enabled me to found the implication of Gcm in post-embryonic hematopoiesis. Indeed, hemocyte-specific *gcm-gcm2* loss of function results in a massive differentiation of lamellocytes, a hemocyte subpopulation that is absent from larvae under no immune conditions. My preliminary results suggest that the JAK/STAT signaling pathway is involved in this phenotype. This study is still underway, but in the long term will allow us to highlight a new function of the *gcm* genes during post-embryonic development.

Key Words

Glial cell deficient/Glial cells missing, *Drosophila*, Vertebrates, Tendon cells differentiation, Glial specification, Gliogenesis, Neurogenesis, Post-embryonic hematopoiesis.

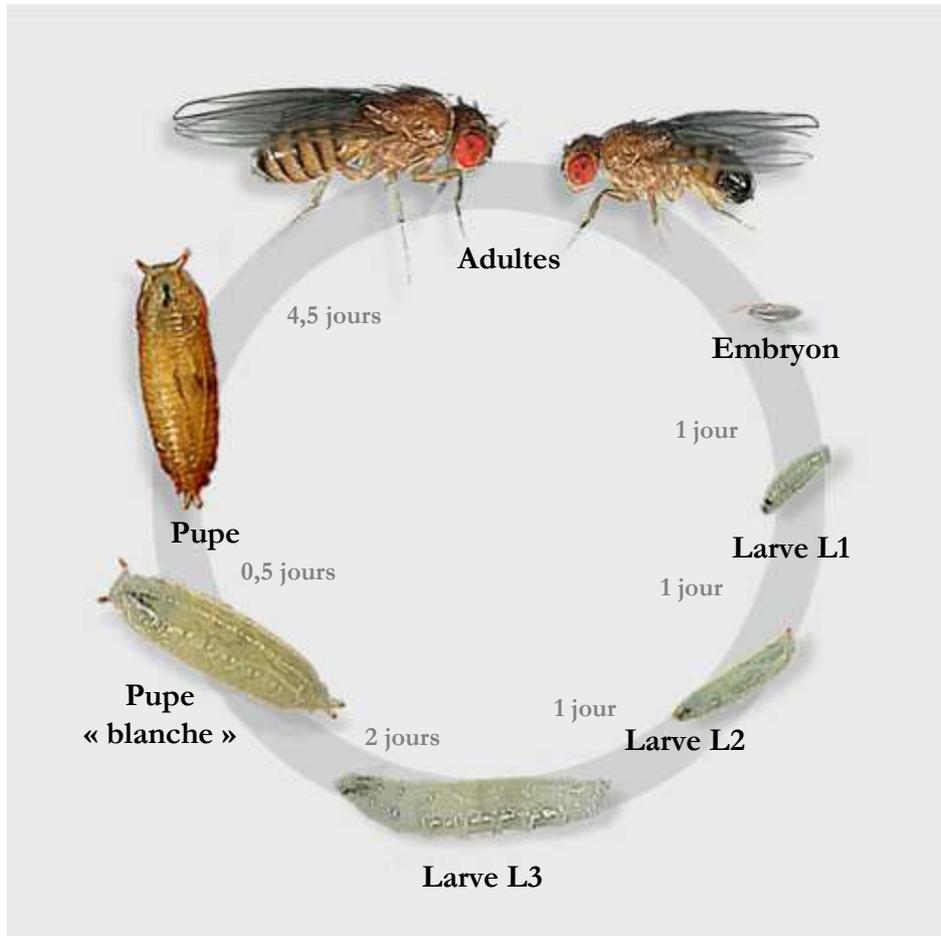
This work was supported by the « Ministère de la Recherche et des Technologies » (MRT) and by « Association pour la Recherche sur le Cancer » (ARC).

SOMMAIRE

➤ INTRODUCTION.....	16
I. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GCM.....	17
II. DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX DE LA DROSOPHILE.....	19
A. Le système nerveux de la drosophile.....	19
B. Origine des cellules gliales et des neurones.....	19
1. Mode de division des différents types de neuroblastes.....	20
2. La différenciation des neuroblastes.....	20
2.1. Chez l'embryon.....	20
2.2. Chez la larve.....	22
3. Le système visuel.....	23
4. Les organes sensoriels.....	25
C. La régulation du destin glial.....	26
1. Rôle de <i>glial cell deficient/glial cells missing</i>	26
2. La différenciation gliale.....	27
III.L'HEMATOPOIESE CHEZ LA DROSOPHILE.....	32
A. Les hémocytes et leurs fonctions au cours du développement et dans la réponse immunitaire cellulaire.....	32
1. Les prohématocytes.....	32
2. Les plasmatoctes et la phagocytose.....	33
3. Les cellules à cristaux et la mélanisation.....	34
4. Les lamellocytes.....	35
5. L'encapsulation des parasites.....	35
B. Les différentes origines des hémocytes.....	36
1. L'hématopoïèse embryonnaire.....	37
2. L'hématopoïèse larvaire.....	38
2.1. Ontogénie de la glande lymphatique.....	38
2.2. L'hématopoïèse dans la glande lymphatique.....	38
C. Régulation génétique de l'hématopoïèse.....	40
1. Le déterminant hématopoïétique : <i>Serpent</i>	40
2. Les déterminants plasmatoctaires : <i>Gcm</i> et <i>Gcm2</i>	41
3. Le déterminant des cellules à cristaux : <i>Lozenge</i>	42

4. Relations entre Gcm-Gcm2 et Lozenge.....	43
5. Le répresseur du destin cellules à cristaux : U-shaped.....	44
6. Le récepteur PVR.....	45
7. Les facteurs impliqués spécifiquement dans l'hématopoïèse larvaire.....	45
7.1. La voie de signalisation Notch.....	45
7.2. Le facteur de transcription Collier.....	46
7.3. La voie de signalisation JAK/STAT.....	47
III. LES SITES D'ATTACHEMENTS MUSCULAIRES CHEZ L'EMBRYON : LES CELLULES TENDON.....	50
A. Le système musculaire de la drosophile.....	50
B. La détermination des précurseurs des cellules tendon.....	51
C. L'assemblage muscles – tendons.....	52
1. Les cellules tendon et le guidage des muscles.....	52
2. La maturation des cellules tendon.....	53
3. La différenciation terminale des cellules tendon.....	54
IV. LES ORTHOLOGUES DE Gcm ET Gcm2.....	56
A. Fonctions des gènes <i>GCM1</i> et <i>GCM2</i> chez les vertébrés.....	56
1. Rôle de <i>GCM1</i>	56
2. Rôle de <i>GCM2</i>	57
B. Expression et rôle des gènes <i>Gcm</i> dans le système nerveux des vertébrés.....	58
1. <i>GCM1</i>	59
2. <i>GCM2</i>	61
➤ RESULTATS.....	63
I. PUBLICATION 1 : Terminal tendon cell differentiation requires the <i>glide/gcm</i> complex.	63
II. PUBLICATION 2 : Hucklebein-mediated autoregulation of <i>Glide/Gcm</i> triggers <i>glia</i> specification.	72
III. PUBLICATION 3 : Neurogenic role of <i>Gcm</i> transcription factors is conserved in chicken spinal cord.	76
IV. IDENTIFICATION DES COFACTEURS POTENTIELS DE Gcm À L'AIDE D'UN CRIBLE DOUBLE HYBRIDE.....	84
A. Principe du système double hybride chez la levure.....	84
B. L'appât.....	87
C. La banque d'ADNc : les proies.....	88

D. Crible de la banque.....	89
E. Les cofacteurs potentiels de Gcm.....	90
1. Les gènes « connus ».....	90
2. Les gènes « inconnus ».....	96
V. ETUDE DU ROLE DE Gcm-Gcm2 DANS L'HEMATOPOIESE POST-EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE.....	98
A. <i>dpias</i> : un interacteur de Gcm identifié par double hybride chez la levure.....	98
B. Induction de tumeurs mélaniques en condition mutante perte de fonction pour <i>gcm-gcm2</i> et <i>dpias</i>	98
C. Le phénotype de tumeurs mélaniques obtenu dans les expériences de perte de fonction <i>gcm-gcm2</i> requiert <i>hop</i>	102
D. Le gain de fonction pour <i>gcm</i> et <i>gcm2</i> induit une diminution de la prolifération des hémocytes.....	103
E. Approche génétique pour la recherche des tissus nécessitant la fonction de <i>gcm-gcm2</i> .	104
F. Domaine d'expression de <i>gcm</i> et de <i>gcm2</i>	106
1. Détermination du profil d'expression de <i>gcm</i> dans les tissus hématopoïétiques aux stades post-embryonnaires.....	106
1.1. Les lignées piège à enhancer.....	106
1.2. Approche par RT-PCR sur cellules <i>serpent</i> positives.....	108
2. <i>gcm</i> n'est pas exprimé dans la glande lymphatique embryonnaire.....	109
G. Analyse des lignées <i>gcm-Gal4</i> , <i>UAS-encGFP</i> et <i>gcm^{rA87}</i> parasitées par <i>Leptopilina boulardi</i> .	110
➤ DISCUSSION.....	112
I. La différenciation terminale des cellules tendon embryonnaire nécessite le complexe <i>gcm-gcm2</i>	112
II. L'interaction entre le déterminant glial Gcm et Hucklebein spécifie un sous type glial.	116
III. Neuronal cells missing : un rôle conservé au cours de l'évolution.....	117
IV. Régulation de l'activité de Gcm via des cofacteurs.....	120
V. Rôle de Gcm au cours de l'hématopoïèse post-embryonnaire.....	123
CONCLUSION.....	126
➤ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	128



D'après <http://flymove.uni-muenster.de/>

Figure 1. Cycle de développement à 25°C de *Drosophila melanogaster*. Le développement de la drosophile s'étend sur 10 jours et passe par 4 stades : embryonnaire, larvaire, pupal et adulte. L'état pupa « blanche » est l'état intermédiaire entre la larve et la pupa. La durée de chaque stade est indiquée sur le schéma.

Un des buts majeurs de la biologie du développement est de comprendre comment la diversité cellulaire est générée sachant qu'une même fonction peut être réalisée par des gènes différents (redondance) et qu'un même gène peut avoir des fonctions différentes selon le contexte physiologique dans lequel il s'exprime.

De part la conservation évolutive des processus biologiques majeurs, *Drosophila melanogaster* est un modèle de choix pour étudier les bases de la biologie du développement et la fonction des gènes chez les vertébrés supérieurs, dont l'homme, car elle permet des approches génétiques, moléculaires et fonctionnelles des gènes.

La drosophile est un insecte diptère holométabole dont le cycle de développement, composé de différentes étapes, dure 10 jours à 25°C (**Figure 1**). Pendant l'embryogenèse, qui s'étale sur 24 h, se déroule la mise en place des structures larvaires. Puis, viennent trois stades larvaires successifs, ponctués par des mues, où les structures adultes vont commencer à se différencier et/ou proliférer. Les larves vont ensuite s'encapsuler dans le puparium et subissent une métamorphose pendant laquelle les structures larvaires sont lysées et les structures adultes mises en place. La métamorphose s'étend sur cinq jours, suite à laquelle l'adulte émerge.

Une des thématiques de notre laboratoire porte sur la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de différenciation gliale par l'intermédiaire de l'étude des facteurs de transcription de type Glial cell deficient/Glial cells missing. Ces facteurs de transcription sont également présents dans d'autres tissus que la glie et leurs orthologues ayant été mis en évidence, le but de ma thèse fut d'étudier le rôle et le mécanisme d'action de ces facteurs de transcription au cours du développement.

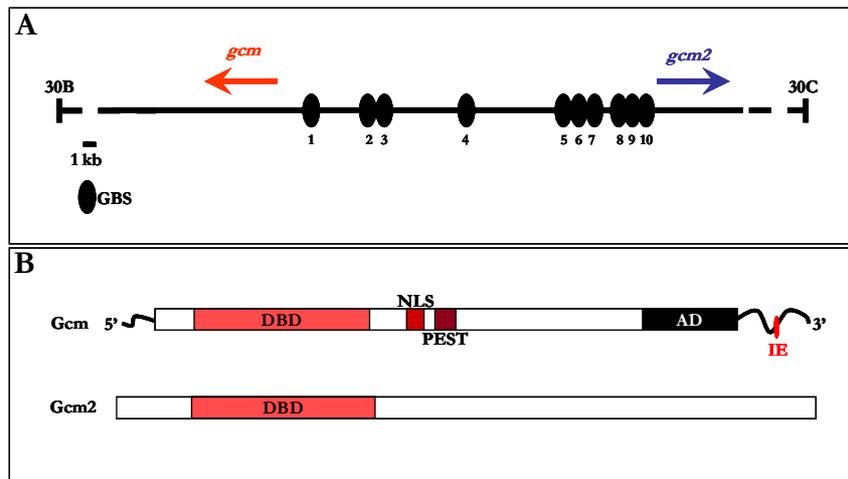
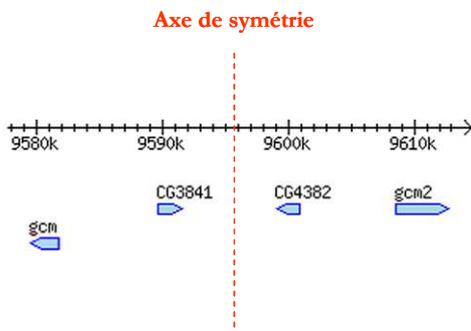


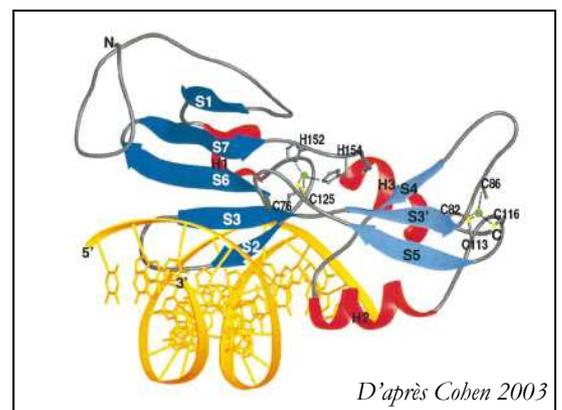
Figure 2. Le complexe *gcm-gcm2* et les facteurs de transcription Gcm chez la drosophile. (A) Représentation du locus *gcm-gcm2* chez *Drosophila melanogaster*. Les flèches indiquent les régions transcrites. Les structures ovales représentent les motifs consensus GBS (Gcm Binding Sites). 30B et 30C indiquent la localisation du locus sur le chromosome 2. (B) Structure des protéines Gcm et Gcm2 : AD, domaine d'activation ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; NLS, signal de localisation nucléaire ; PEST, séquence d'instabilité protéique. Les régions non traduites (UTR) en 5' et 3' de *gcm* sont également représentées. L'UTR en 3' de *gcm* contient un élément d'instabilité de l'ARNm (IE).



Issu de Flybase

Figure 3. Les gènes *gcm* et *gcm2* de la drosophile sont issus d'une duplication génétique. Schéma représentant le complexe *gcm-gcm2*. Entre les deux homologues *gcm* et *gcm2* se trouvent deux gènes, *CG3841* et *CG4382*, qui codent pour des protéines homologues à 37 %. En considérant l'homologie de *gcm-gcm2* et de *CG3841-CG4382* et que ces gènes ont des orientations opposées, un axe de symétrie peut être tracé entre les gènes *CG3841* et *CG4382*. L'échelle indique la position du locus *gcm-gcm2* sur le chromosome 2L.

Figure 4. Le domaine GCM. Représentation du domaine GCM lié à l'ADN. Les feuillettes β du grand et du petit domaine sont représentés respectivement en bleu foncé et bleu clair. Les hélices H1, H2 et H3 sont en rouge, l'ADN est montré en jaune et les deux ions Zn sont en vert. Les résidus en contact avec les ions Zn sont indiqués.



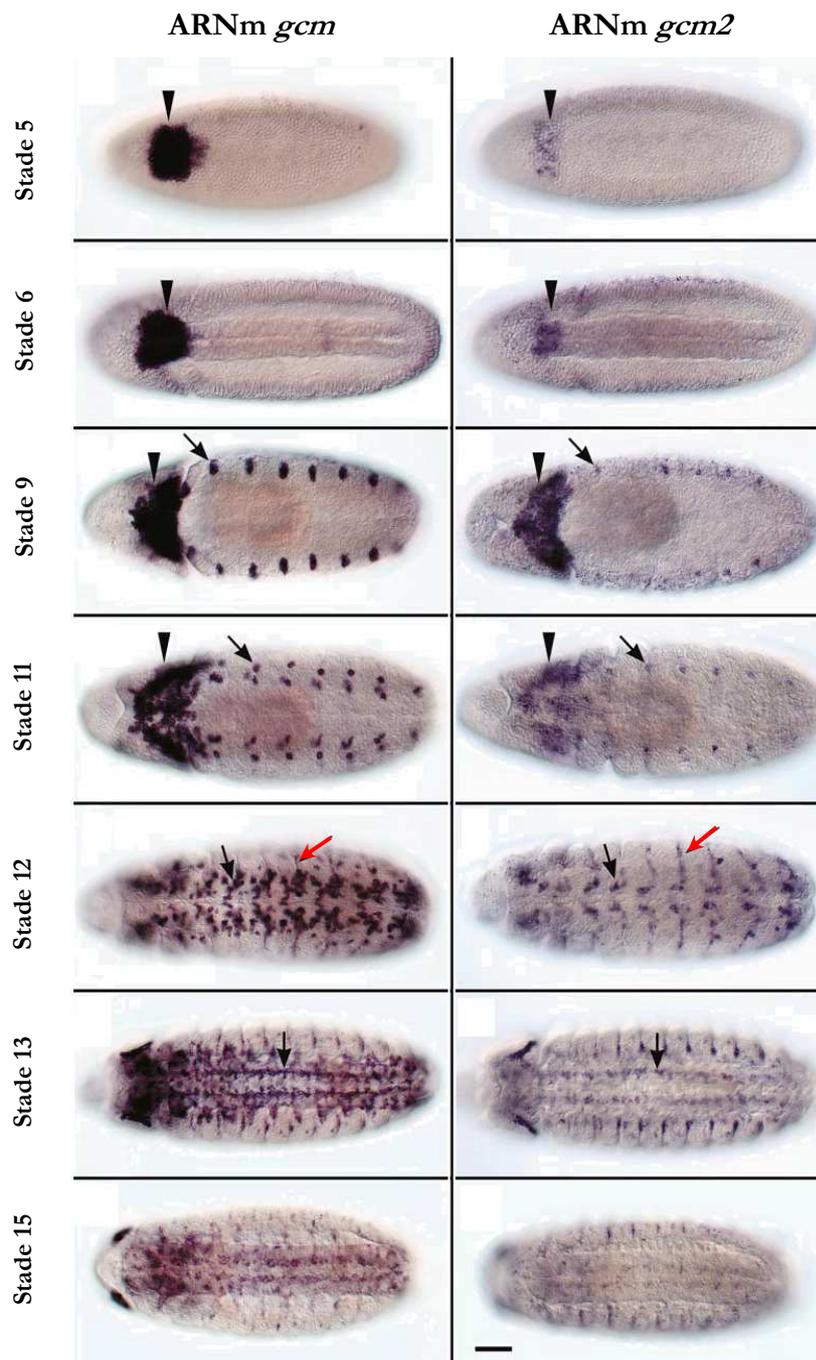
D'après Coben 2003

I. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GCM

Le gène *glial cell deficient/glial cells missing* (*glide/gcm*, appelé *gcm* dans le reste du manuscrit pour plus de simplicité) code pour un facteur de transcription transactivateur de 504 acides aminés (**Figure 2**) qui contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine d'activation de la transcription (AD) et un motif PEST (riche en proline, glutamate, sérine et thréonine) impliqué dans la dégradation des protéines. Dans la région 3' non traduite de l'ARNm de *gcm* est également présent un motif d'instabilité de l'ARNm (Hosoya et al., 1995 ; Schreiber et al., 1997) suffisant pour induire sa dégradation (Soustelle et Giangrande, 2007a).

Un seul homologue de *gcm*, *gcm2*, issu d'une duplication génétique (**Figure 3**) a été identifié dans le génome de la drosophile (Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). De façon intéressante, la plus grande homologie entre ces deux facteurs de transcription est présente dans le DBD (69 %), la région C-terminale n'étant que très faiblement conservée (**Figure 2**).

Gcm et Gcm2 représentent une nouvelle classe de facteurs de transcription possédant un DBD à doigts de zinc d'un type nouveau : le domaine GCM (**Figure 4**) (Akiyama et al., 1996 ; Schreiber et al., 1997 ; Cohen et al., 2003), qui ne contient pas de motif caractéristique des facteurs de transcription à doigt de zinc (Akiyama et al., 1996). Ce domaine de 150 résidus est capable de se lier à un motif consensus de huit paires de bases appelé GBS (pour Gcm Binding Site) : 5'-AT(G/A)CGGG(T/C)-3' (Akiyama et al., 1996 ; Schreiber et al., 1997 ; Miller et al., 1998 ; Cohen et al., 2002). Il a été mis en évidence que ce DBD n'a aucune similarité avec les autres domaines de liaison à l'ADN décrits jusqu'à présent (Akiyama et al., 1996 ; Schreiber et al., 1997 ; Cohen et al., 2002 ; Shimizu et al., 2003). Pour cette raison, le Dr Cohen et ses



D'après Alfonso et Jones 2002

Figure 5. Profils d'expression de *gcm* et *gcm2* au cours de l'embryogenèse. Hybridation *in situ* *gcm* et *gcm2* sur des embryons en vue ventrale, le côté antérieur à gauche. Le stade de développement est indiqué à gauche. *gcm* et de *gcm2* sont exprimés du stade 5 au stade 12 dans les précurseurs des hémocytes (têtes de flèches). *gcm* et *gcm2* sont exprimés dès le stade 9 jusqu'en fin d'embryogenèse dans les précurseurs gliaux (flèches). Il peut également être noté une expression de *gcm* et de *gcm2* dans une rangée de cellules épidermiques à partir du stade 12 jusqu'en fin d'embryogenèse (flèches rouges). Tout au long du développement *gcm* est exprimé à un niveau plus élevé que *gcm2*. Barre d'échelle 50 μ m.

collaborateurs (Cohen et al., 2003) ont analysé la structure du DBD GCM en interaction avec l'ADN (**Figure 4**). Le domaine GCM consiste en un grand et un petit domaine, connectés ensemble par un ion zinc, et comprenant respectivement cinq et trois feuillets β . Le domaine à cinq feuillets β est perpendiculaire à l'axe de l'ADN et définit de ce fait une nouvelle utilisation des feuillets β dans l'identification de l'ADN (Cohen et al., 2003).

gcm et *gcm2* présentent un profil d'expression semblable au cours de l'embryogenèse (**Figure 5**), excepté que *gcm2* est exprimé à un niveau plus faible que *gcm* (Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). Ces deux gènes sont exprimés dans le système nerveux, les hémocytes et les cellules tendons de l'embryon (**Figure 5**). Dans la suite de ma thèse j'aborderai tout d'abord le développement du système nerveux avec le rôle de *gcm-gcm2* dans la détermination gliale ; puis je présenterai les différents aspects de l'hématopoïèse chez la drosophile ainsi que la fonction des gènes *gcm-gcm2* lors de ce processus ; j'exposerai par après la mise en place des sites d'attachements musculaires et pour finir je présenterai les différents rôles des gènes *gcm* au cours de l'évolution.

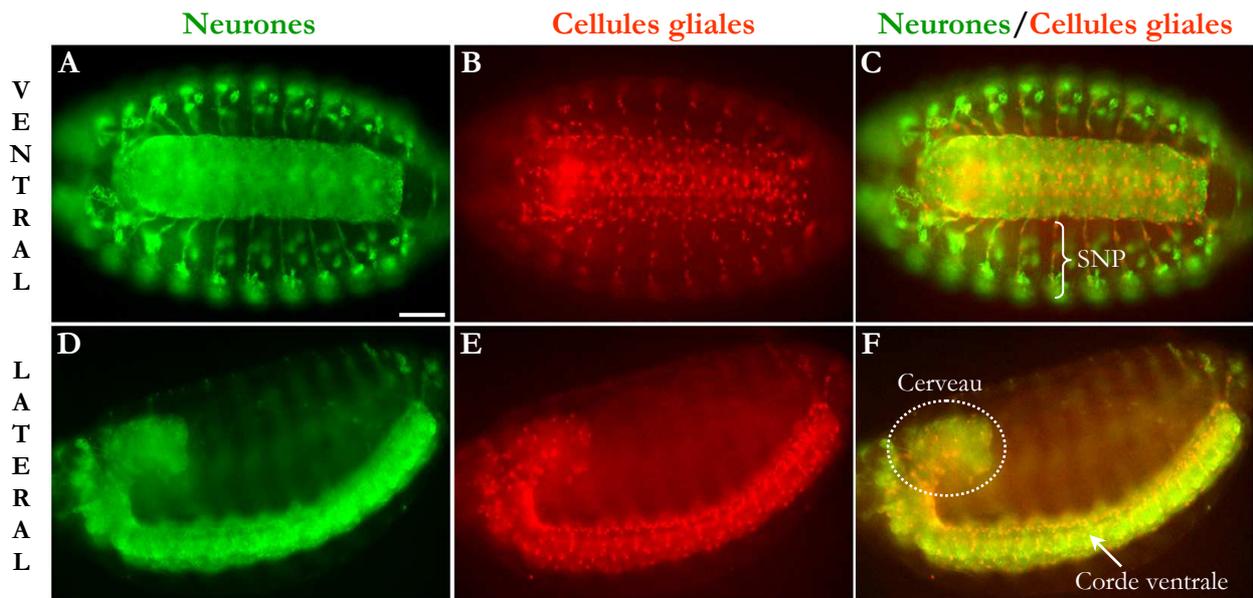


Figure 6. Système nerveux embryonnaire de drosophile. Co-immunomarquage anti-22C10 marquant spécifiquement les neurones (vert) et anti-Repo marquant le noyau des cellules gliales latérales (rouge). (C,D) Montrent simultanément les deux marquages. Embryon de stade 16 en vue ventrale (A-C) et en vue latérale (D-F). Le système nerveux périphérique (SNP) est montré à l'aide d'une accolade en (C). (F) Le système nerveux central est composé d'un cerveau (entouré de pointillés) et de la corde ventrale (flèche). Barre d'échelle 50 μm .

II. DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX DE LA DROSOPHILE

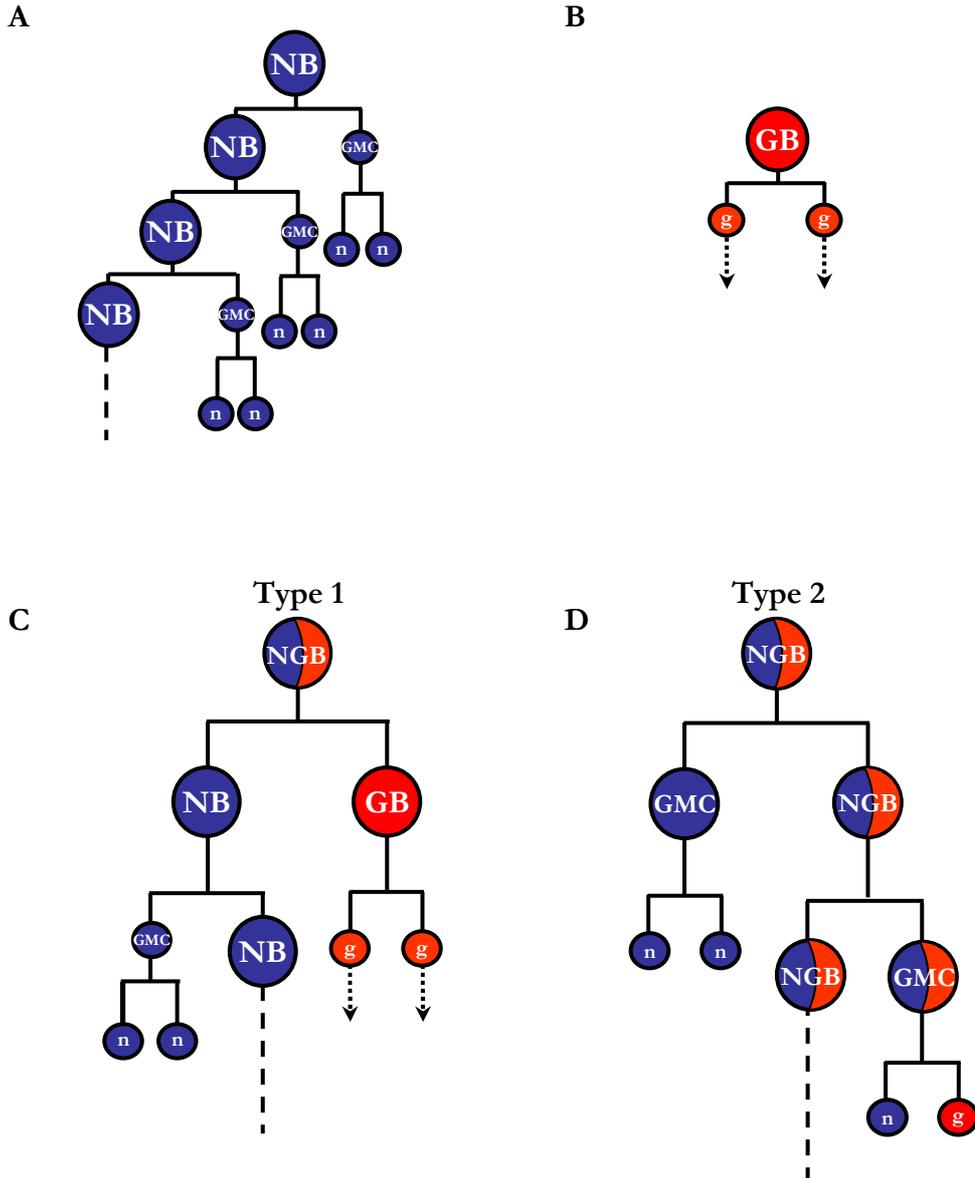
A. Le système nerveux de la drosophile

Le système nerveux est composé de deux types cellulaires : les neurones et la glie (**Figure 6**). Les neurones sont responsables de la réception et de la transmission de l'information nerveuse. Les cellules gliales sont requises dans différentes fonctions importantes au cours du développement et dans l'homéostasie du système nerveux. Elles guident les axones, procurent un support trophique et nutritif aux neurones, régulent les concentrations extracellulaires en ions et en neurotransmetteurs, et isolent électriquement les axones (pour revue voir [Parker et Auld, 2006](#)).

Le système nerveux de la drosophile est constitué de trois parties : (i) le système nerveux central (SNC) qui comprend le cerveau et la corde ventrale, (ii) le système nerveux périphérique (SNP) qui correspond au système sensoriel, et (iii) le système nerveux stomatogastrique qui ne sera pas abordé ici (pour revue voir [Hartenstein et al., 1994](#)).

B. Origine des cellules gliales et des neurones

Chez la drosophile, les précurseurs des cellules gliales et des neurones du SNC sont appelés neuroblastes. Ils sont classés en différents types selon leur descendance : les neuroblastes purs (NBs) produisent uniquement des neurones ; les glioblastes (GBs) génèrent uniquement de la glie et les neuroglioblastes (NGBs) génèrent de la glie et des neurones (**Figure 7**) ([Doe, 1992](#) ; [Broadus et al., 1995](#) ; [Bossing et al., 1996b](#) ; [Schmidt et al., 1997](#) ; [Schmid et al., 1999](#)).



D'après Van De Bor et Giangrande 2002

Figure 7. Les cellules souches neurales chez la drosophile. (A) Neuroblaste pur se divisant pour donner un autre neuroblaste (NB) et une cellule mère des ganglions (GMC). La GMC ensuite se divise une fois pour donner naissance à deux neurones (n). (B) Glioblaste pur (GB) donnant naissance à des cellules gliales (g) qui peuvent proliférer. (C) Neuroglioblaste de type 1 (NGB) donnant naissance à un NB et à un GB qui vont ensuite se diviser pour produire des neurones et des cellules gliales, respectivement. (D) NGB de type 2 qui va se diviser asymétriquement pour donner une GMC et un NGB. La GMC va donner naissance à deux neurones. Le NGB va donner naissance à un autre NGB et à une GMC qui va ensuite générer un neurone et une cellule gliale.

1. Mode de division des différents types de neuroblastes

Les neuroblastes purs (**Figure 7A**) subissent une série de divisions asymétriques, dont le nombre varie d'un neuroblaste à l'autre, pour produire un autre NB et une cellule mère des ganglions (GMC, pour Ganglion Mother Cell). La GMC va ensuite se diviser une fois pour produire deux neurones post-mitotiques ([Campos-Ortega, 1993](#) ; [Bossing et al., 1996b](#) ; [Broadus et Doe, 1997](#) ; [Schmidt et al., 1997](#) ; [Schmid et al., 1999](#)).

Les glioblastes (**Figure 7B**) se divisent de façon symétrique pour produire des cellules gliales qui peuvent ensuite proliférer.

Il existe deux types de NGBs. Le NGB de type 1 (**Figure 7C**) produit par division asymétrique un NB et un GB qui génèrent, respectivement, des neurones et des cellules gliales ([Bernardoni et al., 1999](#)). Le NGB de type 2 (**Figure 7D**) produit, suite à une division asymétrique, un autre NGB et une GMC qui va donner naissance à deux neurones. Cet autre NGB génère ensuite des GMCs mixtes donnant naissance à une cellule gliale et un neurone ([Ragone et al., 2001](#) ; [Udolph et al., 2001](#)).

2. La différenciation des neuroblastes

2.1. Chez l'embryon

L'embryon de drosophile étant segmenté, les neuroblastes de l'embryon forment un modèle invariable de 30 neuroblastes par hémisegment (hémineuromère) ([Doe, 1992](#) ; [Campos-Ortega, 1993](#) ; [Campos-Ortega, 1995](#)). L'identité de chaque NB dépend de sa position à l'intérieur du neurectoderme ([Bhat, 1999](#) ; [Skeath, 1999](#)), du moment auquel a eu lieu sa délamination ([Berger et al., 2001](#)) et de la combinaison unique de gènes qu'il exprime ([Doe, 1992](#) ; [Broadus et al., 1995](#)). Grâce à la position stéréotypée de chaque NB dans chaque neuromère et à l'utilisation

Stade 11 tardif

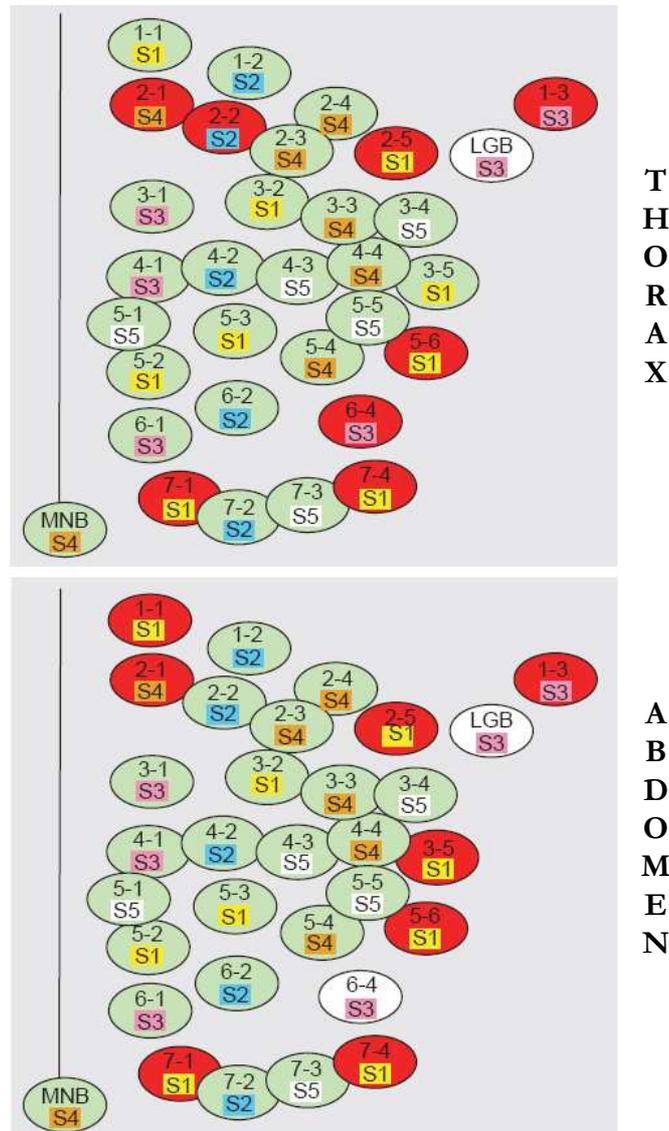


Image de Van De Bor et Giangrande 2002

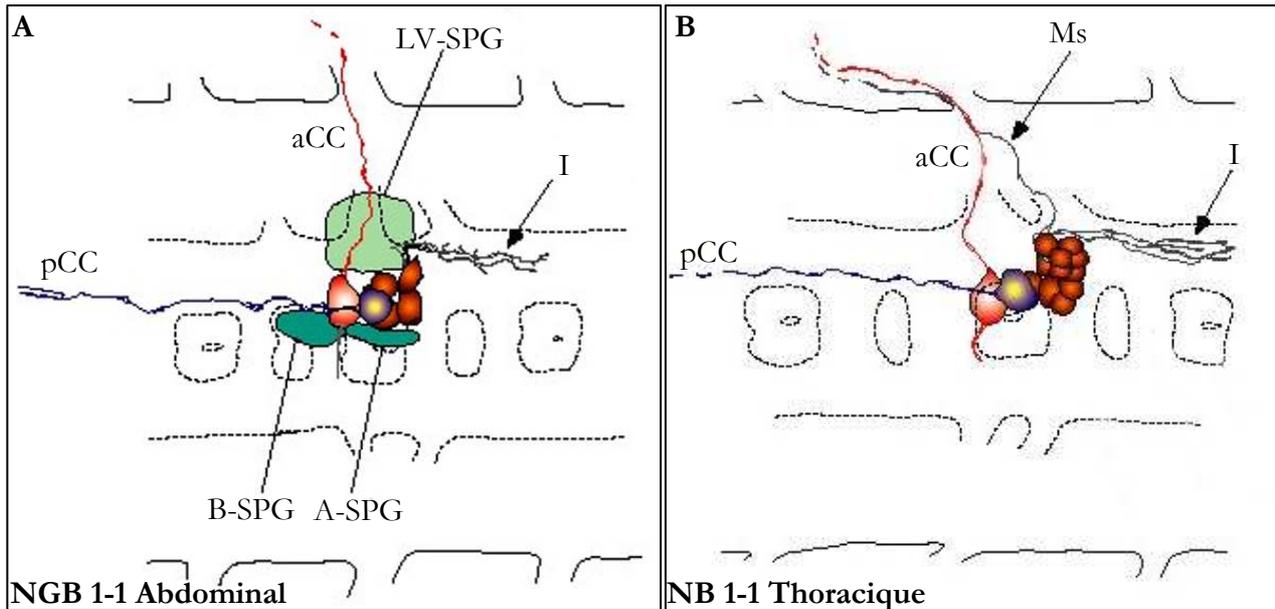
Figure 8. Lignage du système nerveux central embryonnaire. Carte des précurseurs dans les segments thoraciques et abdominaux. Le côté antérieur est en haut, la ligne médiane ventrale à gauche. Les neuroblastes, neuroglioblastes et glioblastes sont représentés respectivement en vert, rouge et blanc. La désignation numérique est basée sur la position du précurseur en fonction des axes dorsoventral et antéro-postérieur. S1 à S5 représentent les cinq vagues de délamination successives. LGB : glioblaste longitudinal, MNB : neuroblaste médian.

de traceurs de lignages, plusieurs groupes ont établi une carte précise du lignage de chaque NB de la corde ventrale au cours de l'embryogenèse (**Figure 8**) (Bossing et al., 1996b ; Schmidt et al., 1997). En effet, un NB précis va générer, de façon reproductible, un ou des sous-type(s) de neurones et/ou de glie. Le lignage de deux types de neuroblastes est montré comme exemple en **Figure 9** (page suivante).

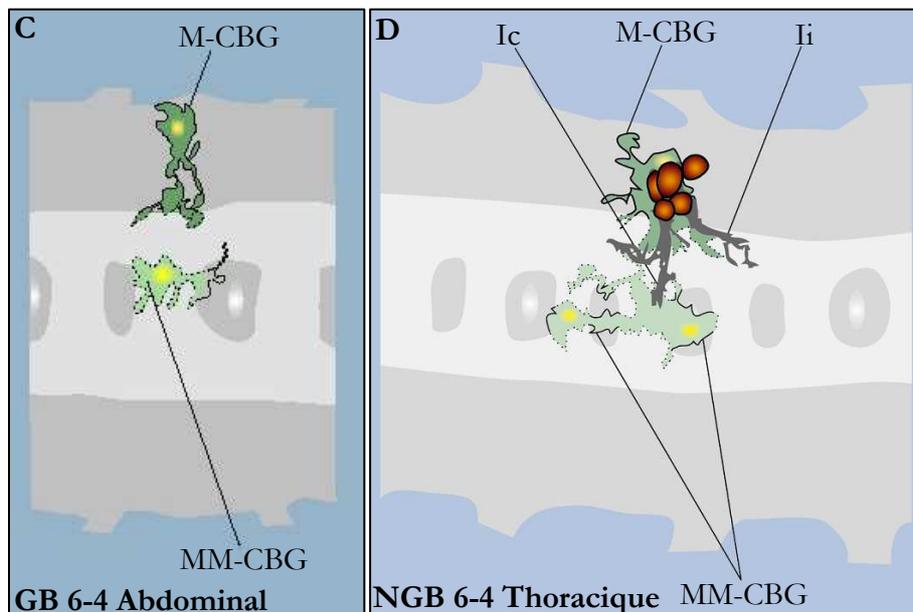
Le cerveau a été jusqu'à présent moins étudié que la corde ventrale en raison de sa complexité. Bien que les NBs du cerveau aient été identifiés, ainsi que la combinaison génétique de chacun (Younossi-Hartenstein et al., 1996 ; Urbach et Technau, 2004 ; Sprecher et al., 2007), leur lignage n'a pas encore été établi.

Le développement du SNP ressemble à celui du SNC : les précurseurs des organes sensoriels (SOPs) subissent une série de divisions asymétriques qui génèrent des types spécifiques de neurones, de glie et de cellules de support. A la différence des NBs du SNC, les SOPs ne produisent pas, en se divisant, un nouveau précurseur. Les NBs et les SOPs génèrent donc de la glie et des neurones selon un patron unique, reproductible et stéréotypé.

A la fin de l'embryogenèse, chaque neuromère embryonnaire du SNC consiste en approximativement 60 cellules gliales et 600 neurones (**Figure 6**) (Doe, 1992 ; Broadus et al., 1995 ; Campos-Ortega et Hartenstein, 1997). Le SNP contient 8-10 cellules gliales périphériques par hémineuromère abdominal qui entourent les axones moteurs et sensoriels des voies principales du SNP (Sepp et al., 2000). Certaines cellules gliales du SNP ont pour origine le SNC d'où elles ont migré pour intégrer le SNP (Takizawa et Hotta, 2001).



D'après Bossing et al. 1996



D'après Schmidt et al. 1997

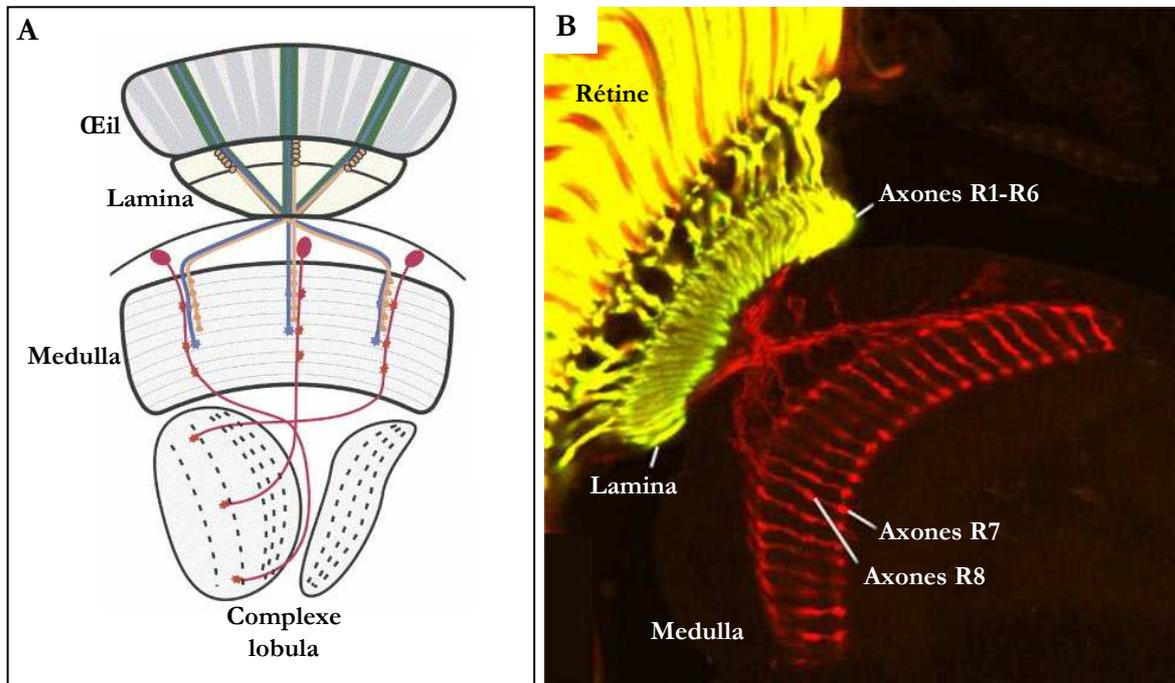
Figure 9. Schéma des lignages cellulaires dérivés des lignages 1-1 et 6-4. Le côté antérieur est à gauche. (A-D) Les NBs 1-1 et 6-4 ont une descendance différente selon s'ils sont présents dans un neuromère abdominal ou thoracique. (A) Le NB 1-1 Abdominal est un NGB qui délamine en S1 et génère des neurones aCC et pCC, de la glie subpérineuriale (SPG, latérale A- et B-SPG, latéroventrale LV-SPG) et des interneurons (I). (B) Le NB 1-1 Thoracique génère des neurones aCC et pCC, des motoneurons (Ms) et des interneurons. (C) Le NB 6-4 Abdominal est un GB qui génère de la glie associée au cortex (CBG, médiale M-CBG, plus médiale MM-CBG). (D) Le NGB 6-4 Thoracique délamine en S3 et génère de la glie CGB de type M-CBG et MM-CBG et des interneurons projetant controlatéralement (Ic) ou ipsilatéralement (Ii)

2.2. Chez la larve

Bien que le développement embryonnaire du système nerveux soit bien connu, le développement du système nerveux post-embryonnaire reste mal compris. Une raison de ceci vient du fait que de nombreuses mutations affectant le développement du système nerveux sont létales en fin d'embryogenèse, ce qui rend plus difficile l'analyse du phénotype aux stades post-embryonnaires. Néanmoins, pour pallier à ces problèmes, des outils génétiques puissants tels que le MARCM (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker), qui permet de réaliser une perte ou un gain de fonction pour un gène dans des cellules individuelles dans un organisme sauvage, ont été développés chez la drosophile (Xu et Rubin, 1993 ; Lee et Luo, 1999 ; Lee et Luo, 2001). Toutefois, jusqu'à présent, seuls les lignages de quelques neuroblastes purement neuronaux sont connus aux stades post-embryonnaires (Truman et al., 2004). Quant à eux, les lignages gliaux post-embryonnaires, à l'exception de ceux appartenant au système visuel (SNC) et des organes sensoriels (SNP), (voir sous-chapitres suivants) ne sont pas connus.

Certains neuroblastes cessent de se diviser en milieu d'embryogenèse, restent quiescents au niveau de la région neurogénique et se confondent avec les cellules environnantes jusqu'aux stades larvaires (Truman et Bate, 1988 ; Datta, 1995 ; Maurange et Gould, 2005). Ces neuroblastes réintègrent le cycle cellulaire durant la vie larvaire pour générer une importante population de neurones secondaires et de glie, c'est la deuxième phase de la neurogenèse (Truman et Bate, 1988 ; Prokop et Technau, 1991 ; Meinertzhagen et Hanson, 1993 ; Truman et al., 1993 ; Peraanu et al., 2005). Au niveau de la corde ventrale de la larve (Prokop et Technau, 1991), il a été décrit un modèle invariable de 47 neuroblastes dans chaque neuromère thoracique et 6 neuroblastes dans chaque neuromère abdominal (Truman et Bate, 1988).

Contrairement aux neurones formés pendant la phase embryonnaire, ceux produits pendant la neurogenèse larvaire ne deviennent pas immédiatement fonctionnels et restent



D'après Ting et Lee 2007

<http://www.nimr.mrc.ac.uk/molneurobiol/salecker/#figures>

Figure 10. Anatomie du système visuel adulte. (A) Schéma du système visuel adulte. (B) Coimmunomarcage mAb24B10 qui reconnaît tous les axones des photorécepteurs R1-R8 (rouge) et Rh1-lacZ, un marqueur spécifique des photorécepteurs R1-R6 de l'adulte (jaune). Le système visuel comprend la rétine et quatre ganglions : la lamina, la medulla, et les deux ganglions du complexe lobula. Les axones des photorécepteurs R1-R6 projettent dans la lamina (lignes vertes en A) et les axones des photorécepteurs R7-R8 projettent dans la medulla (lignes bleues en A) pour former des synapses avec les neurones de la lamina (orange) et de la medulla (rouge). Les neurones de la lamina forment des connections avec la medulla, et les neurones de la medulla se connectent avec la lobula.

bloqués dans un état immature post-mitotique. Une troisième phase de développement a lieu durant la métamorphose où les neurones secondaires se différencient et établissent des connections pour former le cerveau adulte (Truman, 1990 ; Truman et al., 1993).

3. Le système visuel

Le système visuel de la drosophile comprend la rétine et les ganglions optiques (lamina, medulla, et le complexe lobula) (**Figure 10**) (Meinertzhagen et Hanson, 1993). Ce système est caractérisé par des interactions étroites entre les axones des photorécepteurs et les cellules gliales des lobes optiques au cours du troisième stade larvaire (Clandinin et Zipursky, 2002 ; Chotard et Salecker, 2004 ; Chotard et Salecker, 2007 ; Ting et Lee, 2007). L'œil est composé d'environ 750 ommatidies, chacune contenant huit neurones photorécepteurs, R1 à R8, disposés de façon stéréotypée. Ces neurones innervent différentes couches dans le ganglion optique. Les neurones R1-R6 projettent dans la lamina alors que les neurones R7-R8 projettent à travers la lamina pour innervent deux couches distinctes de la medulla (**Figure 10**). Dans la lamina, les axones des photorécepteurs R1-R6 projettent selon un patron stéréotypé pour connecter les neurones de la lamina et ainsi former une unité synaptique appelée « cartouche » (Meinertzhagen et Hanson, 1993).

La mise en place de ce patron est initiée en milieu L3, au moment où les neurones des photorécepteurs envoient leur cône de croissance du disque imaginal d'œil en direction du lobe optique. Les photorécepteurs R8 se différencient les premiers et projettent leurs axones dans la medulla (**Figure 11**). A l'intérieur du disque imaginal d'œil et de la tige optique, les axones des neurones photorécepteurs entrent en contact avec la glie rétinienne basale (RBG) (Winberg et al., 1992 ; Choi et Benzer, 1994 ; Rangarajan et al., 1999) qui a pour origine un lignage glial pur situé à l'intérieur de la tige optique (entre le disque imaginal d'œil et le lobe optique) et migre en

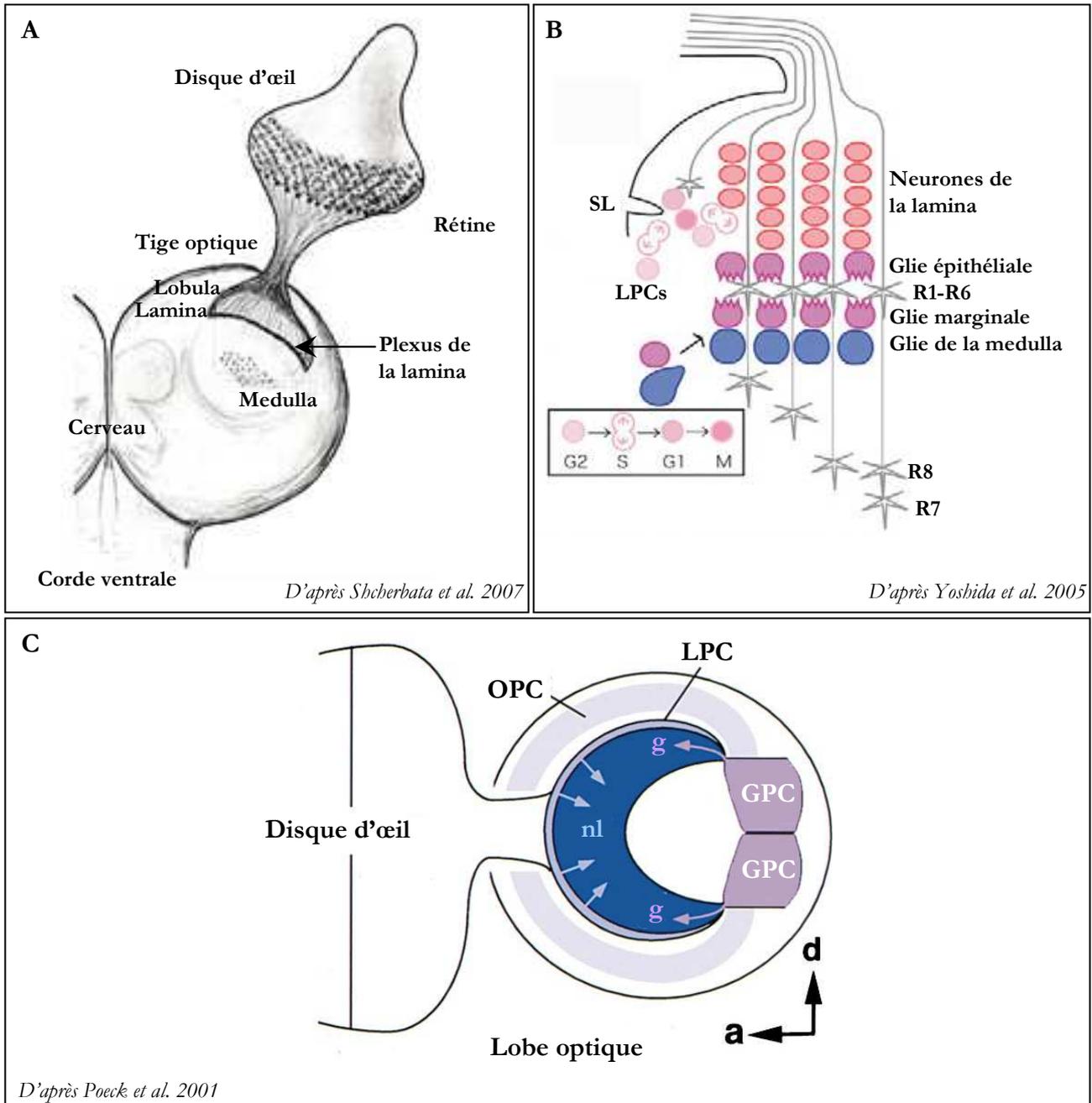
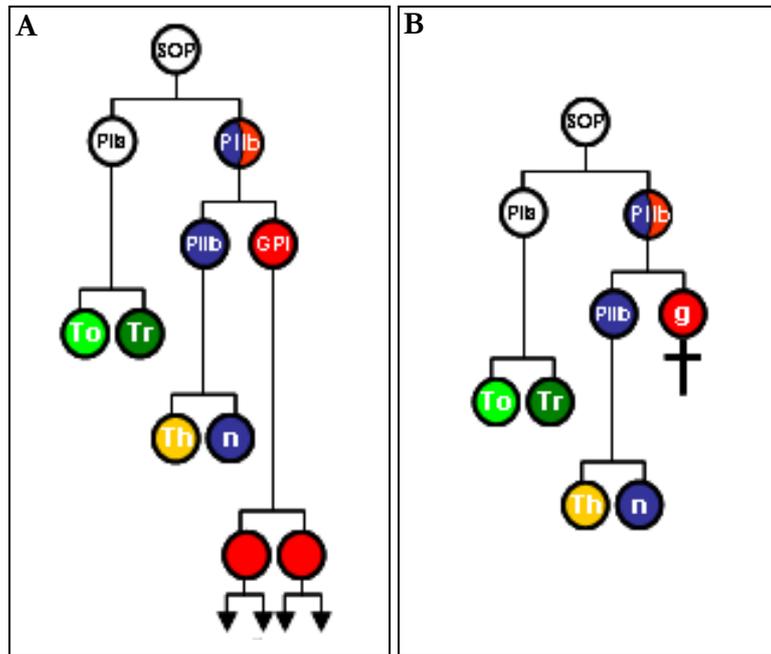


Figure 11. Anatomie du système visuel au troisième stade larvaire. (A) Schéma montrant l'organisation du système visuel en vue de dessus. (B) Schéma du système visuel d'après une perspective horizontale. Les axones des photorécepteurs R1-R6 (R1-R6) induisent la différenciation des neurones de la lamina qui proviennent des précurseurs de la lamina (LPCs) arrêtés en phase G1 au niveau du sillon de la lamina (SL). Leurs cônes de croissance s'arrêtent entre la rangée de glie épithéliale et marginale. Les axones des photorécepteurs R7 et R8 (R7, R8) se projettent dans la medulla. (C) Les neuroblastes présents dans l'épithélium prolifératif (OPC) produisent les cellules précurseurs de la lamina (LPC) qui vont à leur tour générer les neurones de la lamina (nl). Les cellules gliales (g) prennent naissance dans deux aires précurseurs (GPC) et migrent à leurs positions caractéristiques le long du plexus de la lamina. a : antérieur, d : dorsal. Vue latérale.

direction du disque imaginal d'œil (Choi et Benzer, 1994). Par la suite, les axones des photorécepteurs R1-R6 suivent les axones pionniers R8 dans le cerveau mais s'arrêtent au ganglion de la lamina (**Figure 11**), alors que les axones R7 passent la lamina et s'arrêtent dans le ganglion de la medulla (**Figure 11**). La glie de la lamina (incluant la glie marginale et épithéliale) fonctionne comme une cible intermédiaire pour les axones des photorécepteurs R1-R6. En leur absence, les axones des photorécepteurs R1-R6 projettent dans la medulla (Poeck et al., 2001 ; Suh et al., 2002). Après avoir atteint le neuropile de la lamina, les axones des photorécepteurs R1-R6 se séparent et s'étendent latéralement selon un patron stéréotypé pour innervier leur cartouches voisines (Meinertzhagen et Hanson, 1993). Les axones des photorécepteurs R7-R8, ainsi que les axones de la lamina se projettent dans des couches spécifiques de la medulla. Les neurones et les cellules gliales de la lamina dérivent de précurseurs différents. Les neurones de la lamina sont générés par des neuroblastes situés dans un épithélium prolifératif appelé OPC (Outer Proliferation Center) (**Figure 11**). Ces neuroblastes vont donner naissance aux cellules précurseur de la lamina (LPCs, pour Lamina Precursor Cells) (**Figure 11**), qui sont équivalentes aux cellules mères des ganglions et qui se divisent une fois pour générer les neurones de la lamina (Selleck et Steller, 1991 ; Perez et Steller, 1996). Les cellules gliales marginales et épithéliales proviennent de deux domaines gliogéniques superficiels ventraux et dorsaux : les aires précurseurs des cellules gliales (aires GPCs, Glial Precursor Cells) (**Figure 11**) (Huang et Kunes, 1996 ; Perez et Steller, 1996 ; Huang et Kunes, 1998 ; Dearborn et Kunes, 2004), et migrent le long des projections des photorécepteurs pour former deux rangées de cellules le long des cônes de croissance des axones des photorécepteurs R1-R6 se terminant dans le plexus de lamina (**Figure 11**) (Huang et Kunes, 1996 ; Perez et Steller, 1996 ; Huang et Kunes, 1998 ; Dearborn et Kunes, 2004).



D'après Soustelle et Giangrande 2007

Figure 12. Origine de la glie du système nerveux périphérique adulte. (A) Précurseur de l'organe sensoriel (SOP) générant les sensilles de l'aile et (B) SOP générant les microchètes du notum. Dans ces deux lignages, PIIb génère de la glie et des neurones. Cependant, les lignages de l'ailes produisent plusieurs cellules gliales qui vont proliférer, alors que les lignages des macrochètes du notum produisent une cellule gliale qui va mourir par apoptose. To : tormogène, Tr : trichogène, Th : thecogène, n : neurone, g : glie.

4. Les organes sensoriels

Un exemple typique des organes sensoriels est représenté par ceux qui dérivent des disques imaginaux. Les cellules donnant naissance aux organes sensoriels larvaires dérivent généralement d'un précurseur unique provenant d'un épithélium, qui se délamine et se divise pour générer des types spécifiques de neurones, de glie et de cellules de support. Durant le troisième stade larvaire et le stade pupal, des précurseurs d'organes sensoriels sont présents dans les disques imaginaux et vont se développer pour établir les organes sensoriels adultes : les soies mécanosensorielles, les dômes mécanosensoriels, les soies gustatives, les organes chordotonaux et les neurones multidendritiques, pour revue voir [Lai et Orgogozo, 2004](#). Ces organes sensoriels peuvent être gliogéniques ou non ([Van De Bor et al., 2000](#)).

Les sensilles campaniformes sont des organes sensoriels de type mécanorécepteur qui dérivent d'un SOP. Le SOP donne naissance à deux précurseurs multipotents (**Figure 12A**) ([Van De Bor et al., 2000](#)). Le premier, le précurseur PIIa se divise pour donner une cellule tormogène et une cellule trichogène. Le second, PIIb, se divise asymétriquement pour produire le PIIIb qui va générer un neurone et une cellule techogène, et une petite cellule sous-épithéliale qui va générer uniquement des cellules gliales. Le nombre de ces cellules gliales n'est pas fixe. PIIb correspond donc à un NGB et la cellule gliale sous-épithéliale à un glioblaste.

Le SOP générant les microchètes du notum se divise selon le même modèle que le SOP générant les sensilles de l'aile (**Figure 12B**). A une exception près, une seule cellule gliale est générée ([Gho et al., 1999](#)) et meurt par apoptose après sa naissance ([Fichelson et Gho, 2003](#)).

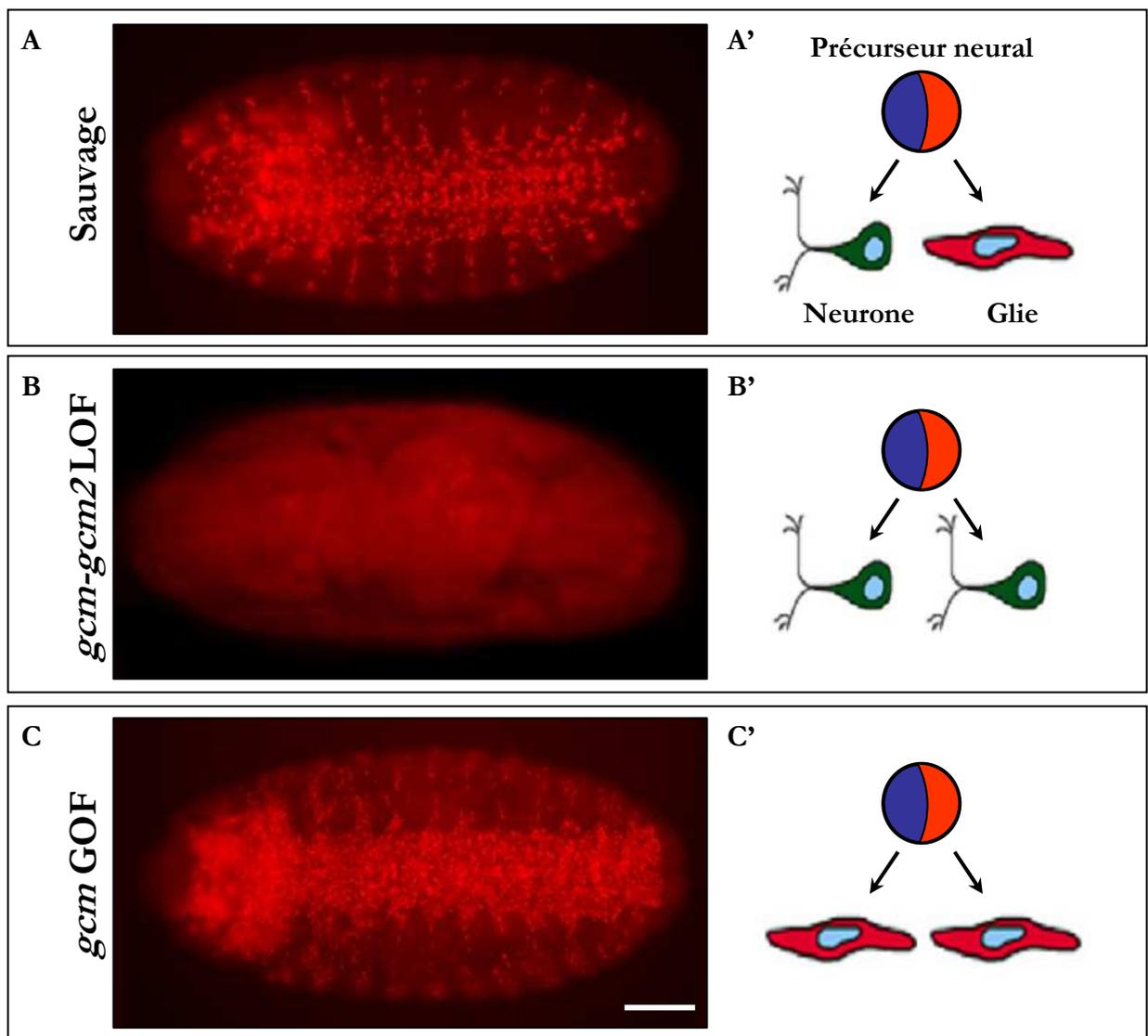


Figure 13. La détermination gliale embryonnaire. (A-C) Embryons en vue ventrale au stade 16 marqués par un immunomarquage anti-Repo. (A) Un embryon sauvage possède approximativement 60 cellules gliales par hémisegment. (B) Les embryons mutants pour *gcm* et *gcm2* (*gcm-gcm2* LOF) n'ont plus de cellules gliales, celles-ci ont été transformées en neurones. (C) L'expression ectopique de *gcm* (*gcm* GOF) dans les précurseurs neuraux induit la transformation des neurones putatifs en glie. (A'-C') Représentation schématique des phénotypes observés en (A-C), respectivement. Barre d'échelle 50 μ m.

C. La régulation du destin glial

1. Rôle de *glial cell deficient*/*glial cells missing*

Les cellules gliales de l'embryon peuvent être subdivisées en deux groupes majeurs selon leur mode moléculaire de spécification : les cellules gliales latérales qui dépendent des facteurs de transcription Gcm-Gcm2 (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996) et les cellules gliales de la ligne médiane qui requièrent l'activité du facteur de transcription Single-minded (Nambu et al., 1990 ; Nambu et al., 1991).

Dans ce chapitre, il ne sera traité que des cellules gliales latérales (qui seront appelées communément cellules gliales), les cellules gliales de la ligne médiane ayant une origine et un comportement différents, pour revue voir Hummel et al., 1997.

Chez l'embryon, *gcm* est exprimé dans tous les précurseurs gliaux (GBs et NGBs) (**Figure 5**) et agit en temps que déterminant glial. Chez les embryons *gcm*, la quasi-totalité des cellules gliales présomptives adoptent le destin neuronal (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996). Au contraire, l'expression ectopique de *gcm* dans le neurectoderme est suffisante pour induire la différenciation gliale (**Figure 13**) au dépend du destin neuronal (Hosoya et al., 1995 ; Bernardoni et al., 1998 ; Miller et al., 1998). *gcm* agit donc comme un interrupteur génétique, où les cellules exprimant *gcm* vont devenir de la glie et les cellules n'exprimant pas *gcm* vont devenir des neurones. *gcm* est donc nécessaire et suffisant pour induire le destin glial dans le neurectoderme.

De façon intéressante, les capacités gliogéniques de *gcm* ne sont pas restreintes au territoire neurectodermique. En effet, l'expression ectopique de *gcm* dans des territoires non neuraux, comme le mésoderme et l'épiderme, à un stade précoce, est capable d'induire de la différenciation gliale (Akiyama-Oda et al., 1998 ; Bernardoni et al., 1998 ; Miller et al., 1998).

Il a été mis en évidence que *gcm2* a une fonction redondante à celle de *gcm* mais qu'il joue un rôle mineur dans la différenciation gliale. En effet, l'expression ectopique de *gcm2* induit, comme *gcm*, de la glie ectopique (Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). Par contre, les embryons *gcm2* ne présentent pas de phénotype glial et les animaux sont parfaitement viables jusqu'à l'adulte (Alfonso et Jones, 2002). De plus, les embryons mutants pour *gcm* possèdent quelques cellules gliales alors que les embryons mutants pour *gcm-gcm2* en sont totalement dépourvus (**Figure 13**) (Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). *gcm* constitue donc le principal facteur de différenciation gliale chez l'embryon.

Aux stades post-embryonnaires, il a été mis en évidence que *gcm* induit la formation de glie dans le système nerveux périphérique de l'aile au niveau des sensilles campaniformes (**Figure 12A**) (Van De Bor et al., 2000). Dans ce lignage, Notch régule la différenciation gliale en réprimant *gcm* dans la cellule qui doit adopter le destin de précurseur neuronal et sa descendance (Van De Bor et al., 2000). Il a également été montré que *gcm* induit la formation de glie dans le lignage des microchètes (Fichelson et Gho, 2003).

Bien que des cellules gliales soient générées *de novo* aux stades post-embryonnaires (Pereanu et al., 2005) et que *gcm* présente un rôle gliogénique conservé au niveau du SNP, une analyse critique de la fonction de *gcm* dans le SNC post-embryonnaire n'avait toujours pas été réalisée au début de ma thèse. Cependant, il peut être supposé que *gcm* induit le destin glial (et supprime le destin neuronal) aux stades post-embryonnaires comme chez l'embryon.

2. La différenciation gliale

Gcm initie la gliogenèse à travers l'activation de gènes cibles spécifiques. Un grand nombre de gènes cibles ont été identifiés en prenant avantage de la technologie des puces à ADN

Gène	Domaine d'expression	Produit prédit
<i>aly</i>	S, T	Coactivateur transcriptionnel
<i>akap200</i>	G	Protéine ancre de la kinase A
<i>argk</i>	S	Arginine kinase
<i>axo</i>	G nd	Famille des neurexines
<i>BcDNA:LD08534</i>	G, N	dUTPase, dUTP diphosphatase
<i>BG:DS05899.3</i>	G	-
<i>Cam</i>	SNC	Protéine de liaison à la calmoduline et au calcium
<i>Caps</i>	G, N	Protéine de liaison au calcium, lipides, sécrétion de neurotransmetteurs
<i>CG10326</i>	SNC	-
<i>CG10668</i>	S	Protéine de liaison à l'ARN
<i>CG11045</i>	G nd	Transporteur de nucléosides
<i>CG11100</i>	G	-
<i>CG11164</i>	SNC	-
<i>CG11652</i>	SNC	-
<i>CG11902</i>	G, T	Facteur de transcription de type C ₂ H ₂
<i>CG11910</i>	G	Récepteur couplé à une protéine G
<i>CG12139</i>	SNC	Récepteur LDL
<i>CG12910</i>	G	Protéine de liaison des lipides et du calcium
<i>CG15141</i>	G, N	Protéine de liaison à l'ADN, ligase à l'ubiquitine
<i>CG1677</i>	SNC	Facteur de transcription de type CCCH
<i>CG16971</i>	G	-
<i>CG18318</i>	G	-
<i>CG1962</i>	G, N	-
<i>CG2051</i>	SNC	Histone acétyltransférase
<i>CG2310</i>	S, T	-
<i>CG2893</i>	G	Transporteur de cations
<i>CG3168</i>	G	Transporteur de carbohydrate, métabolisme de l'ADN
<i>CG3408</i>	SNC	-
<i>CG3426</i>	G nd	Protéine de liaison à la chitine
<i>CG3702</i>	G nd	-
<i>CG4266</i>	SNC	Protéine de liaison à l'ARN
<i>CG4322</i>	G	Protéine couplée aux protéines G
<i>CG4389</i>	G nd	Hydratase enoyl-CoA
<i>CG4844</i>	G	-
<i>CG4936</i>	G, N	Facteur de transcription de type C ₂ H ₂
<i>CG5080</i>	G, N	-
<i>CG5453</i>	S, T	-
<i>CG5822</i>	G	-
<i>CG6218</i>	G	Kinase n-acétylglucosamine
<i>CG6418</i>	G, N	Hélicase, métabolisme des acides nucléiques
<i>CG6783</i>	S, T	Protéine de liaison des acides gras
<i>CG7117</i>	S, T	Déshydrogénase/réductase
<i>CG7433</i>	G	Transaminase
<i>CG8054</i>	G	Transporteur
<i>CG8776</i>	G nd	Monooxygénase
<i>CG8965</i>	G, N	-
<i>CG9336</i>	G	-
<i>CG9338</i>	G	-
<i>CG9977</i>	S, T	Adenosylhomocystéinase
<i>cip4</i>	G	Interacteur de Rho
<i>cp1</i>	G	Cystéine protéinase
<i>cro1</i>	SNC	Facteur de transcription de type C ₂ H ₂
<i>csw</i>	SNC	Tyrosine phosphatase
<i>DAT</i>	S	Transporteur de la dopamine
<i>dll</i>	S	Facteur de transcription à homéodomaine
<i>draper</i>	G	Protéine transmembranaire
<i>dri</i>	S	Facteur de transcription de type ARID
<i>dup</i>	G, N	Protéine de liaison à l'ADN
<i>dE.AAT1</i>	S, T	Transporteur du glutamate

et du séquençage complet du génome de la drosophile (**Tableau 1**) (Egger et al., 2002 ; Freeman et al., 2003 ; Altenhein et al., 2006). Les niveaux d'expression des gènes chez des embryons sauvages, chez des embryons surexprimant *gcm*, c'est-à-dire où les neurones présomptifs ont été transformés en glie, ou chez des embryons mutants pour *gcm*, c'est-à-dire sans glie, ont été comparés afin d'identifier les gènes cibles de *gcm*. Une étude a également combiné cette approche de puces à ADN à une approche bioinformatique basée sur la recherche des sites de liaison à l'ADN de Gcm (GBS) dans le génome, permettant ainsi l'identification des cibles directes de Gcm, et de surcroît de manière tissu indépendant (Freeman et al., 2003). Un point remarquable est que les gènes cibles identifiés au cours de ces trois cribles ne se recouvrent que légèrement, montrant ainsi la variabilité de cette approche et la nécessité d'une validation *in vivo*.

Parmi les gènes identifiés, il a été mis en évidence des gènes exprimés uniquement dans les cellules gliales ou dans un sous-type de glie ainsi que des gènes exprimés également dans d'autres tissus dépendants de *gcm* (voir chapitres III et IV de l'INTRODUCTION). Certains candidats obtenus dans ces cribles ont été validés par vérification de leur profil d'expression sur des embryons sauvages, et par des expériences de gain ou perte de fonction pour *gcm*. Comme attendu, les gènes exprimés spécifiquement dans la glie ne sont pas exprimés chez les embryons *gcm*, alors que, de façon intéressante, certains gènes exprimés dans des sous-types gliaux spécifiques ne montrent pas d'expression ectopique lorsque *gcm* est exprimé ectopiquement. De même, pour certains gènes (e.g. *CG11910*), l'expression ectopique de *gcm* induit leur expression ectopique que dans un sous-type de glie. Ceci suggère que ces gènes nécessitent la présence de cofacteurs spatiaux, temporels ou gliaux spécifiques, en addition de Gcm, afin d'être exprimés (Altenhein et al., 2006).

Les gènes cibles identifiés codent pour différents types de protéines, tels des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des protéines de modification post-traductionnelles,

Gène	Domaine d'expression	Produit prédit
<i>dEAAAT2</i>	S, T	Transporteur du glutamate
<i>EG:22E5.11</i>	G	Récepteur couplé à une protéine G
<i>Flo</i>	SNC	Molécule structurale
<i>Fpps</i>	G	Transférase, métabolisme du cholestérol
<i>gcm</i>		
<i>Gdi</i>	SNC	Inhibiteur de la dissociation RAB GDP
<i>GH03502</i>	G	-
<i>glu</i>	SNC	Chromatine assemblage/désassemblage
<i>GS2</i>	S, T	Glutamine synthétase
<i>htl</i>	G	Récepteur au FGF
<i>insv</i>	SNC	-
<i>Jhl-21</i>	G nd	Transporteur d'acides aminés
<i>lac</i>	S, T	Immunoglobuline MHC
<i>loco</i>	G	Régulateur des protéines G
<i>Map60</i>	G, N	Protéine de liaison aux microtubules
<i>Mdr65</i>	S, T	Transporteur ABC
<i>nerfin-1</i>	G, N	Facteur de transcription de type C ₂ H ₂
<i>nrg</i>	G	Immunoglobuline-fribonectine
<i>nrv1</i>	T	ATPase Na/K
<i>nrv2</i>	G	ATPase Na/K
<i>pain</i>	G	Canal calcique
<i>Pink1</i>	SNC	Sérine thréonine kinase
<i>pnt</i>	G	Facteur de transcription de type Ets
<i>pnut</i>	SNC	Constituant du cytosquelette
<i>Ptp10D</i>	G, N	Tyrosine phosphatase
<i>rac2</i>	G nd	Rho GTPase
<i>Reg-3</i>	G	Transporteur d'électrons, métabolisme de la pyrimidine
<i>repo</i>	G	Facteur de transcription à homéodomaine
<i>RpII140</i>	SNC	Sous unité de l'ARN polymérase
<i>sap-r</i>	G	Activateur de sphingolipides
<i>smid</i>	SNC	Protéine de liaison à l'ATP
<i>Spn</i>	G	Protéine de liaison à la phosphatase 1
<i>tap</i>	G, N	Facteur de transcription de type bHLH
<i>ttk</i>	G	Facteur de transcription de type BTB
<i>unc5</i>	S, T	Récepteur à la nétrine
<i>Uba2</i>	SNC	Enzyme activant l'ubiquitine
<i>UbcD2</i>	SNC	Enzyme de conjugaison à l'ubiquitine

(Adapté de Freeman et al. 2003 et Altenhein et al. 2006)

Tableau 1 : Gènes gliaux régulés par Gcm. Ce tableau est une compilation des cibles de Gcm exprimées dans la glie et identifiées lors des cribles des Dr Freeman (Freeman et al., 2003) et Dr Altenhein (Altenhein et al., 2006). Le nom du gène est indiqué, ainsi que son domaine d'expression et sa fonction. SNC : exprimé dans tout le système nerveux central, G : exprimé dans toute la glie, S : exprimé dans un sous-type glial, T : expression temporaire, Gnd : exprimé dans la glie mais sous-type non défini, N : exprimé dans des neurones isolés. Il peut être noté que *gcm* a été identifié comme étant sa propre cible. En effet, il a préalablement été démontré que *gcm* s'autoactive dans le SNC (Miller et al., 1998).

des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, des molécules structurales, des protéines impliquées dans la liaison ou dans le métabolisme des acides nucléiques, des protéines de transport, des enzymes et d'autres familles protéiques moins représentées ou inconnues (**Tableau 1**). Par exemple, Draper est une protéine transmembranaire qui est exprimée dans la glie et dans les plasmotocytes et qui est impliquée dans la phagocytose des neurones apoptotiques du SNC à la fin de l'embryogenèse (Freeman et al., 2003).

Les gènes pangliaux sont susceptibles d'être principalement impliqués dans la fonction gliale ou dans la détermination du destin glial et la répression du destin neuronal. Par exemple, le gène cible de Gcm le plus connu, *reverse polarity* (*repo*, également connu sous le nom de *rk2*) est une cible directe de Gcm et contient onze GBS dans son promoteur (Akiyama et al., 1996). De façon intéressante, ce gène n'a pas été mis en évidence lors de la recherche des cibles de *gcm* à l'aide des puces à ADN. En effet, le Dr Altenhein et ses collaborateurs (Altenhein et al., 2006) ont remarqué que dans leurs expériences de puces à ADN, *repo* est exprimé avant le début de l'expression de *gcm* dans le SNC et de surcroît a un niveau constant quelques soient les conditions génétiques, c'est-à-dire chez les embryons perte ou gain de fonction pour *gcm* versus embryons sauvages, suggérant ainsi une cross hybridation avec un autre ADNc, ce qui est un des problèmes essentiels rencontrés avec les puces à ADN. *repo* code pour un facteur de transcription à homéodomaine exprimé à tous les stades du développement (Campbell et al., 1994 ; Xiong et al., 1994 ; Halter et al., 1995). L'expression de *repo* suit celle de *gcm*. En accord avec son expression, la perte de fonction de *repo* n'affecte pas la détermination gliale mais la différenciation terminale de la glie. De plus, les embryons *repo* n'expriment pas les marqueurs gliaux tardifs (Campbell et al., 1994 ; Xiong et al., 1994 ; Halter et al., 1995).

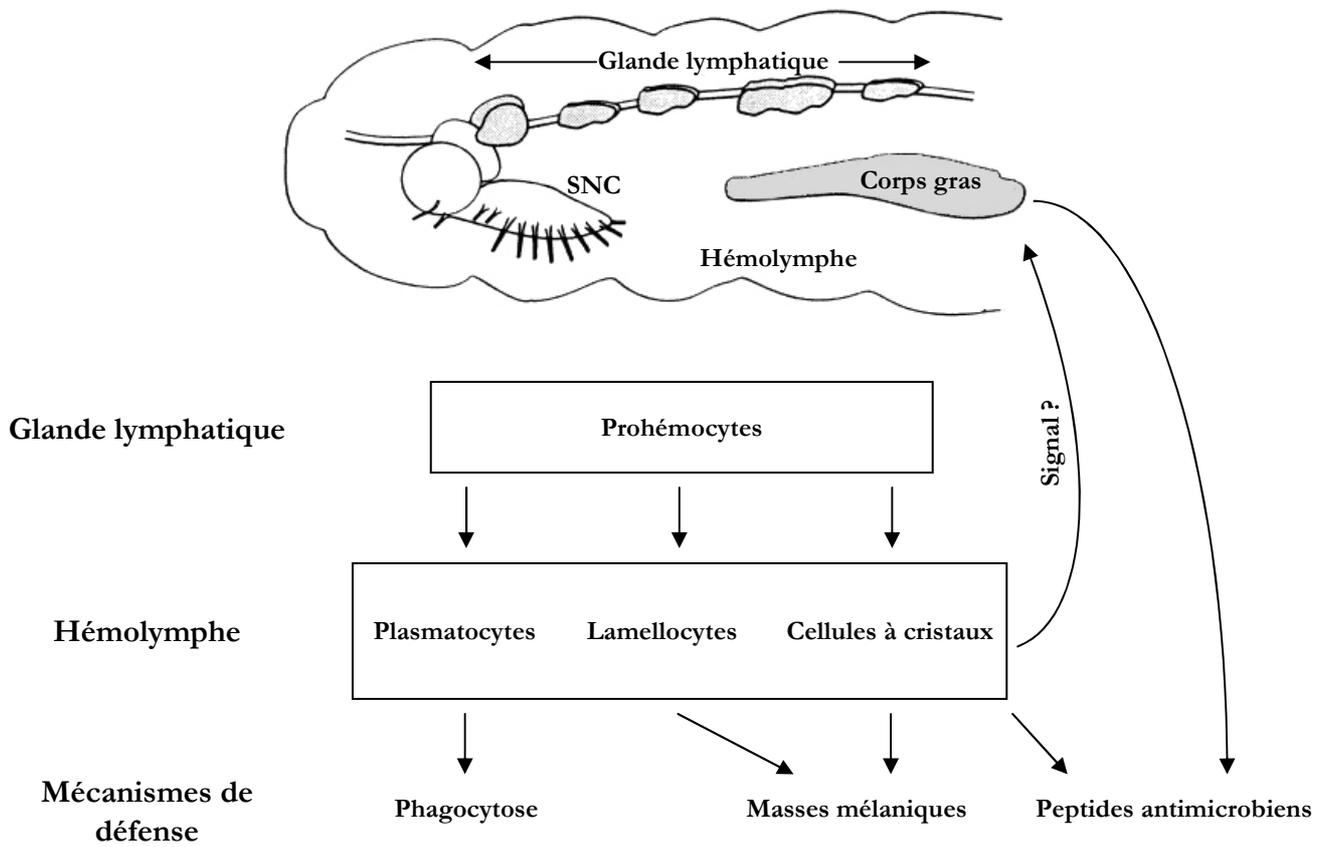
Gcm induit également l'expression de l'isoforme PointedP1 du facteur de transcription de type Ets codé par le gène *pointed* (*pnt*) (Klambt, 1993 ; Klaes et al., 1994), et de l'isoforme Tramtrack69 du facteur de transcription à doigts de zinc de type BTB (Bric-à-brac Tramtrack

Broad) codé par le gène *tramtrack* (*ttk*) (Giesen et al., 1997). La perte de fonction de ces gènes n'affectent pas l'initiation de la détermination gliale mais entraînent, comme *repo*, des défauts de différenciation terminale de la glie. PointedP1 induit différents aspects de la différenciation gliale et est suffisant pour induire l'expression de marqueurs gliaux tardifs (Klaes et al., 1994). Quant à lui, Ttk69 réprime la différenciation neuronale. En effet, les cellules gliales des embryons *ttk* expriment ectopiquement des marqueurs neuronaux (Giesen et al., 1997). De plus, Ttk69 inhibe l'expression des gènes pan-neuraux bHLH *asense* et *deadpan* qui favorisent le potentiel neuronal des précurseurs neuronaux (Badenhorst, 2001).

Une coopération entre Repo et Ttk69 a également été mise en évidence dans l'inhibition de la différenciation neuronale, renforçant par là même le destin glial (Yuasa et al., 2003). En effet, l'expression ectopique de *repo* dans le territoire neural est capable d'induire l'expression du marqueur glial M84 (Klambt et Goodman, 1991), alors que l'expression ectopique de *ttk69* dans ce même territoire n'a pas d'effet sur l'expression de ce marqueur (Yuasa et al., 2003). Par contre, la coexpression de *repo* et de *ttk69* dans le territoire neural entraîne une expression ectopique trois fois plus forte de ce marqueur que celle induite par *repo* seul (Yuasa et al., 2003). Repo coopère donc avec Ttk69 pour induire l'expression de ce marqueur glial. De même, l'expression ectopique de *repo* ou de *ttk69* dans le territoire neural induit une petite réduction du nombre de cellules Elav (marqueur pan-neuronal), alors que la coexpression de *repo* et *ttk69* bloque sévèrement la différenciation neuronale (Yuasa et al., 2003). Repo et Ttk69 coopèrent donc également pour bloquer la différenciation neuronale.

Tous ces résultats soutiennent le modèle où *gcm* induit les caractéristiques gliales en induisant l'expression de gènes activant la différenciation gliale et de gènes réprimant la différenciation neuronale.

Les gènes gliaux identifiés lors des ces cribles fournissent donc une base importante pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans divers aspects du développement glial dont la spécification, ainsi que leur fonction comme c'est le cas avec Draper (voir ci-dessus), et mettent en évidence le rôle crucial de cofacteurs cellules spécifiques.



Adapté de Mathey-Prevot et Perrimon 1998

Figure 14. Interconnexions entre le système immunitaire humoral et cellulaire chez la larve de drosophile. Voir texte pour détails.

III.L'HEMATOPOIESE CHEZ LA DROSOPHILE

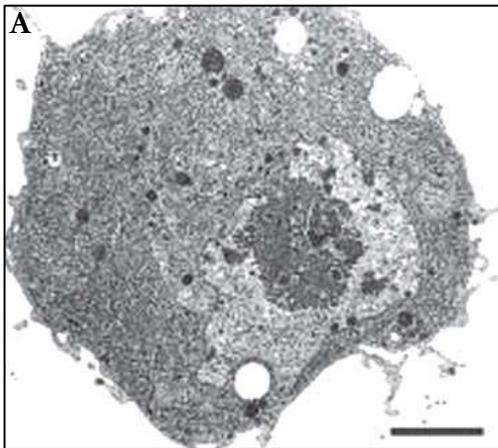
A. Les hémocytes et leurs fonctions au cours du développement et dans la réponse immunitaire cellulaire

Le système immunitaire de la drosophile ne procure qu'une immunité dite innée, par opposition à l'immunité adaptative des vertébrés comportant la production de récepteurs spécifiques dont la diversité résulte de réarrangements somatiques géniques. Ce système est toutefois remarquable d'efficacité et présente deux facettes : une facette humorale et une facette cellulaire.

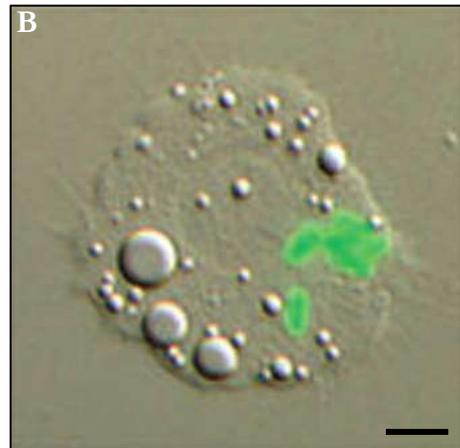
La réponse humorale est assurée par le corps gras (qui a un rôle équivalent à celui joué par le foie chez les vertébrés) qui est la principale source de peptides antimicrobiens et antifongiques (Tzou et al., 2002 ; Agaisse et al., 2003 ; Hetru et al., 2003), pour revues voir [Leclerc et Reichhart, 2004](#) ; [Cherry et Silverman, 2006](#) ; [Lemaitre et Hoffmann, 2007](#). La réponse cellulaire est assurée par les hémocytes et implique des processus de phagocytose, de mélanisation et d'encapsulation. La cuticule et les épithéliums constituent une barrière physique contre l'entrée des microorganismes dans l'hémocoel. En cas de blessure, ceux-ci vont rentrer dans l'organisme et vont être confrontés à une action combinée des processus humoraux et cellulaires. En effet, il existe une connexion entre ces deux systèmes car les hémocytes agissent en tant que sentinelles en surveillant l'environnement contre l'attaque de pathogènes et signalant leur présence au corps gras (**Figure 14**).

1. Les prohémocytes

Les prohémocytes, hémocytes non différenciés (précurseurs), sont des petites cellules de 4-6 μm avec un cytoplasme réduit mais contenant de nombreux ribosomes et des gouttelettes



D'après Meister et Lagueux 2003



D'après Lemaitre et Hoffmann 2007

Figure 15. Plasmatocyte. (A) Plasmatocyte observé en microscopie électronique à transmission (MET). (B) Plasmatocyte observé en microscopie à contraste de phase ayant phagocyté des bactéries exprimant la GFP. Barres d'échelle 2 μm .

lipidiques (Tepass et al., 1994 ; Lanot et al., 2001). Les prohémoctes sont présents lors de l'embryogenèse au niveau du primordium des hémocytes de l'embryon au niveau du mésoderme pro encéphalique ; et ils sont également présents durant la vie larvaire au niveau de la zone médullaire de la glande lymphatique (voir INTRODUCTION p39). Il n'existe pas de marqueur de prohémoctes.

2. Les plasmatoctes et la phagocytose

Les plasmatoctes sont des cellules de 8-10 μm contenant de nombreux lysosomes, phagosomes et corps de résorption témoignant d'une activité de phagocytose intense (**Figure 15**). Ils constituent la population principale des hémocytes chez l'embryon et la larve (95 % de la population hémocytaire) et c'est le seul type hémocytaire présent chez l'adulte (Holz et al., 2003).

Les marqueurs des plasmatoctes sont la Peroxidasine (marqueur précoce) (Nelson et al., 1994 ; Tepass et al., 1994), Croquemort (récepteur des macrophages, marqueur tardif) (Franc et al., 1996) et le marqueur P1 (marqueur tardif spécifique du stade larvaire) (Asha et al., 2003).

Les plasmatoctes matures correspondent aux macrophages/monocytes des mammifères. Ils ont pour fonction majeure la phagocytose des corps apoptotiques et histolysés formés au cours du développement (Franc et al., 1996 ; Franc et al., 1999 ; Sears et al., 2003). Dans le SNC, ils participent avec les cellules gliales à la phagocytose des neurones apoptotiques formés à la fin de l'embryogenèse (voir INTRODUCTION p29). Cette fonction de phagocytose est très importante car elle participe au remodelage des tissus. Les plasmatoctes sont également responsables de la production et de la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire entourant les organes, tels que la Peroxidasine, la Tigrin, le Collagène... (Fessler et al., 1994). De façon intéressante, au niveau du système nerveux, les plasmatoctes sont nécessaires à la condensation de la corde ventrale de l'embryon. Lorsque la migration des plasmatoctes est bloquée, ceux-ci ne peuvent pas déposer de Collagène IV, ni de Viking ni de Peroxidasine autour

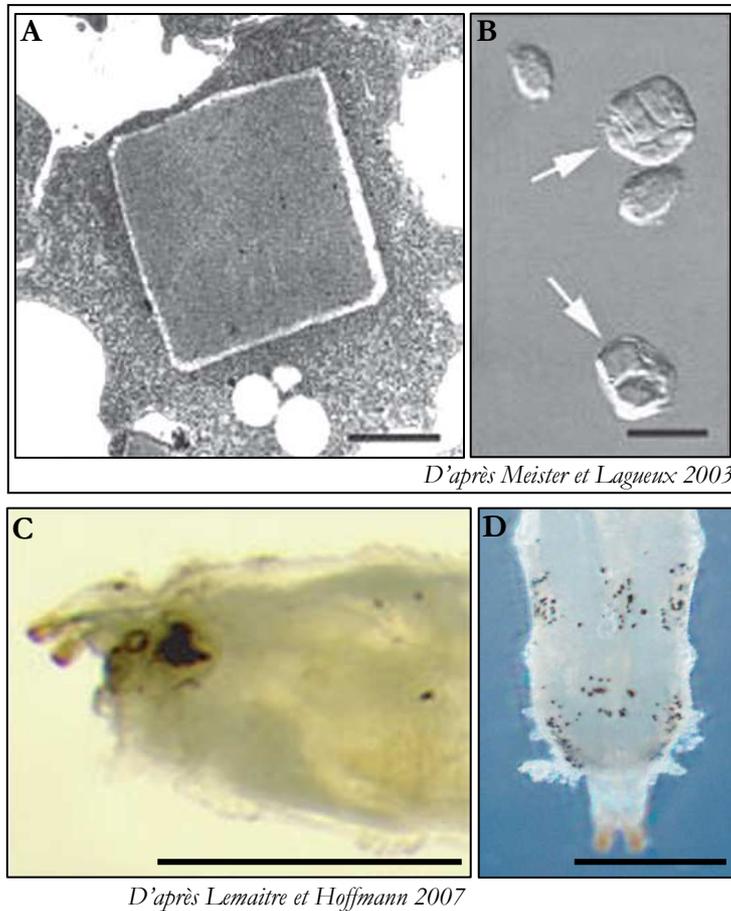


Figure 16. Cellule à cristaux. (A,B) Cellule à cristaux observé en MET (A) et en microscopie à contraste de phase (B, flèche). Ces cellules présentent des inclusions cristallines de prophénoloxydase caractéristiques. (C) Mélanisation par les cellules à cristaux d'une lésion cuticulaire d'une larve L3. (D) Afin de visualiser les cellules à cristaux *in vivo* dans la région postérieure d'une larve L3, un traitement à la chaleur de 10 minutes à 65°C a été réalisé. Celui-ci provoque le noircissement spécifique des cellules à cristaux qui sont alors visibles à travers la cuticule. Barres d'échelle en A : 2 μm , B 10 μm , C,D : 500 μm .

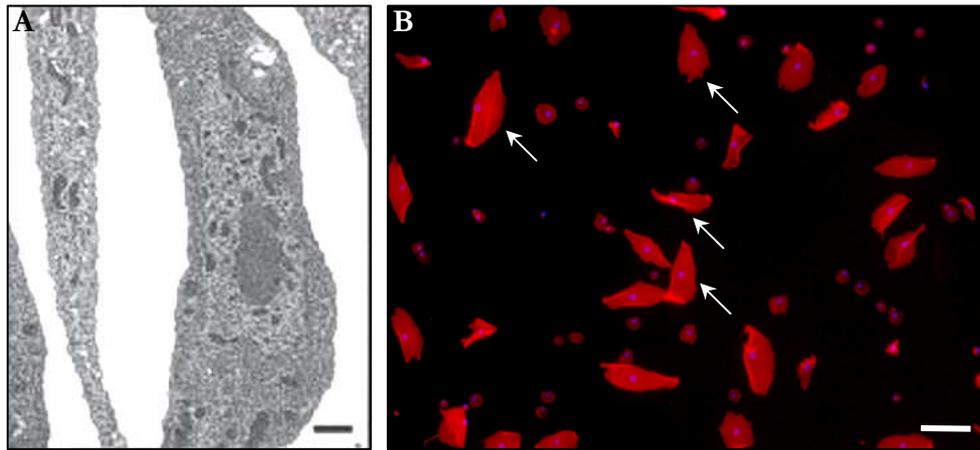
de la corde ventrale et la condensation n'a pas lieu (Olofsson et Page, 2005). D'un point de vue immunitaire, les plasmatoctes sont responsables de la phagocytose des champignons parasites et des bactéries invasives (**Figure 15**), et, lors d'une infection, ils sécrètent également des peptides antimicrobiens (Fessler et al., 1994 ; Dimarcq et al., 1997) et signalent l'infection au corps gras qui va à son tour libérer des peptides antimicrobiens (Agaisse et al., 2003).

3. Les cellules à cristaux et la mélanisation

Les cellules à cristaux sont des cellules de 10-12 µm de diamètre contenant des inclusions paracrystallines de prophénoloxydases (Pro-PO) (Shrestha et Gateff, 1982 ; Rizki et Rizki, 1984b), zymogènes libérés dans l'hémolymphe qui seront clivés par une cascade protéolytique lors de la mélanisation (**Figure 16**). Les cellules à cristaux constituent la seconde population d'hémocytes chez l'embryon et la larve, et disparaissent au début de la métamorphose.

Les marqueurs des cellules à cristaux sont Lozenge, la monophénol mono-oxygénase DoxA3 (marqueur précoce) (Warren et Rothenberg, 2003) et Pro-PO (marqueur des cellules à cristaux matures).

La fonction de ces cellules durant l'embryogenèse est à ce jour inconnue. Durant la vie larvaire, les cellules à cristaux sont responsables d'une réponse immunitaire spécifique des insectes : la mélanisation. La mélanisation correspond à la production de mélanine qui contribue aux mécanismes de défense de l'organisme (Ashida et Brey, 1995 ; Soderhall et Cerenius, 1998). En effet, elle intervient dans le processus de cicatrisation où un dépôt de mélanine est formé à l'emplacement de la blessure (**Figure 16C**) (Lai-Fook, 1966), et au cours des réactions d'encapsulation en cas de parasitisme (**Figure 18**) (voir paragraphe 5) (De Gregorio et al., 2002 ; Ligoxygakis et al., 2002).



D'après Meister et Laquaux 2003

Figure 17. Lamellocytes. (A) Lamellocytes dans la glande lymphatique observés en MET. (B) Co-immunomarquage Phalloïdine (rouge) et DAPI (bleu) sur hémocytes de larves L3 parasitées en L2 par *Leptopilina bouvardi* présentant un grand nombre de lamellocytes (flèches). Les autres petites cellules rondes correspondent aux plasmatocytes. Barres d'échelle en A : 2 μm , B 20 μm .

4. Les lamellocytes

Les lamellocytes sont des cellules de grande taille, 15-50 μm , de forme aplatie et adhérentes. Ces cellules ont un cytoplasme renfermant peu d'organites à l'exception de nombreux ribosomes (**Figure 17A**) (Lanot et al., 2001).

Les marqueurs des lamellocytes sont L1 (Asha et al., 2003) et *misshappen-lacZ* (Braun et al., 1997).

Ces cellules sont absentes chez l'embryon et chez l'adulte, et elles sont très rarement observées dans l'hémolymphe des larves saines. En effet, les lamellocytes ne se différencient qu'en cas de parasitisme par de gros pathogènes ou endoparasites tels que les œufs d'hyménoptères qui ne peuvent pas être phagocytés par les plasmatoctes (**Figure 17B**) (voir paragraphe 5) (Lanot et al., 2001 ; Meister et Lagueux, 2003).

Les lamellocytes et les plasmatoctes sont deux types d'hémocytes distincts avec des origines différentes. Cependant, il avait longtemps été admis que les lamellocytes étaient des plasmatoctes à une étape ultérieure de différenciation (Rizki et Rizki, 1984a ; Luo et al., 2002). Un état intermédiaire entre les plasmatoctes et les lamellocytes avait également été décrit, il s'agit des podocytes. Les podocytes sont en fait des plasmatoctes qui, sous l'effet de l'hormone de mue ecdysone, subissent des modifications structurales et fonctionnelles au cours de la métamorphose pour devenir des macrophages pupaux (Lanot et al., 2001 ; Sorrentino et al., 2002).

5. L'encapsulation des parasites

Dans la nature, les drosophiles sont confrontées au parasitisme. La réaction immunitaire d'encapsulation mise en œuvre pour lutter contre ces parasites fait intervenir les plasmatoctes,

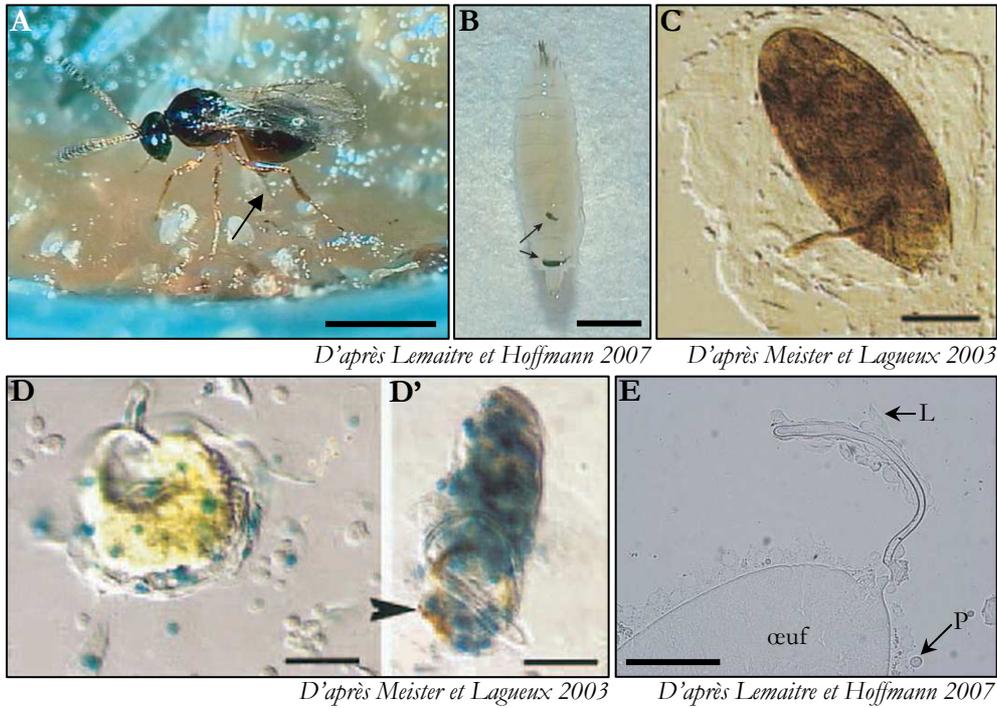


Figure 18. L'encapsulation des parasites. (A) Femelle *Leptopilina boulardi* sondant le milieu à l'aide de son ovipositeur (flèche) afin de rechercher son hôte (larve L2). (B) Larve sauvage parasitée par *Leptopilina boulardi*. Les capsules mélaniques (flèches) formées autour de l'œuf parasite correspondent à une structure inerte visible à travers la cuticule. (C) Œuf complètement mélanisé à l'intérieur d'une capsule de lamellocytes. (D,D') Encapsulation des œufs de guêpe. Un œuf de guêpe est entouré par les lamellocytes (qui expriment ici la β -Galactosidase visualisés par coloration X-Gal) (noyaux bleus dans D, D') ; la couche de cellules devient plus épaisse et la mélanisation du parasite démarre (pointe de flèche en D'). (E) Plasmotocytes (P) et lamellocytes (L) encapsulant un œuf de guêpe. Barres d'échelle en A,B : 1 mm ; C-E : 20 μ m

les cellules à cristaux ainsi que les lamellocytes. En effet, les hyménoptères parasites, dont *Leptopilina bouvardi* (**Figure 18A**), ont un cycle de développement qui dépend du passage par un hôte intermédiaire, comme la drosophile. Les guêpes femelles pondent directement dans l'hémocoèle des larves. Les œufs parasites vont progressivement se développer au détriment de l'organisme hôte. Ce parasitisme induit une prolifération et une différenciation des lamellocytes pour permettre l'encapsulation de l'œuf (**Figure 18**) (Lanot et al., 2001). La formation de la capsule dépend dans un premier temps de la reconnaissance des parasites par les plasmatoctes circulants. Les plasmatoctes, qui ont un rôle de sentinelle immunitaire, vont former une première couche d'hémocytes entourant le parasite (Russo et al., 1996). Après la reconnaissance du parasite par les plasmatoctes, une différenciation massive des lamellocytes (Lanot et al., 2001) et des cellules à cristaux (Sorrentino et al., 2002) peut être observée. Il a été proposé par le Dr Lanot et ses collaborateurs (Lanot et al., 2001), que lorsque les plasmatoctes rencontrent un parasite trop gros pour être phagocyté, ils sécrètent un signal de type cytokine ou facteur de croissance, qui déclencherait l'induction des lamellocytes. Les lamellocytes vont ensuite s'accumuler rapidement dans l'hémolymphe et former une capsule multicellulaire autour du parasite afin de l'isoler du reste de l'organisme. La capsule va être ensuite mélanisée par les cellules à cristaux (**Figure 18**) (Meister et Lagueux, 2003) entraînant la mort du pathogène par asphyxie ou sous l'action des molécules réactives produites au cours de la réaction de mélanisation comme les dérivés quinones, les espèces réactives de l'oxygène et les dérivés du NO (Nappi et al., 1995 ; Nappi et Vass, 1998 ; Nappi et al., 2000).

B. Les différentes origines des hémocytes

L'hématopoïèse chez la drosophile se déroule en deux phases : une première phase embryonnaire où les hémocytes vont prendre naissance dans le mésoderme pro encéphalique (Holz et al., 2003), c'est la vague primitive qui va donner naissance aux hémocytes matures

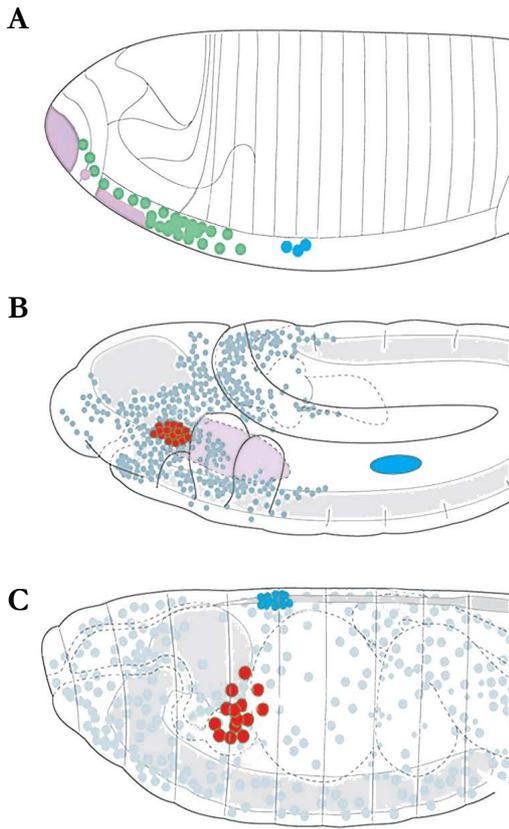
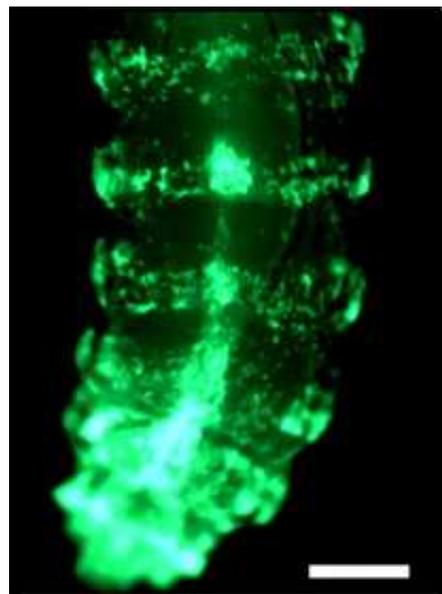


Figure 19. Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire. (A) Embryon au stade 5. Le mésoderme antérieur est coloré en mauve, les prohémyocytes en vert et les précurseurs de la glande lymphatique en bleu. (B) Embryon au stade 11. Les précurseurs des cellules à cristaux, en rouges, apparaissent au niveau du futur proventricule de l'intestin antérieur alors que les plasmatocytes commencent leur migration. Les précurseurs de la glande lymphatique commencent à migrer dorsalement. (C) Embryon au stade 17. Les cellules à cristaux sont groupées autour du proventricule de l'intestin antérieur alors que les plasmatocytes, en bleu clair, se sont répandus dans tout l'hémolymphe. La glande lymphatique, formée de deux lobes appareillés, est complètement dorsale.

D'après Lebestky et al. 2000

Figure 20. Les hémocytes sessiles de la larve. Les hémocytes sessiles sont localisés au niveau de l'intégument de la larve. Ils sont visualisés ici à l'aide de la lignée *hemese-Gal4,UAS-encGFP*. Barre d'échelle 500 μm .



D'après Williams et al. 2006

larvaires. La deuxième phase est post-embryonnaire et permet la production d'hémocytes à partir d'un organe spécialisé : la glande lymphatique (Shrestha et Gateff, 1982 ; Lanot et al., 2001 ; Sorrentino et al., 2002 ; Evans et al., 2003). Les hémocytes formés dans la glande lymphatique, en conditions non immunes, ne vont pas entrer dans la circulation avant le début de la métamorphose (Holz et al., 2003). Aucun organe hématopoïétique n'a été mis en évidence chez l'adulte, les hémocytes présents à ce stade (uniquement des plasmatocytes) sont un mélange d'hémocytes embryonnaires et d'hémocytes provenant de la glande lymphatique.

1. L'hématopoïèse embryonnaire

Chez l'embryon, deux types d'hémocytes sont présents : les plasmatocytes et les cellules à cristaux. Ils vont se différencier simultanément à partir de la même population de précurseurs bipotents (Lebestky et al., 2000 ; Bataille et al., 2005) localisés dans le mésoderme pro encéphalique (**Figure 19**) (Bernardoni et al., 1997 ; Holz et al., 2003). Les plasmatocytes, qui représentent le lignage majoritaire (95 % des hémocytes, environ 700 cellules par embryon), vont migrer dans l'embryon suivant un cheminement et une régulation temporelle très précise (Tepass et al., 1994). Au cours de cette migration, ils vont acquérir les caractéristiques de macrophages actifs. Les cellules à cristaux (qui sont au nombre de ~ 30 cellules par embryon), quant à elles, vont rester localisées autour du proventricule de l'intestin antérieur (**Figure 19**) (Lebestky et al., 2000 ; Bataille et al., 2005).

Ces hémocytes embryonnaires vont constituer les hémocytes matures de la larve (Holz et al., 2003). Ils sont présents en circulation dans l'hémolymphe ou attachés au niveau de l'épiderme de la larve : ce sont les hémocytes sessiles (**Figure 20**) (Lanot et al., 2001).

Durant tout le développement, les hémocytes vont également proliférer (Tepass et al., 1994 ; Lebestky et al., 2000 ; Lanot et al., 2001 ; Holz et al., 2003).

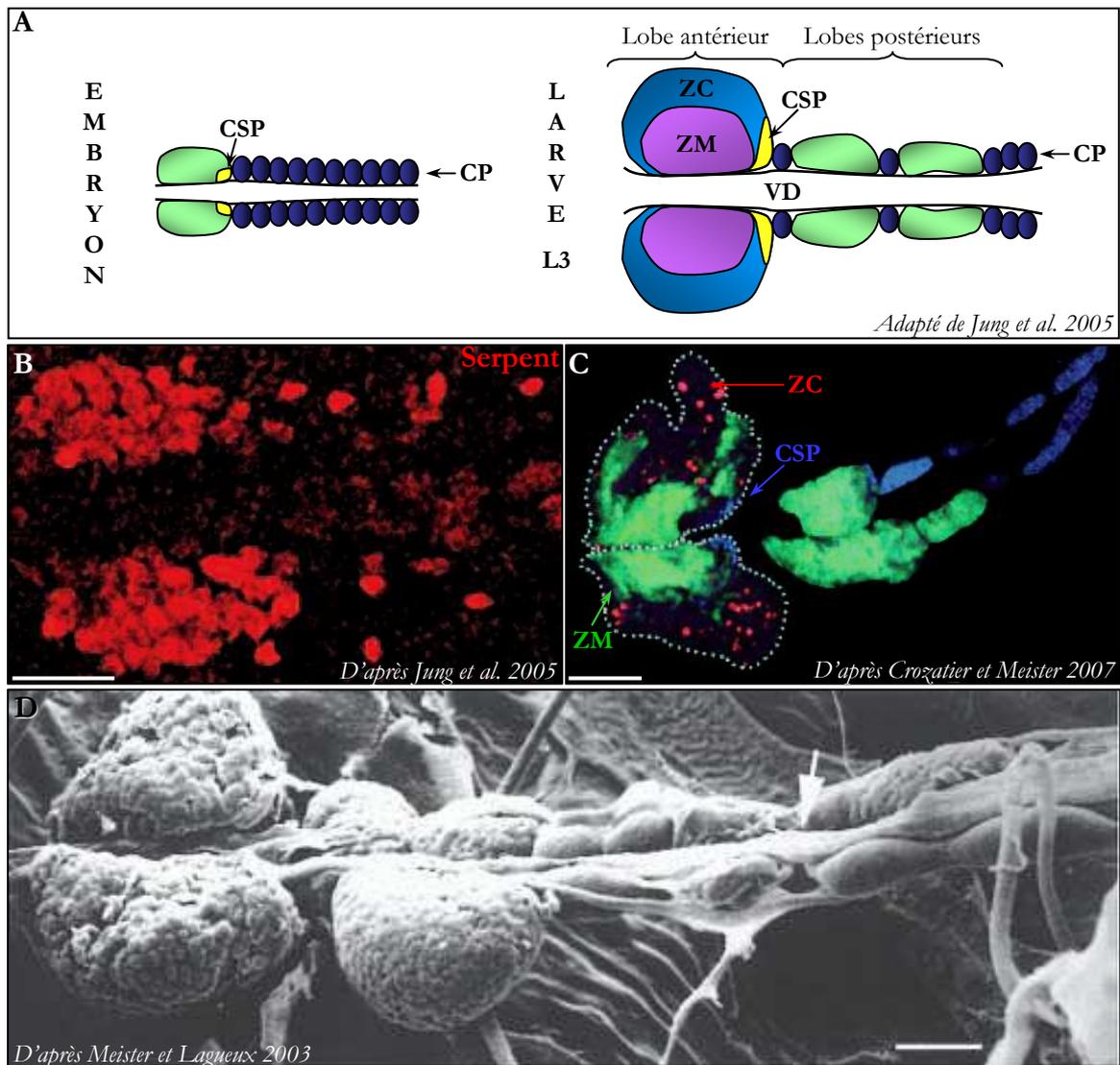


Figure 21. La glande lymphatique. (A) Représentation schématique de la glande lymphatique en fin d'embryogenèse et en fin de vie larvaire. ZC : Zone Corticale, ZM : Zone Médullaire, CSP : Centre de Signalisation Postérieur, VD : Vaisseau Dorsal, CP : Cellule Péricardique. (Voir le texte pour les détails) Antérieure à gauche. (B) Cellules de la glande lymphatique d'un embryon au stade 16 marquée par le marqueur hémocytaire *Serpent*. (C) Triple immunomarquage GFP (vert), Prophénoloxydase (rouge) et Collier (bleu) sur une glande lymphatique de larve L3 *domeless-Gal4,UAS-mCD8GFP*. La lignée pilote *domeless-Gal4* dirige l'expression de la GFP dans la zone médullaire. Le marquage Prophénoloxydase marque les cellules à cristaux matures de la zone corticale. Collier est un marqueur spécifique du centre de signalisation postérieur. La GFP et Collier sont également présents au niveau des lobes secondaires mais ne colocalisent pas. (D) Photographie au microscope électronique à balayage de la glande lymphatique en L3. La glande lymphatique est composée de 3 à 6 paires de lobes disposés le long du vaisseau dorsal (flèche). Barres d'échelle : 10 μ m en B, 100 μ m en C et 50 μ m en D.

2. L'hématopoïèse larvaire

La deuxième vague d'hématopoïèse a lieu au cours de la vie larvaire à partir d'un organe spécialisé d'origine mésodermique : la glande lymphatique. Trois types d'hémocytes peuvent y être générés : les plasmacytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes (Lanot et al., 2001), cependant ces derniers ne se différencient qu'en réponse à un parasitisme.

2.1. Ontogénie de la glande lymphatique

Les précurseurs de la glande lymphatique prennent naissance dans le mésoderme latéral de l'embryon (**Figure 21**) (Holz et al., 2003) et migrent dorsalement pour former les premiers lobes appareillés de la glande lymphatique (**Figure 21**) (Rugendorff et al., 1994). En fin d'embryogenèse jusqu'au début du stade L2, la glande lymphatique est constituée d'une unique paire de lobes, les lobes primaires ou antérieurs, contenant approximativement 20 cellules précurseurs qui flanquent le vaisseau dorsal qui constitue le tube cardiaque du système circulatoire ouvert de la drosophile (**Figure 21**). Puis en début L2, les lobes postérieurs ou secondaires se différencient et prolifèrent, la taille de la glande lymphatique grossissant d'environ 10 fois. En fin de vie larvaire (L3), la glande lymphatique est un organe bilatéral multilobé, composé de deux à six paires de lobes, grossissant encore 10 fois par rapport à sa taille en L2 (**Figure 21**) (Jung et al., 2005).

2.2. L'hématopoïèse dans la glande lymphatique

De l'embryogenèse en L2, la glande lymphatique n'est constituée que de prohémocytes. La différenciation des hémocytes commence début L3 dans les lobes antérieurs qui sont les seuls à produire et à libérer des hémocytes différenciés (en conditions non parasitaires) contrairement

aux lobes postérieurs qui contiennent essentiellement des prohémyocytes (Lebestky et al., 2000 ; Jung et al., 2005). Le Dr Jung et ses collaborateurs (Jung et al., 2005) ont mis en évidence dans les lobes antérieurs trois zones distinctes (**Figure 21**), de part leur morphologie et leur composition hémyocytaire. En périphérie, une première zone d'aspect granuleux, la zone corticale, contient les hémyocytes matures différenciés : les plasmacytes et les cellules à cristaux. Cette zone corticale est caractérisée par une activité proliférative intense et par la présence des marqueurs d'hémyocytes différenciés. Puis dans la région médiane des lobes antérieurs, d'aspect plus lisse et compact, la zone médullaire contient les hémyocytes non différenciés : les prohémyocytes. Cette zone de maturation des hémyocytes a une activité proliférative réduite et n'exprime aucun marqueur de différenciation. Une troisième zone, située à l'extrémité postérieure des lobes antérieurs, correspond à un compartiment indépendant de quelques cellules : il s'agit du centre de signalisation postérieur. Ces cellules ne prolifèrent plus en L3 (Lebestky et al., 2003) et expriment des marqueurs spécifiques, différents des marqueurs hémyocytaires : Collier, Serrate, Hedgehog et Antennapedia (Crozatier et al., 1996 ; Lebestky et al., 2003 ; Mandal et al., 2007).

En fin L3, la zone corticale est considérée comme un réservoir à hémyocytes quiescents. Les hémyocytes seront ensuite libérés dans l'hémolymphe en début de la métamorphose, lorsque la glande lymphatique se désintègre sous l'action de l'hormone stéroïde ecdysone (Lanot et al., 2001 ; Sorrentino et al., 2002). En condition non parasitaire, la glande lymphatique ne génère que des plasmacytes et des cellules à cristaux.

En réponse à un parasitisme par la guêpe *Leptopilina boulardi*, la glande lymphatique va proliférer de façon drastique et produire des lamellocytes. Ces hémyocytes sont spécialisés dans l'encapsulation de gros parasites et sont libérés dans l'hémolymphe 48h après le début du parasitisme (Lanot et al., 2001). Il a été mis en évidence, que l'augmentation du nombre d'hémyocytes circulants, principalement des lamellocytes et des cellules à cristaux, provient

uniquement de la glande lymphatique et non pas d'une prolifération des hémocytes circulants d'origine embryonnaire lors d'un parasitisme (Sorrentino et al., 2002).

C. Régulation génétique de l'hématopoïèse

1. Le déterminant hématopoïétique : *Serpent*

Serpent est un facteur de transcription à doigts de zinc de la famille GATA, très conservée au cours de l'évolution. Les facteurs GATA ont divers rôles dans différents programmes développementaux, incluant la spécification cellulaire, la différenciation et la prolifération, pour revue Patient et McGhee, 2002.

Chez l'embryon de drosophile, *srp* est exprimé dans différents territoires endodermiques et mésodermiques dont le mésoderme pro encéphalique où sont présentes les cellules précurseurs des hémocytes embryonnaires, les prohémoctes (Rehorn et al., 1996). *srp* est exprimé dans les prohémoctes depuis le stade blastoderme (stade 5) et son expression est maintenue durant tout le développement (Rehorn et al., 1996 ; Jung et al., 2005).

Les embryons mutants pour *srp* présentent un nombre restreint de prohémoctes et aucun de ceux-ci n'arrivent à maturité, c'est-à-dire que les embryons sont dépourvus de plasmatoctes et de cellules à cristaux (Rehorn et al., 1996 ; Lebestky et al., 2000). *Srp* est donc nécessaire à la détermination de l'identité hémocytaire.

Le rôle de *srp* dans la glande lymphatique durant l'embryogenèse est inconnu, cependant il semble que *srp* a un rôle dans sa formation. En effet, chez les embryons *srp*, la glande lymphatique exprime, en plus du facteur Odd-skipped, la Péricardine, un marqueur spécifique des cellules péricardiaques, suggérant ainsi une perte de certains aspects hémocytaires au profit d'une identité péricardiaque (Mandal et al., 2004). Réciproquement, l'expression ectopique de *srp* dans le

mésoderme péricardiaque induit la transformation de ces cellules en cellules hématopoïétiques (Mandal et al., 2004 ; Han et Olson, 2005). *srp* est donc requis précocement pour spécifier l'identité des cellules de la glande lymphatique.

Chez la larve, *Srp* est également exprimé dans les prohémyocytes et les hémyocytes différenciés (Rehorn et al., 1996 ; Lebestky et al., 2000). Cependant les mutants *srp* sont létaux en fin d'embryogenèse empêchant l'étude de sa fonction à ce stade, mais étant donné que *srp* est requis pour l'identité des prohémyocytes chez l'embryon et qu'il est exprimé dans toutes les cellules de la glande lymphatique, il peut être supposé que ses fonctions sont les mêmes au stade larvaire (Lebestky et al., 2000 ; Jung et al., 2005).

2. Les déterminants plasmacytaires : *Gcm* et *Gcm2*

gcm et *gcm2* sont coexprimés dès le stade 5 dans le mésoderme antérieur, puis leur expression est maintenue dans les prohémyocytes jusqu'au stade 11 (Bernardoni et al., 1997 ; Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002 ; Bataille et al., 2005). L'expression de *gcm2* est plus faible que celle de *gcm* (Figure 5). Plus précisément, il a été montré que *gcm* est exprimé dans tous les prohémyocytes puis son expression diminue rapidement dans une sous population de prohémyocytes qui vont se différencier ultérieurement en cellules à cristaux (Bataille et al., 2005).

Les embryons mutants pour *gcm-gcm2* montrent une réduction considérable du nombre de plasmacytes qui sont incapables de se convertir en macrophages (Bernardoni et al., 1997 ; Alfonso et Jones, 2002). De plus, il a été montré que les embryons *gcm-gcm2* montrent une augmentation du nombre de cellules à cristaux (Bataille et al., 2005). Par opposition, l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* dans les cellules à cristaux induit leur transformation en plasmacytes matures (Lebestky et al., 2000 ; Bataille et al., 2005). *gcm-gcm2* jouent donc un rôle de pivot entre le destin plasmacytaire et cellules à cristaux durant l'hématopoïèse embryonnaire.

Jusqu'à présent, l'expression de *gcm* et de *gcm2* n'a pas été démontrée dans la glande lymphatique au cours du développement (Bataille et al., 2005). Cependant, chez la larve, l'expression ectopique de *gcm* dans les cellules à cristaux en circulation dans l'hémolymphe induit leur transformation en plasmatoctes (Lebestky et al., 2000). Bien que ces cellules soient d'origine embryonnaire, il peut être supposé un rôle similaire de *gcm-gcm2* dans la différenciation des plasmatoctes de la glande lymphatique.

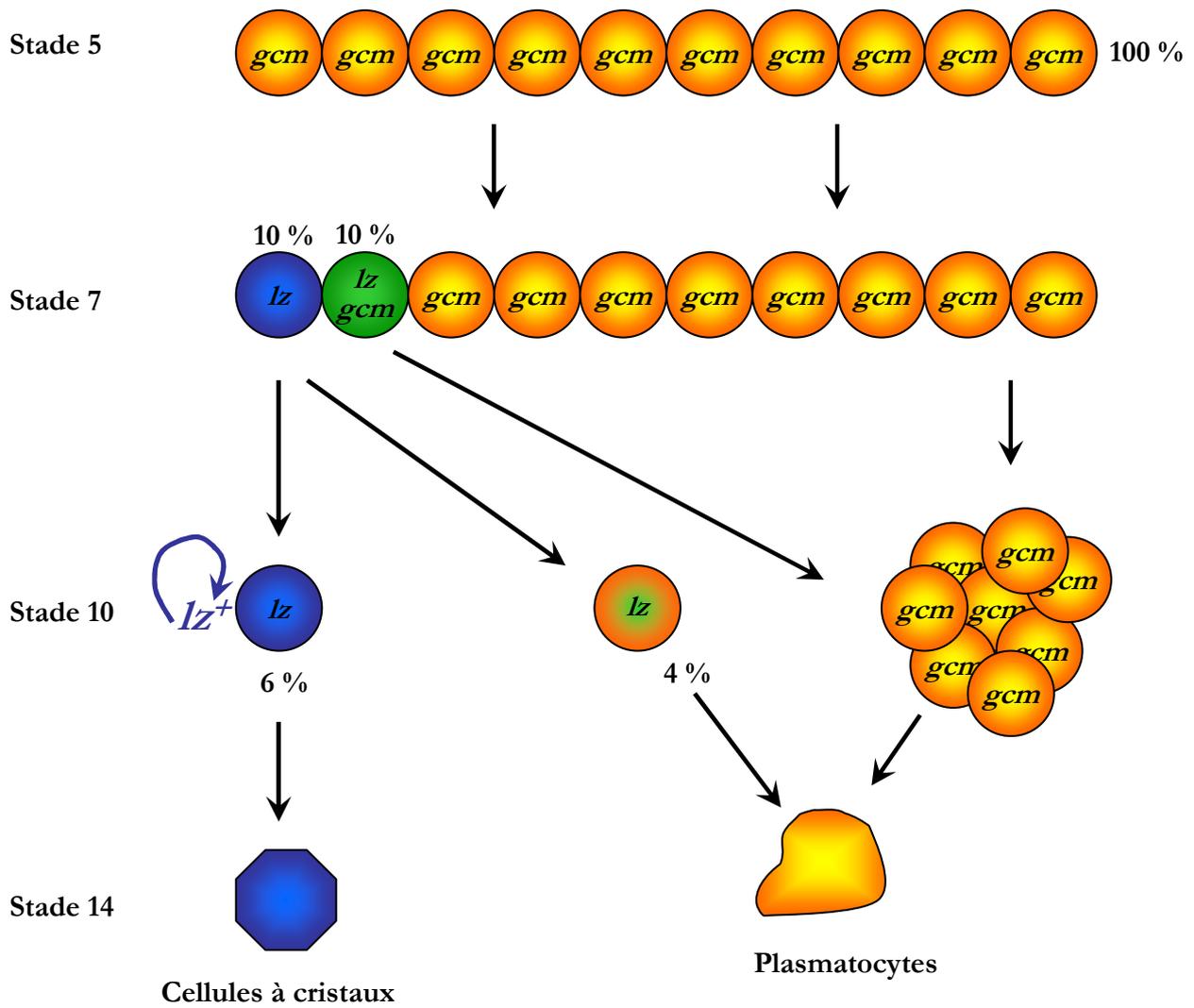
3. Le déterminant des cellules à cristaux : Lozenge

Lozenge (Lz) est un facteur de transcription de type Runx possédant un domaine de liaison à l'ADN Runt spécifique. *l_z* est exprimé à partir du stade 7 dans une sous population du territoire *sp* (20 % des prohémoctes) (Bataille et al., 2005).

Chez la larve, *l_z* est exprimé à partir de L2 dans la glande lymphatique et le nombre de cellules *l_z* positives atteint 50 à 100 par lobes primaires, par contre *l_z* n'est pas exprimé dans les lobes secondaires contenant uniquement des prohémoctes (Lebestky et al., 2000).

L'étude d'un mutant thermosensible *l_z^{ts1}* a permis de mettre en évidence que les embryons mutants pour *l_z* sont dépourvus de cellules à cristaux et que la fonction de *l_z* est requise pendant tout leur développement (Lebestky et al., 2000). Par contre, le nombre et le développement des plasmatoctes ne sont pas affectés par la perte de fonction de *l_z*.

Il a été montré que l'expression ectopique de *l_z* dans les plasmatoctes embryonnaires induit l'expression ectopique des marqueurs des cellules à cristaux (DoxA3 et Pro-PO) sans pour autant réprimer leur différenciation en plasmatoctes (Waltzer et al., 2003). Cependant, l'expression ectopique de *l_z* en contexte *sp* n'est pas capable d'induire l'expression des marqueurs des cellules à cristaux (Waltzer et al., 2002 ; Ferjoux et al., 2007). *sp* est donc requis pour l'induction de l'expression des gènes spécifiques des cellules à cristaux par *l_z*. Par contre de façon intéressante, dans la glande lymphatique, il a été révélé que les cellules exprimant *l_z* voient leur



Adapté de Bataillé et al. 2005

Figure 22. Représentation schématique de l'acquisition du destin cellules à cristaux / plasmacytes durant l'embryogenèse. (Voir le texte pour les détails).

expression de *srp* diminuer (Lebestky et al., 2000), ce qui suggère des mécanismes moléculaires différents pour la production de ce lignage chez la larve.

4. Relations entre Gcm-Gcm2 et Lozenge

Plusieurs expériences de génétique classique ont montré l'existence de relations étroites entre Gcm et Lz. En effet, il a été montré que l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* dans le territoire *lz* positif inhibe l'expression de *lz*. Par contre, la double expression ectopique de *gcm* et de *lz* dans le territoire *srp* induit des cellules à cristaux ectopiques de façon identique à l'expression ectopique de *lz* seule (Bataille et al., 2005), indiquant que Gcm n'inhibe pas la fonction de Lz. *gcm* et *gcm2* inhibent donc le développement des cellules à cristaux en inhibant l'initiation et la maintenance de l'expression de *lz*.

Par contre, l'absence de *gcm-gcm2* n'est pas suffisante pour transformer tous les prohémyocytes en cellules à cristaux. En effet, seuls les prohémyocytes exprimant *lz* vont devenir des cellules à cristaux en contexte *gcm-gcm2* (20 % des prohémyocytes initiaux). De façon intéressante, l'expression ectopique de *lz* dans le territoire *srp* et en conditions *gcm-gcm2* transforment tous les prohémyocytes en cellules à cristaux, et la grande majorité d'entre elles restent localisées au niveau du proventricule de l'intestin antérieur (Bataille et al., 2005). Les prohémyocytes sont donc des précurseurs à double potentiel qui peuvent se différencier en plasmatoctes ou en cellules à cristaux dépendant de l'activité respective de *gcm-gcm2* et *lz*.

En résumé (**Figure 22**), initialement tous les prohémyocytes expriment *gcm*. Puis, la transcription de *gcm* est stoppée dans une sous population de prohémyocytes (10 % du groupe initial) qui vont commencer à exprimer *lz*, ainsi que 10 % de prohémyocytes supplémentaires. Les prohémyocytes exprimant *gcm* vont acquérir le destin plasmatoctaire (90 % des prohémyocytes). 40 % des prohémyocytes exprimant uniquement *lz* (donc 6 % du groupe initial) vont devenir des

plasmacytes par l'activité résiduelle de Gcm, les 60 % restant maintiennent l'expression de λ par une boucle d'autoactivation et vont devenir des cellules à cristaux.

5. Le répresseur du destin cellules à cristaux : U-shaped

U-shaped (Ush) est une protéine de la famille des Friend Of GATA, protéines à doigts de zinc multiples connues pour réguler l'activité des protéines de la famille GATA (pour revue voir [Cantor et Orkin, 2005](#)). *usb* est exprimé dans les prothémocytes et dans les plasmacytes tout au long du développement (de l'embryon à la métamorphose).

Il a été montré que les embryons mutants pour *usb* ont un nombre de cellules à cristaux plus important (augmentation de 30 % par rapport au sauvage). Par opposition, l'expression ectopique de *usb* dans les précurseurs des cellules à cristaux conduit à une réduction du nombre de cellules à cristaux matures ([Fossett et al., 2001](#)). L'ensemble de ces résultats indique que ce facteur est un répresseur du destin cellule à cristaux, de façon semblable à Gcm. Cependant, à ce jour, les relations entre Gcm et Ush ne sont pas connues. Il a été mis en évidence que les embryons *gcm-gcm2* expriment toujours *usb* ([Bataille, 2006](#)), indiquant que *usb* n'est pas une cible de Gcm. Par contre, le profil d'expression de *gcm-gcm2* chez des embryons *usb* reste à déterminer. *usb* est exprimé dès le stade 5 dans le mésoderme antérieur ([Fossett et al., 2000](#)), de la même façon que *gcm-gcm2*, ce qui suggère que Gcm-Gcm2 et Ush inhibent la différenciation des cellules à cristaux via des voies de signalisation distinctes.

Ush est également exprimé dès le stade 16 de façon hétérogène dans la glande lymphatique ([Fossett et al., 2001](#) ; [Muratoglu et al., 2006](#)). Bien que sa fonction dans celle-ci ne soit à ce jour pas connue, il est supposé que celui-ci réprime également la différenciation des cellules à cristaux dans la glande lymphatique.

6. Le récepteur PVR

Le récepteur PDGF/VEGF (PVR : PDFG/VEGF Receptor) est un récepteur tyrosine kinase exprimé dans les plasmatoctes embryonnaires (Heino et al., 2001 ; Cho et al., 2002 ; Bruckner et al., 2004). Il a été révélé que ce récepteur a deux fonctions au cours du développement des plasmatoctes : il permet leur survie au cours de l'embryogenèse en inhibant leur apoptose et il est requis pour leur migration à travers l'embryon (Bruckner et al., 2004).

Le récepteur PVR est également exprimé dans toute la glande lymphatique excepté le CSP (Jung et al., 2005). L'analyse de clones mutants *pvr* montre qu'il est impliqué dans la différenciation des plasmatoctes au cours de l'hématopoïèse larvaire. La perte de fonction de *pvr* dans ces clones induit leur transformation en cellules à cristaux, mais, contrairement à l'embryogenèse, la perte de fonction de *pvr* n'entraîne pas une mort par apoptose des hémocytes (Jung et al., 2005).

7. Les facteurs impliqués spécifiquement dans l'hématopoïèse larvaire

7.1. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans de nombreux processus développementaux (voir INTRODUCTION p27), pour revue Bolos et al., 2007. Au niveau de la glande lymphatique, Notch est exprimé dans la ZM, et Serrate (son ligand) est exprimé spécifiquement dans le CSP (Lebestky et al., 2003). Au cours de l'hématopoïèse larvaire, Notch a un rôle instructif pour la différenciation des cellules à cristaux (Duvic et al., 2002 ; Lebestky et al., 2003). La perte de fonction de Notch réduit considérablement le nombre de cellules à cristaux alors que l'activation constitutive de cette voie aboutit à un grand nombre de celles-ci (Duvic et

al., 2002). De plus, il a été montré que Notch est requis pour induire l'expression de $l\zeta$ dans la glande lymphatique (Lebestky et al., 2003).

7.2. Le facteur de transcription Collier

Collier est un orthologue de EBF (early B-cell factor) des mammifères (Hagman et al., 1993 ; Crozatier et al., 1996), un facteur clé contrôlant la différenciation des lymphocytes B chez la souris (Lin et Grosschedl, 1995 ; Maier et Hagman, 2002).

collier (*col*) est exprimé dès le stade 13 au niveau des cellules à l'origine de la glande lymphatique, puis son expression est spécifiquement localisée dans le CSP et dans la zone la plus postérieure de chaque lobe secondaire jusqu'à la métamorphose. Chez la larve, il a été montré que la perte de fonction de *col* dans la glande lymphatique n'a pas d'incidence sur les plasmacytes et les cellules à cristaux qui sont toujours présents (Crozatier et al., 2004). Par contre, les animaux *col* parasités par *Leptopilina boulardi* ne montrent pas d'induction de lamellocytes et par conséquent le parasite se développe au dépend de la larve (Crozatier et al., 2004). De façon intéressante, les animaux *col* présentent plus de plasmacytes et de cellules à cristaux ce qui s'explique par la perte de la ZM de la glande lymphatique, tous les prohémoctes ayant été différenciés en hémocytes matures (Krzemien et al., 2007). De plus, les animaux *col* n'expriment plus *serrate*, exprimé spécifiquement dans le CSP au niveau de la glande lymphatique (Crozatier et al., 2004) indiquant que *col* est nécessaire à la maintenance du CSP. Réciproquement, l'expression ectopique de *col* à l'aide de la lignée pilote *srp-Gal4* (qui dirige l'expression de Gal4 dans toute la glande lymphatique mais aussi dans les hémocytes circulants et sessiles, ainsi que dans le corps gras) induit la production massive de lamellocytes et la formation de tumeurs mélaniques chez 5 % des individus (Crozatier et al., 2004). *col* a donc un rôle instructeur pour la différenciation des prohémoctes dans la glande lymphatique.

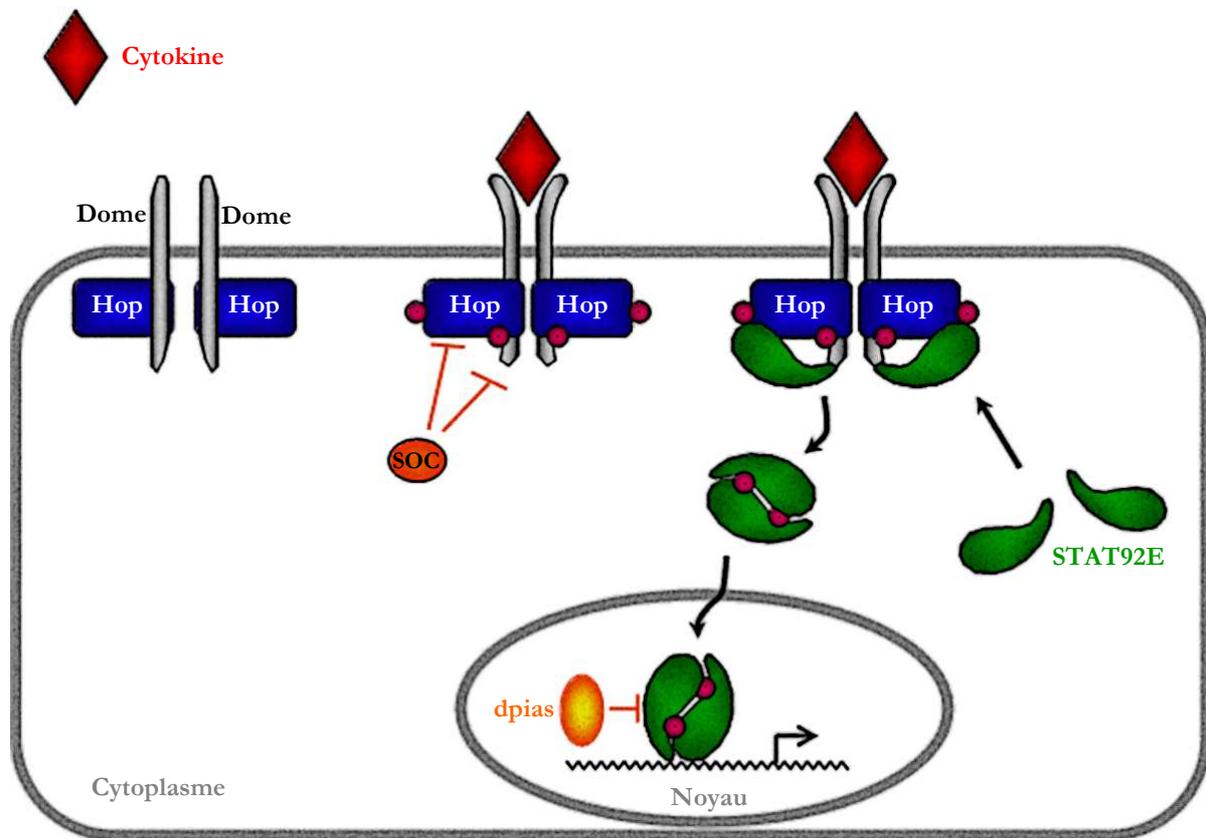


Figure 23. La voie Hop/STAT92E (JAK/STAT) de la drosophile. La fixation du ligand sur le récepteur de cytokine Dome entraîne sa dimérisation ainsi qu'un changement conformationnel de sa région intracytoplasmique. Ce changement de conformation appose les kinases Hop qui leur sont associées, lesquelles s'activent par transphosphorylation de résidus tyrosines clefs. Ces résidus tyrosines représentent des sites d'amarrage pour les facteurs STAT92E localisés dans le cytoplasme. Une fois recrutés, les facteurs STAT92E sont activés par des phosphorylations qui sont assurées par Hop. Les facteurs STAT92E activés sont alors transportés dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. L'activité de la voie Hop/STAT92E peut être régulée par des inhibiteurs de deux types : dpas qui se fixent directement aux facteurs STAT92E, et les SOCS qui inhibent l'activité du récepteur Dome ou de la kinase Hop.

7.3. La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) est très conservée au cours de l'évolution, que ce soit au niveau de ses composantes ou de ses fonctions (pour revues Hou et al., 2002 ; Arbouzova et Zeidler, 2006). Chez la drosophile, cette voie de signalisation fut d'abord caractérisée pour son rôle durant l'embryogenèse où elle participe à la segmentation (Perrimon et Mahowald, 1986 ; Binari et Perrimon, 1994). Lors de l'hématopoïèse larvaire, cette voie de signalisation est active dans la ZM de la glande lymphatique (Krzemien et al., 2007). Cette voie peut également être activée dans le corps gras en cas de réponse immunitaire humorale (Agaisse et al., 2003).

Les composants principaux de la voie JAK/STAT sont le ligand Unpaired, le récepteur Domeless (Dome, connu également sous le nom de Master of marelle), la kinase Hopscotch (Hop) et STAT92E (connu également sous le nom de Marelle). Les événements de la cascade de signalisation sont décrits dans la **Figure 23**.

L'activité de cette voie de signalisation peut être régulée par des inhibiteurs de deux types : les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) qui se fixent directement aux facteurs STATs, et les SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) qui inhibent l'activité du récepteur ou de la kinase JAK (Hou et al., 2002).

Chez la drosophile, il existe un unique dpias (connu également sous le nom de Su(var)2-10 et de Zimp), un membre de la famille des PIAS/Miz1/ARIP3 (Mohr et Boswell, 1999), qui régule négativement la voie JAK/STAT (Hop/STAT92E) en interagissant physiquement avec la forme tyrosine-phosphorylée de STAT92E (forme active) (Betz et al., 2001). L'ARNm de *dpias* est uniformément distribué aux stades blastoderme syncytial et cellulaire, mais n'est plus du tout

délectable après rétraction de la bandelette germinale (Mohr et Boswell, 1999). *dpias* est également exprimé chez la larve et chez l'adulte mais son profil d'expression n'est à ce jour pas défini.

Un des premiers indicateurs que cette voie de signalisation pouvait être impliquée dans le développement des hémocytes est venu de la caractérisation des allèles dominants gain de fonction pour *hop*. En effet, deux mutations thermosensibles (*Tumerous-lethal* (*Tum-l*) et *T42*) ont comme conséquence des protéines Hop dont l'activité kinase est constitutivement activée (Luo et al., 1995 ; Luo et al., 1997). Il a été montré que les larves *hop^{Tum-l}* présentent des lamellocytes dans leur hémolymphe lorsqu'elles sont placées à une température restrictive ce qui aboutit *in fine* à la formation de tumeurs mélaniques en L3 (Harrison et al., 1995 ; Luo et al., 1995 ; Zettervall et al., 2004). De plus, le phénotype de tumeurs mélaniques des larves *hop^{Tum-l}* peut être sauvé par la suppression d'une copie de *stat92E* (Hou et al., 1996) ou par la surexpression de *dpias* (Betz et al., 2001). Enfin, la perte de fonction de *dpias* aboutit également à la formation de tumeurs mélaniques en L3 (Betz et al., 2001 ; Hari et al., 2001). Ceci montre le rôle de régulateur négatif de *dpias* sur la voie JAK/STAT. Le rôle du ligand Upd n'a pas été étudié dans l'hématopoïèse. Cependant, il a été mis en évidence que lors d'une infection bactérienne, les plasmatocytes signalent l'infection au corps gras via Upd3 (Agaisse et al., 2003), il peut donc être supposé qu'un tel mécanisme peut également avoir lieu en cas de parasitage.

Les larves mutantes perte de fonction pour la voie JAK/STAT ont un nombre d'hémocytes en circulation comparables aux larves sauvages (Remillieux-Leschelle et al., 2002 ; Sorrentino et al., 2004) mais ces animaux n'ont plus de ZM (Krzemien et al., 2007). Il a été montré que *col* est nécessaire au maintien de cette voie de signalisation en L3 dans la ZM. De plus, les animaux mutants pour cette voie de signalisation montrent une réduction de leur capacité d'encapsulation lors d'un parasitage par la guêpe *Leptopilina bouvardi* (Remillieux-Leschelle

et al., 2002 ; Sorrentino et al., 2004). *col* agit donc pour maintenir l'activité de la voie JAK/STAT dans la ZM et de ce fait le caractère « prohémoocyte » de ces cellules.

L'ensemble de ces données met en évidence le rôle essentiel de cette voie de signalisation dans la différenciation des lamellocytes.

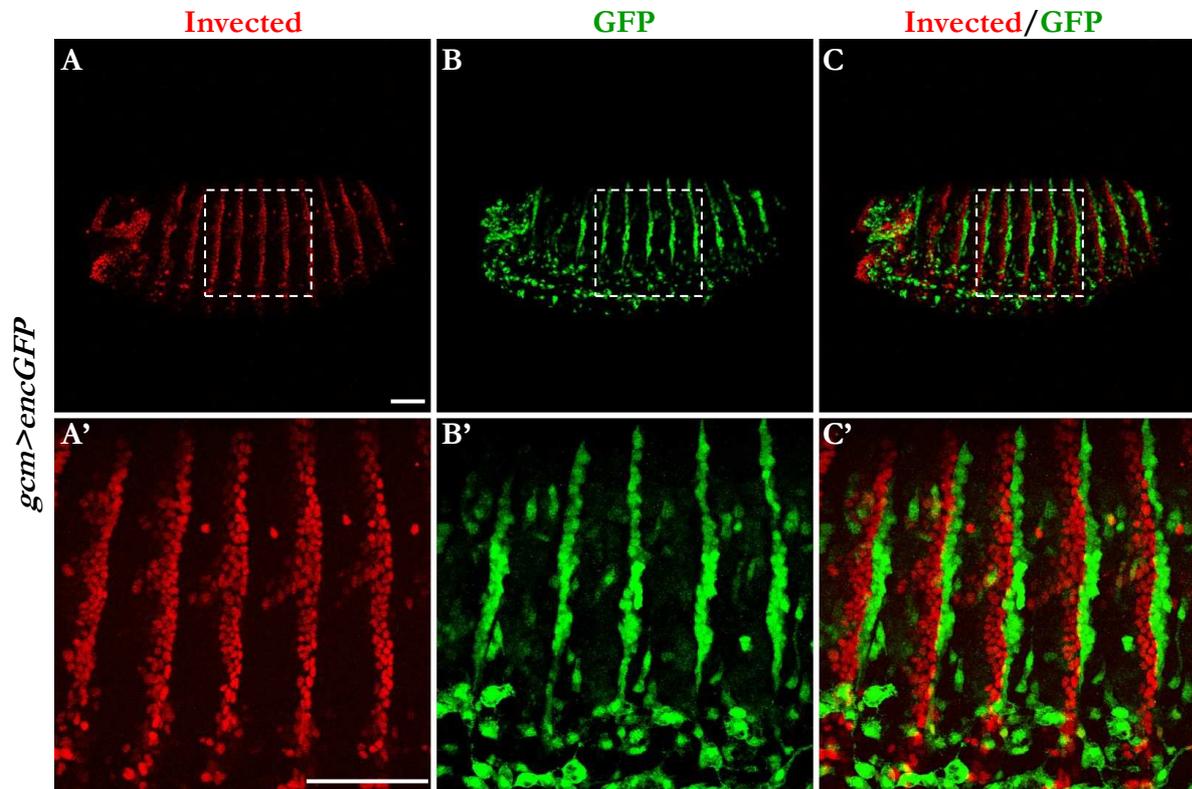


Figure 24. *gcm* est exprimé dans la première rangée de cellules de chaque segment. Double immunomarquage Invected (rouge, A,A') et GFP (vert, B,B') sur embryon *gcm-Gal4,UAS-encGFP*, exprimant la GFP selon le profil d'expression de *gcm*. Stade 15 présenté en vue latérale, le côté antérieur étant à gauche. L'immunomarquage anti-GFP marque le cytoplasme et le noyau des cellules qui expriment *gcm* alors que l'immunomarquage anti-Invected marque le noyau des cellules qui expriment *engrailed*. (C,C') montre simultanément les deux marquages. Les zones délimitées en lignes interrompues (A-C) représentent les zones agrandies en A'-C'. *engrailed* est exprimé dans la partie la plus postérieure de chaque segment et *gcm* est exprimé dans les cellules adjacentes à *engrailed*, ce qui correspond aux cellules tendon à la limite du segment. Barres d'échelle 50 μ m.

L'analyse du profil d'expression des gènes *gcm* et *gcm2* chez l'embryon a révélé que ces gènes sont également exprimés dans une rangée de cellules épidermiques dès le stade 12 (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996 ; Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002) qui pourraient correspondre aux cellules tendon (**Figures 5 et 24**).

III. LES SITES D'ATTACHEMENTS MUSCULAIRES CHEZ L'EMBRYON : LES CELLULES TENDON

A. Le système musculaire de la drosophile

Chez les insectes, chaque fibre musculaire est attachée à la cuticule par l'intermédiaire de cellules épidermiques spécialisées : les cellules tendon (**Figure 25**). Ces cellules ont pour rôle de transmettre la tension induite par les contractions musculaires à la cuticule ce qui permet la locomotion durant la vie larvaire. La musculature somatique de la larve, qui est mise en place durant l'embryogenèse, est composée de trente fibres musculaires pour chaque hémisegment, organisées de façon stéréotypée. Chacun de ces muscles acquiert un destin spécifique dû à l'expression combinée unique de facteurs de transcription hérités par les cellules précurseurs des muscles. La spécificité d'un muscle est déterminée par son orientation, le nombre de myoblastes compétents ayant fusionnés et la morphologie du muscle (Bate, 1990).

Chez l'embryon de drosophile, deux catégories de cellules tendon ont été décrites en fonction de leur position dans chaque segment et des muscles qu'elles attachent : les cellules tendon en bord de segment qui attachent les muscles longitudinaux, et les cellules tendon intrasegmentaires qui attachent les muscles transversaux latéraux (**Figure 25**). *gcm* et *gcm2* semblent être exprimés dans les cellules tendons en bord de segment.

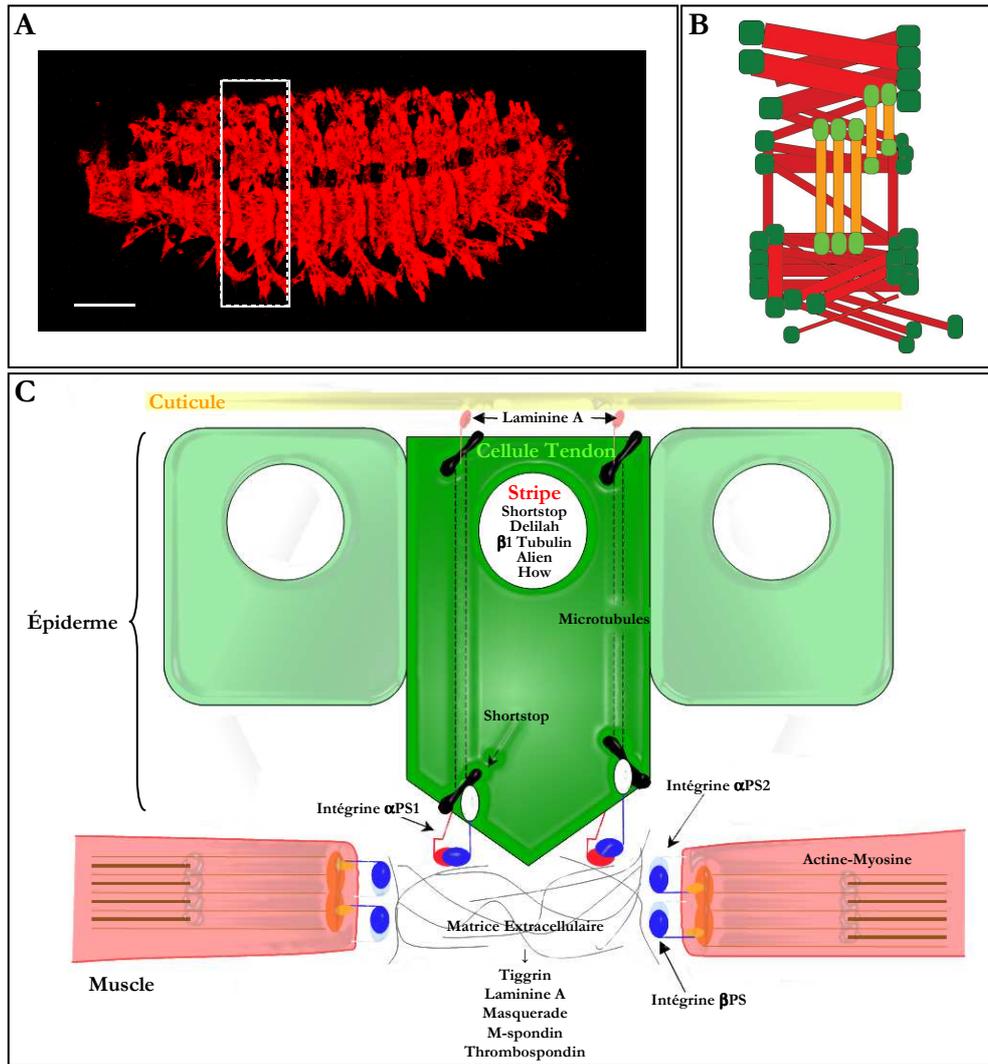


Figure 25. Organisation de l'attachement des muscles aux cellules tendon. (A) Embryon sauvage au stade 16 en vue latérale, côté antérieur à gauche. Les muscles somatiques sont visualisés à l'aide d'un immunomarquage anti-Myosine. Barre d'échelle 50 µm. (B) Vue schématique de l'organisation des muscles somatiques et des cellules tendon sur un segment (encart en A). Les cellules tendon en bord de segment (vert foncé) attachent les muscles longitudinaux (rouge), et les cellules tendon intrasegmentaires (vert clair) attachent les muscles transversaux latéraux (orange). (C) Les cellules tendon (vert foncé) sont des structures dérivées de l'épiderme (vert) qui sont elles même attachées à la cuticule de l'embryon (jaune). La fixation et le maintien des muscles aux cellules tendon sont réalisées grâce aux composants de la matrice extracellulaire qui sont déposés au niveau des sites d'attachement muscles – cellule tendon.

B. La détermination des précurseurs des cellules tendon

La détermination et la différenciation de toutes les cellules tendon est dépendante du gène *stripe* qui représente donc le gène maître de la différenciation des cellules tendon chez la drosophile (de la Pompa et al., 1989 ; Lee et al., 1995 ; Becker et al., 1997). *stripe* code pour deux facteurs de transcription, Stripe a et Stripe b, produits par épissage alternatif. Stripe a et Stripe b diffèrent dans leur région N-terminale mais partagent un même DBD de type Early Growth Response-like (EGR) à trois doigts de zinc (Frommer et al., 1996).

Les embryons mutants pour *stripe* ne possèdent pas de cellules tendon (Volk et VijayRaghavan, 1994 ; Frommer et al., 1996 ; Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997). De plus, les cellules tendon présumptives des embryons *stripe* n'expriment pas le répertoire des gènes caractéristiques de ces cellules, tels que *shortstop* (connu également sous le nom de *groovin* ou de *kakapo*) (Volk et VijayRaghavan, 1994), *delilah* (Armand et al., 1994), $\beta 1$ *tubulin* (Buttgereit et al., 1991 ; Buttgereit, 1993). Cette absence de cellule tendon aboutit finalement à une désorganisation de la musculature somatique et à des muscles envoyant des filopodes dans de mauvaises directions (Volk et VijayRaghavan, 1994 ; Frommer et al., 1996 ; Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997). La perte de fonction de *stripe* élimine *stripe a* et *stripe b*, ne permettant pas de déterminer la fonction spécifique de chaque isoforme. Toutefois, l'isoforme *stripe b* est présente dans tous les précurseurs et dans toutes les cellules tendon. De plus, l'expression ectopique de *stripe b* induit l'expression ectopique de tous les gènes connus jusqu'à présent dans les cellules tendon : *shortstop*, *alien*, *delilah*, $\beta 1$ *tubulin*, *stripe a* (Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997) et *how* (Nabel-Rosen et al., 1999). L'expression ectopique de *stripe b* dans l'épiderme induit donc des cellules tendon ectopiques, également capables d'attirer les muscles somatiques ce qui se reflète par une désorganisation de la musculature (Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997). *stripe a* est retrouvé plus tardivement au cours du développement et uniquement

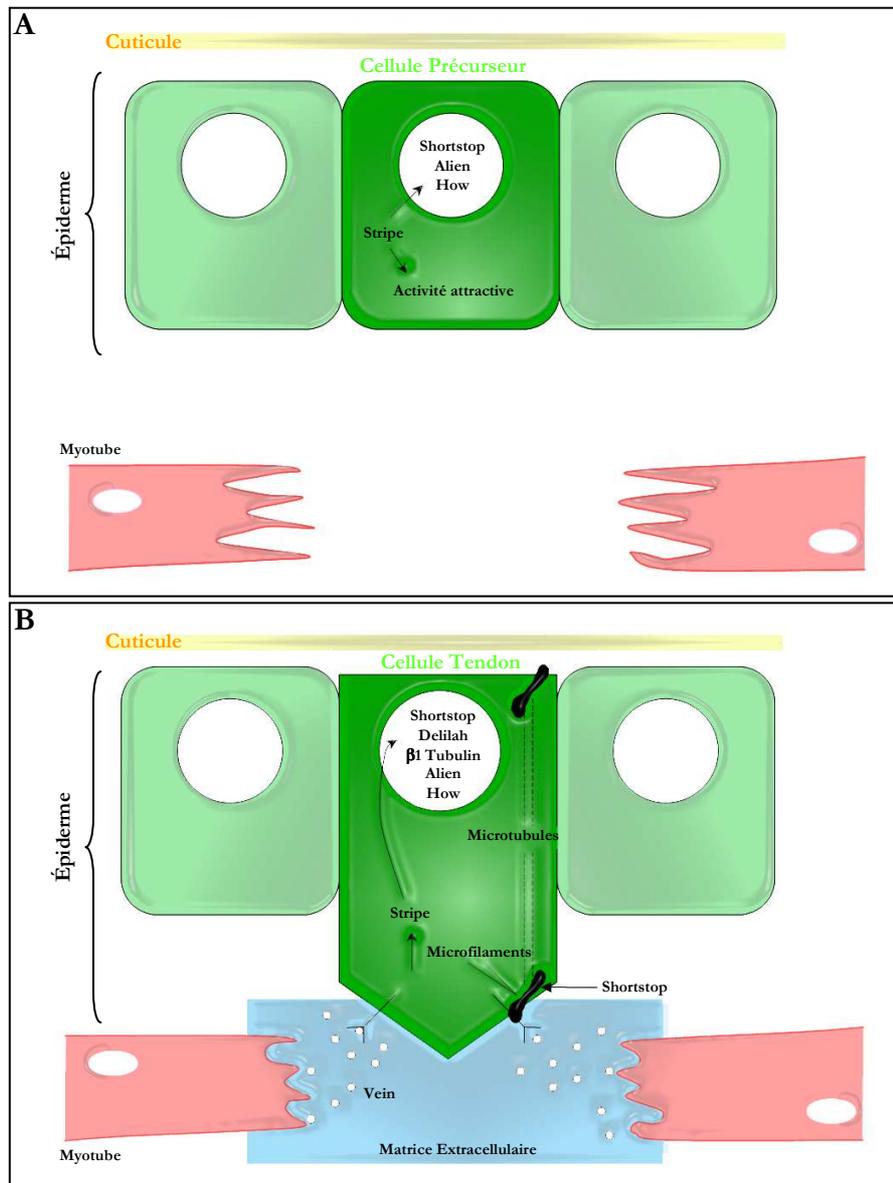


Figure 26. Développement d'une cellule tendon. (A) L'expression précoce de *stripe* défini les cellules précurseurs des cellules tendon de façon indépendante des muscles. Cette expression précoce de *stripe* induit une activité attractive des cellules tendon sur les myotubes et l'expression des gènes *alien*, *how* et *shortstop*. (B) Les muscles attirés par les cellules tendon libèrent au niveau de celle-ci la protéine Vein. Vein va activer le récepteur Egfr qui va déclencher l'expression tardive de *stripe*. La différenciation terminale de la cellule tendon a alors lieu, ce qui est caractérisé par l'expression des gènes tardifs de la différenciation des cellules tendon, la $\beta 1$ tubulin et *delilah*.

dans les cellules tendon en bord de segment (Frommer et al., 1996), suggérant que *stripe a* n'est impliqué que dans la maturation de certaines cellules tendon. Sa fonction reste à être déterminée.

C. L'assemblage muscles – tendons

Le développement des cellules tendon se déroule en deux phases (Figure 26). Lors de la première phase, indépendante des muscles, *stripe* est exprimé dans les précurseurs des cellules tendon. Cette expression de *stripe* précède l'attachement des muscles aux cellules tendon, et a également lieu chez les embryons mutants perte de fonction pour *twist*, où aucun muscle somatique n'est formé (Becker et al., 1997). La deuxième phase du développement des cellules tendon est, quant à elle, dépendante des muscles : l'expression de *stripe* est maintenue uniquement dans les cellules ayant attaché un muscle.

1. Les cellules tendon et le guidage des muscles

Durant l'embryogenèse, les myoblastes se différencient, à partir de précurseurs dans le mésoderme, en des myotubes syncytiaux à travers des étapes consécutives de prolifération, migration et fusion (pour revue voir Bate, 1993).

L'identité des précurseurs des muscles somatiques a lieu durant les stades précoces de l'embryogenèse, avant leur attachement aux cellules tendon. Après la fusion des myoblastes (stade 12-13), les myotubes migrent sous l'ectoderme et étendent des prolongements cytoplasmiques dans toutes les directions vers les précurseurs des cellules tendon jusqu'à ce que le myotube et la cellule tendon rentrent en contact. Les précurseurs des cellules tendon immatures guident les myotubes vers leur correct site d'attachement. En effet, les cellules qui exprime *stripe* de façon ectopique dans l'ectoderme ou dans les glandes salivaires sont capables d'attirer les muscles à proximité (Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997).

2. La maturation des cellules tendon

Le nombre initial de cellules précurseurs exprimant *stripe* est plus élevé que le nombre final de cellules tendon matures. Par exemple, parmi les deux groupes d'environ treize précurseurs des cellules tendon intrasegmentaires, seulement trois par groupe vont continuer d'exprimer *stripe* et se développer en cellules tendon matures, connectées aux trois muscles transversaux latéraux de chaque segment. Cette parfaite concordance entre le nombre de muscles et de cellules tendon suggère une interaction directe entre ces deux types cellulaires. En effet, dans certains mutants où des groupes de muscles sont absents, les cellules précurseurs correspondantes ne maintiennent pas l'expression de *stripe* et perdent leur potentiel à se développer en cellules tendon matures (Becker et al., 1997). Ceci suggère l'existence d'un facteur de différenciation provenant des muscles et induisant la maturation des cellules tendon.

Lors d'un crible perte de fonction, réalisé dans le but d'identifier les gènes impliqués dans les interactions muscles/cellules tendon, Vein, un ligand du récepteur EGF (Egfr) de type neuréguline (Schnepp et al., 1996), fut identifié (Yarnitzky et al., 1997). Les embryons mutants perte de fonction pour *vein* n'expriment pas les marqueurs de différenciation terminale *delilah* et $\beta 1$ *tubulin* (Yarnitzky et al., 1997). A l'opposé, l'expression ectopique de *vein* dans l'ectoderme induit une expression ectopique de *delilah* et $\beta 1$ *tubulin* mais aussi de *stripe*. Ce phénotype dépend de la disponibilité de l'Egfr dans les cellules répondantes et dépend de la voie de signalisation Ras. En effet, l'expression des marqueurs spécifiques aux cellules tendon peut être induite par l'expression ectopique de la forme active de Ras dans l'ectoderme (Yarnitzky et al., 1997). Vein est donc un signal émis par le muscle qui active la voie de signalisation de l'EGF dans les cellules tendon, et qui est exigé pour la différenciation terminale des cellules tendon une fois les muscles attachés. L'ARNm de *vein* est présent à des niveaux élevés dans tous les muscles somatiques avant leur attachement aux cellules tendon. Par contre, la protéine Vein est fortement concentrée spécifiquement à l'emplacement où va se former la jonction entre le muscle et sa cellule tendon.

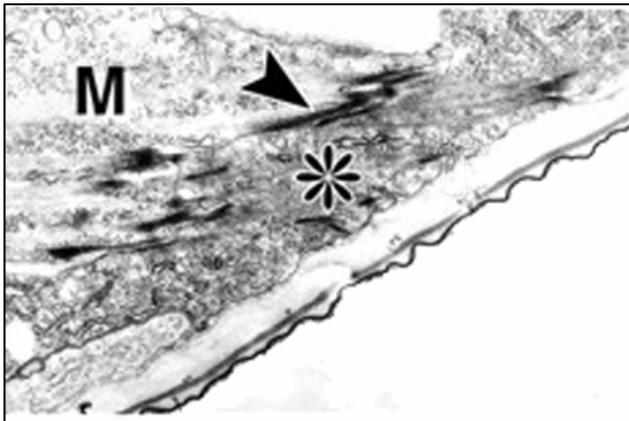
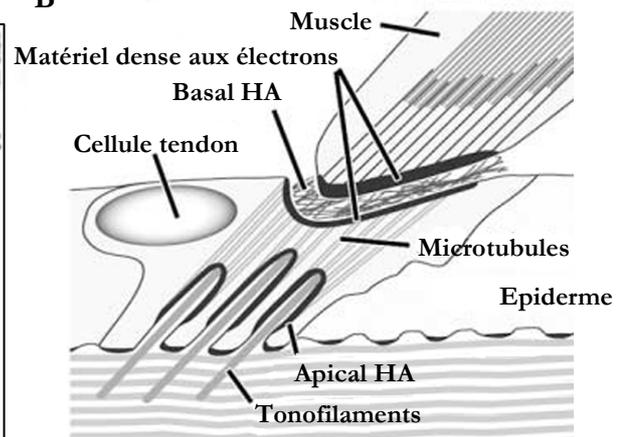
A*D'après Prokop et al. 1998***B***D'après Subramanian et al. 2003*

Figure 27. Les jonctions hémiaadhérentes muscles-cellules tendon. (A) Jonction hémiaadhérente (HA) (tête de flèche) entre un muscle somatique (M) et une cellule tendon (*) d'un embryon au stade 17, visualisée en microscopie électronique. La jonction hémiaadhérente apparaît dense aux électrons. (B) Schéma représentant l'attachement d'un muscle à sa cellule tendon. Il peut être noté que la cellule tendon est bien ancrée à la cuticule, permettant ainsi la transmission des contractions musculaires.

Cette accumulation localisée est probablement critique pour n'induire la maturation que d'une cellule tendon unique. De plus, cette accumulation est probablement essentielle pour une activation forte et continue de l'Egfr étant donné que Vein est connu pour être un ligand relativement faible de la voie de signalisation de l'Egfr (Schnepp et al., 1998).

3. La différenciation terminale des cellules tendon

Seules les précurseurs des cellules tendon qui sont rentrés en contact avec des myotubes vont se différencier en cellules tendon matures (Buttgereit, 1996 ; Becker et al., 1997). Cette maturation est essentielle pour la formation de jonctions hémiadhérentes entre le muscle et la cellule tendon afin de lier étroitement les deux types cellulaires entre eux et pour développer la résistance et l'élasticité de la cellule tendon. Ceci permet la transmission des contractions musculaires à la cuticule durant la locomotion (Subramanian et al., 2003).

Les jonctions hémiadhérentes sont formées d'une part entre le muscle et la matrice extracellulaire (MEC) sécrétée dans l'espace entre le muscle et la cellule tendon, d'autre part entre la cellule tendon et le même matériel de la MEC (Figure 27). La formation de jonctions hémiadhérentes est associée à des changements morphologiques au niveau du muscle et de la cellule tendon. Au niveau du muscle, la formation de la jonction induit l'arrêt de la formation des filipodes à l'extrémité du muscle (Bate, 1990) et la mise en place de tous les composants requis pour construire la jonction adhérente. Dans la cellule tendon, la formation de la jonction est associée avec un réarrangement du cytosquelette et à un changement de morphologie de la cellule (Tepass et Hartenstein, 1994). Les jonctions hémiadhérentes formées des deux côtés dépendent d'intégrines (protéines réceptrices transmembranaires), l'hétérodimère α PS2 β PS coté musculaire et α PS1 β PS coté cellule tendon (Bogaert et al., 1987 ; Leptin et al., 1989). Ces récepteurs lient la Tigrin, Laminine A et Thrombospondin, composants majeurs de la MEC au niveau de la jonction muscles/cellule tendon (Fogerty et al., 1994 ; Gotwals et al., 1994 ; Prokop et al., 1998 ;

Chanana et al., 2007 ; Subramanian et al., 2007). La MEC apparaît comme un matériel dense aux électrons en microscopie électronique, accumulée dans l'espace entre la cellule tendon et le muscle et contient en plus de la Tigrin, de la Laminine A et de Thrombospondin, des autres protéines comme M-Spondin (Umehiya et al., 1997), Masquerade (Murugasu-Oei et al., 1995) et Vein (Strumpf et Volk, 1998). Le mécanisme de dépôt de ces composants n'est pas très clair mais il a été montré la présence d'hémocytes près des jonctions muscles/cellules tendon sécrétant de la Tigrin et de la Laminin (voir INTRODUCTION p33) (Fogerty et al., 1994 ; Bunch et al., 1998 ; Martin-Bermudo et Brown, 2000). En l'absence d'intégrines fonctionnelles, comme chez les embryons *mysospheroid* où la sous unité β PS est absente, les muscles approchent les cellules tendon et entrent en contact mais à la première contraction musculaire, les muscles se détachent et prennent une forme arrondie (Wright, 1960). L'établissement de cette jonction hémiaadhérente entre le muscle et sa cellule tendon est considéré comme étant le stade final de la maturation de ces deux types cellulaires.

La fonction des gènes *gcm-gcm2* dans les cellules tendon sera abordée dans les résultats de ma thèse.



Figure 28. Arbre phylogénétique non raciné des protéines Gcm. Cet arbre phylogénétique de type « Phenogram » a été réalisé à partir d'un alignement des séquences protéiques des différents Gcm, décrits ou prédits, à l'aide du programme Muscle. L'arbre a été construit à l'aide du programme PhyML qui utilise l'algorithme PHYLIP. Ces programmes sont disponibles sur le site Internet <http://www.phylogeny.fr>. Dans cet arbre, les feuilles représentent les espèces existantes, les nœuds internes représentent les ancêtres et la racine représente l'ancêtre le plus ancien du point de vue de l'évolution.

IV. LES ORTHOLOGUES DE *Gcm* ET *Gcm2*

Les gènes *gcm-gcm2* sont conservés au cours de l'évolution, ils ont été mis en évidence aussi bien chez l'oursin que chez l'homme (**Figure 28**). Jusqu'à présent, il a été identifié un orthologue chez l'oursin (*SpGCM*) et chez le poisson zèbre (*GCMb*) et deux orthologues *GCM1* et *GCM2* (également appelés *GCMa* et *GCMb*) chez le poulet, la souris et l'homme (Akiyama et al., 1996 ; Altshuler et al., 1996 ; Kim et al., 1998 ; Schreiber et al., 1998 ; Ransick et al., 2002 ; Hanaoka et al., 2004 ; Hashemolhosseini et al., 2004 ; Okabe et Graham, 2004). Les protéines *Gcm* de toutes les espèces présentent un DBD de type GCM qui caractérise cette famille de facteurs de transcription. Ce domaine est la seule région présentant une homologie significative entre les protéines des diverses espèces (Akiyama et al., 1996).

A. Fonctions des gènes *GCM1* et *GCM2* chez les vertébrés

1. Rôle de *GCM1*

Chez l'embryon de souris (stade E7.5 à E17.5), *m-GCM1* est exprimé dans les cellules du trophoblaste puis dans les cellules du labyrinthe qui dérivent du trophoblaste (Basyuk et al., 1999). Les embryons de souris déficientes pour *m-GCM1* présentent une absence de labyrinthe et meurent durant l'embryogenèse vers le stade E10 en conséquence d'apports insuffisants en nutriments et oxygène (Anson-Cartwright et al., 2000 ; Schreiber et al., 2000). De plus, il a été mis en évidence qu'en l'absence de *m-GCM1*, les cellules du trophoblaste ne fusionnent pas afin de former un syncytiotrophoblaste ce qui explique l'absence de labyrinthe. Récemment, la *syncytin* a été identifiée comme une cible directe de *b-GCM1* dans le placenta humain (Yu et al., 2002) et il a été montré que son expression est une étape clé dans la formation du syncytiotrophoblaste (Knerr et al., 2005). Chez la souris, il existe deux gènes, *Syncytin A* et *Syncytin B*, qui sont exprimés

dans le labyrinthe du placenta (Dupressoir et al., 2005), suggérant que le phénotype observé chez les souris déficientes pour *m-GCM1* pourrait être dû à l'absence de l'expression de ces gènes dans le placenta. Une deuxième cible de *b-GCM1* dans le placenta humain est l'*aromatase* (Yamada et al., 1999), gène spécifiquement exprimé dans le syncytiotrophoblaste, unique membre de la famille du cytochrome P-450 responsable de la biosynthèse de l'œstrogène (Thompson et Siiteri, 1974).

De façon intéressante, chez le poulet, *c-GCM1* est exprimé au niveau de la membrane chorioallantoïque, adjacente aux vaisseaux sanguins extra embryonnaires (Hashemolhosseini et al., 2004) suggérant ainsi que la fonction extra embryonnaire de *GCM1* est conservée chez les aviens et les mammifères.

Depuis la période périnatale jusqu'à l'adulte, *m-GCM1* est également exprimé dans le rein et le thymus (Hashemolhosseini et al., 2002). L'expression de *m-GCM1* dans le rein commence à un stade où celui-ci est déjà formé, suggérant que *m-GCM1* est plus impliqué dans sa physiologie que dans son développement. L'expression de *m-GCM1* dans le thymus est restreinte à un petit groupe de cellules, source auxiliaire de l'hormone parathyroïdienne après la glande parathyroïdienne (voir ci-dessous). La fonction de *m-GCM1* dans ces cellules reste à déterminer.

2. Rôle de *GCM2*

GCM2, le second orthologue, est exprimé dans la glande parathyroïde des mammifères (Kim et al., 1998). Les souris déficientes pour *m-GCM2* sont viables à 70 % mais ne possèdent pas de glande parathyroïde, les 30 % restant mourant à la suite d'une sévère hypocalcémie caractéristique d'un hypoparathyroïdisme (Gunther et al., 2000). Cependant l'hormone parathyroïdienne chez ces animaux dépourvus de *m-GCM2* est présente à un niveau comparable aux animaux sauvages (Gunther et al., 2000). En effet, il a été mis en évidence l'existence d'une source secondaire de l'hormone parathyroïdienne dans le thymus, plus précisément les cellules

exprimant *m-GCM1*, qui compense l'absence de synthèse de cette hormone par la glande parathyroïde (Gunther et al., 2000). Chez l'homme, les familles ayant une mutation dans *b-GCM2* présentent également un hypoparathyroïdisme (Ding et al., 2001) confirmant l'importance de *b-GCM2* dans le développement de la parathyroïde. De façon intéressante, il a été mis en évidence que les personnes arborant une mutation de *b-GCM2* présentent une carence totale en hormone parathyroïdienne (Maret et al., 2004) suggérant l'absence de source auxiliaire pour l'hormone parathyroïdienne. En effet, l'expression de *b-GCM1* et la production d'hormone parathyroïdienne dans le thymus n'ont pas pu être mis en évidence chez l'homme (Maret et al., 2004).

Lors du développement des vertébrés terrestres (mammifères et aviens), les arcs pharyngiens se développent en différents organes dont le thymus, la glande thyroïde et la glande parathyroïde (Graham et Smith, 2001). En suivant l'expression de *GCMb* chez le poisson, qui n'a pas de glande parathyroïde, il a été mis en évidence que *GCMb* est exprimé dans l'épithélium pharyngien et qu'il était requis pour le développement des bourgeons des filaments de l'ouïe (Hanaoka et al., 2004 ; Hogan et al., 2004 ; Okabe et Graham, 2004). Par conséquent, la glande parathyroïde et les filaments de l'ouïe sont des structures évolutivement connexes. Il est fort probable que la glande parathyroïde ait été mise en place lors de la transformation des ouïes pendant l'évolution des tétrapodes.

B. Expression et rôle des gènes *Gcm* dans le système nerveux des vertébrés

Bien que les gènes *gcm-gcm2* soient les gènes maîtres de la gliogenèse chez la drosophile, un possible rôle des orthologues *GCM1* et *GCM2* dans le système nerveux des vertébrés était toujours discuté au moment où j'ai commencé mon travail de thèse.

1. *GCM1*

Aucune étude jusqu'à présent n'a permis de mettre en évidence un rôle clair de *GCM1* dans le système nerveux des vertébrés. Cependant plusieurs arguments permettent de supposer que ce gène participe à la formation du système nerveux.

Lors de l'isolation de *m-GCM1* chez la souris, des expériences de PCR sur des ADNc de différents tissus des stades E9.4 à P4, ainsi que des hybridations *in situ* ont été réalisées afin de déterminer le profil d'expression de *m-GCM1*, cependant aucune expression de *m-GCM1* ne fut détectée dans le système nerveux (Altshuller et al., 1996). Quelques années plus tard, l'expression de *m-GCM1* fut mise en évidence par des expériences de PCR étendues sur des préparations d'ADNc de cerveau de souris embryonnaire, et ce, au stade E9.5 mais pas à des stades de développement plus tardifs (Kim et al., 1998), suggérant que l'expression de *m-GCM1* est relativement faible dans le système nerveux. Récemment, des expériences de PCR classiques, sur des préparations d'ADNc de cerveau de souris à différents stades du développement, ont montré que *m-GCM1* est exprimé dans le système nerveux depuis l'embryogenèse jusqu'à l'adulte (stade E12 à adulte) (Iwasaki et al., 2003). L'expression de *m-GCM1* a également été détectée par hybridation *in situ* sur coupe de cerveau de souris au stade E14 au niveau du thalamus ainsi que l'éminence ganglionique (Iwasaki et al., 2003), cependant, ce profil d'expression est distinct de celui des marqueurs d'astrocytes précoces/glie radiaire. A l'opposé, l'utilisation d'une lignée de souris transgénique où le gène de la β -galactosidase remplace la région codante de *m-GCM1*, permettant d'identifier le profil d'expression de *m-GCM1*, n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque expression de *m-GCM1* dans le système nerveux, et ce, quelque soit le stade analysé (Hashemolhosseini et al., 2002).

Des études de surexpression dans des cellules de cerveau embryonnaire de souris en culture, ont montré que *m-GCM1* induit l'expression des marqueurs astrocytaires S100 et GFAP (Glial Eibrillary Acidic Protein) ainsi que la répression du marqueur neuronal MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) (Iwasaki et al., 2003), ce qui sous entend que *m-GCM1* induit le lignage astrocytaire au dépend du destin neuronal, comme chez la drosophile au cours de l'embryogenèse. Ce phénotype est également observé *in vivo* lorsque *m-GCM1* est exprimé de façon ectopique à l'aide d'un rétrovirus dans le cerveau embryonnaire de souris (Iwasaki et al., 2003). De même, l'expression ectopique et transitoire de *m-GCM1* dans la moelle épinière durant l'embryogenèse induit une neurulation secondaire pouvant aboutir à une spina bifida ou à une (des) moelle(s) épinière(s) ectopique(s) composée(s) de glie et de neurones (Nait-Oumesmar et al., 2002). Cependant, l'expression de *m-GCM1* n'a pas pu être mise en évidence dans la moelle épinière au stade où a lieu la neurulation secondaire ce qui ne permet pas de confirmer que *m-GCM1* est requis lors de ce processus. Au contraire de ces études montrant l'implication de *GCM1* au cours du développement du système nerveux des vertébrés, il a été montré que l'expression ectopique de *m-GCM1* n'est pas capable d'induire le destin de glie de Muller dans la rétine de souris (Hojo et al., 2000). Ensemble, ces résultats indiquent que *m-GCM1* peut contribuer fonctionnellement à la génération de sous populations gliales spécifiques.

De façon intéressante, il a été mis en évidence que *m-GCM1* est capable d'induire de la glie ectopique chez l'embryon de drosophile lorsqu'il est exprimé dans le territoire neural (Kim et al., 1998 ; Reifegerste et al., 1999). De plus, *m-GCM1* est capable de sauver le phénotype chez des embryons de drosophile mutants pour *gcm* (Kim et al., 1998). *m-GCM1* est donc conservé fonctionnellement avec *gcm*.

Par ailleurs, l'induction de l'expression du gène *gcm* de drosophile dans des cellules de médulloblastome (cellules neuroectodermiques humaines), induit l'expression du marqueur glial

GFAP (Buzanska et al., 2001). Ensemble, ces données suggèrent une conservation des propriétés fonctionnelles et biochimiques entre les différentes protéines GCM1.

2. *GCM2*

Contrairement à *GCM1*, très peu de recherches ont été réalisées afin de mettre en évidence un rôle possible de *GCM2* dans le développement du système nerveux des vertébrés. Cependant, *b-GCM2* fut cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain fœtal (Kammerer et al., 1999 ; Kanemura et al., 1999) suggérant qu'il pourrait jouer un rôle durant le développement du système nerveux humain. De même, la présence du transcrit de *m-GCM2* a été mise en évidence par PCR sur une préparation d'ADNc de cerveau de souris, du stade embryonnaire à l'adulte (Kim et al., 1998 ; Iwasaki et al., 2003).

De façon surprenante, contrairement à *m-GCM1*, l'expression ectopique de *m-GCM2* dans le territoire neural chez la drosophile n'est pas capable d'induire de la glie ectopique (Kim et al., 1998) alors que son degré d'homologie au niveau du DBD Gcm est similaire à celui entre *m-GCM1* et *gcm*, suggérant que *gcm* et *m-GCM1* peuvent recruter un même cofacteur et non *m-GCM2*, ou que *m-GCM2* et *gcm* n'ont pas les mêmes capacités transactivatrices.

GCM1 et *GCM2* sont donc exprimés dans le système nerveux des vertébrés, cependant leurs profils d'expression et leurs fonctions dans ce territoire n'ont toujours pas été élucidés. Sont-ils chez les vertébrés, comme chez la drosophile, requis dans le développement du système nerveux ?

Lors de la recherche du domaine d'expression des gènes *gcm* et *gcm2* au cours de l'embryogenèse, il a été mis en évidence que ces deux gènes présentent un profil d'expression segmenté au niveau de l'épiderme à partir du stade 12 (**Figure 5**) (Vincent et al., 1996 ; Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). Cependant, jusqu'à notre étude, aucun groupe n'avait déterminé la nature de ces cellules, ni la fonction de *gcm-gcm2* dans ce territoire.

Résumé de la publication :

✓ *gcm* et *gcm2* sont exprimés dans les cellules tendon embryonnaires

Dans le but d'identifier quelles cellules expriment *gcm* et *gcm2* dans l'épiderme, un double immunomarquage pour la GFP et Stripe, le marqueur des cellules tendon, a été réalisé sur des embryons *gcm-Gal4,UAS-encGFP*, qui expriment la GFP selon le profil d'expression de *gcm*. Ceci a permis de mettre en évidence que *gcm* et *gcm2* sont coexprimés dans un sous-type de cellules tendon, celles situées à l'extrémité antérieure de chaque segment et qui attachent les muscles longitudinaux. De façon intéressante, les gènes *gcm-gcm2* sont exprimés dans ces cellules depuis le milieu de l'embryogenèse (stade 12) et persiste jusqu'à la fin de celle-ci.

✓ *gcm* et *gcm2* sont nécessaires pour la différenciation terminale des cellules tendon

Dans le but d'identifier la fonction de *gcm-gcm2* dans ces cellules, l'organisation musculaire des embryons *gcm-gcm2* a été analysée car tout défaut de développement des cellules tendon se traduit systématiquement par un défaut musculaire. Par exemple, chez les embryons *stripe*, les muscles se détachent à la première contraction et prennent un aspect « rond », de plus dans ces embryons les marqueurs des cellules tendon ne sont pas exprimés. De façon intéressante, les embryons *gcm-gcm2* ne présentent pas de défaut musculaire jusqu'au stade 16. De plus, la phase de

différenciation des cellules tendon dépendante des muscles a bien lieu ce qui est caractérisé par l'expression des marqueurs de différenciation tardifs : *delilah* et $\beta 1$ -*tubulin*. Par contre, dès le stade 17, les muscles longitudinaux ventraux dépassent leur cellule tendon cible, traversent la ligne médiane de l'embryon et vont s'attacher aux autres muscles. Ces muscles sont cependant toujours attachés et présentent de l'intégrine β PS au niveau de leur attachement avec les autres muscles. Ces phénotypes peuvent être sauvés à l'aide d'une expression ciblée de *gcm* ou de *gcm2* dans les cellules tendon en contexte mutant pour *gcm-gcm2*.

Les phénotypes des embryons *gcm-gcm2* sont donc totalement différents de ceux observés chez les embryons *stripe*, ce qui suggère que ces gènes possèdent des voies de signalisation distinctes dans ces cellules.

De façon intéressante, les embryons *gcm* ou *gcm2* ne présentent pas de phénotypes musculaires. Par contre, les embryons homozygotes *gcm* et hétérozygotes *gcm2* présentent un phénotype similaire aux embryons *gcm-gcm2*, cependant celui-ci est moins sévère et moins pénétrant. Au contraire, les embryons homozygotes *gcm2* et hétérozygotes *gcm* ne présentent pas de phénotypes musculaires. Ces résultats supportent le fait que ces deux gènes sont requis et que leur dosage est important.

✓ **La perte de fonction spécifique de *gcm-gcm2* dans les cellules tendon induit une désorganisation des muscles ainsi que des problèmes de locomotion**

Chez les embryons *gcm-gcm2*, l'absence de cellules gliales entraîne une létalité avant la fin de l'embryogenèse ce qui peut entraîner une minoration des phénotypes musculaires. En effet, les animaux *gcm-gcm2*, étant dépourvus de glie, meurent avant que les sites d'attachement musculaires soient totalement différenciés et fonctionnels. De plus, les défauts des jonctions neuromusculaires induits par l'absence de glie affectent probablement les contractions

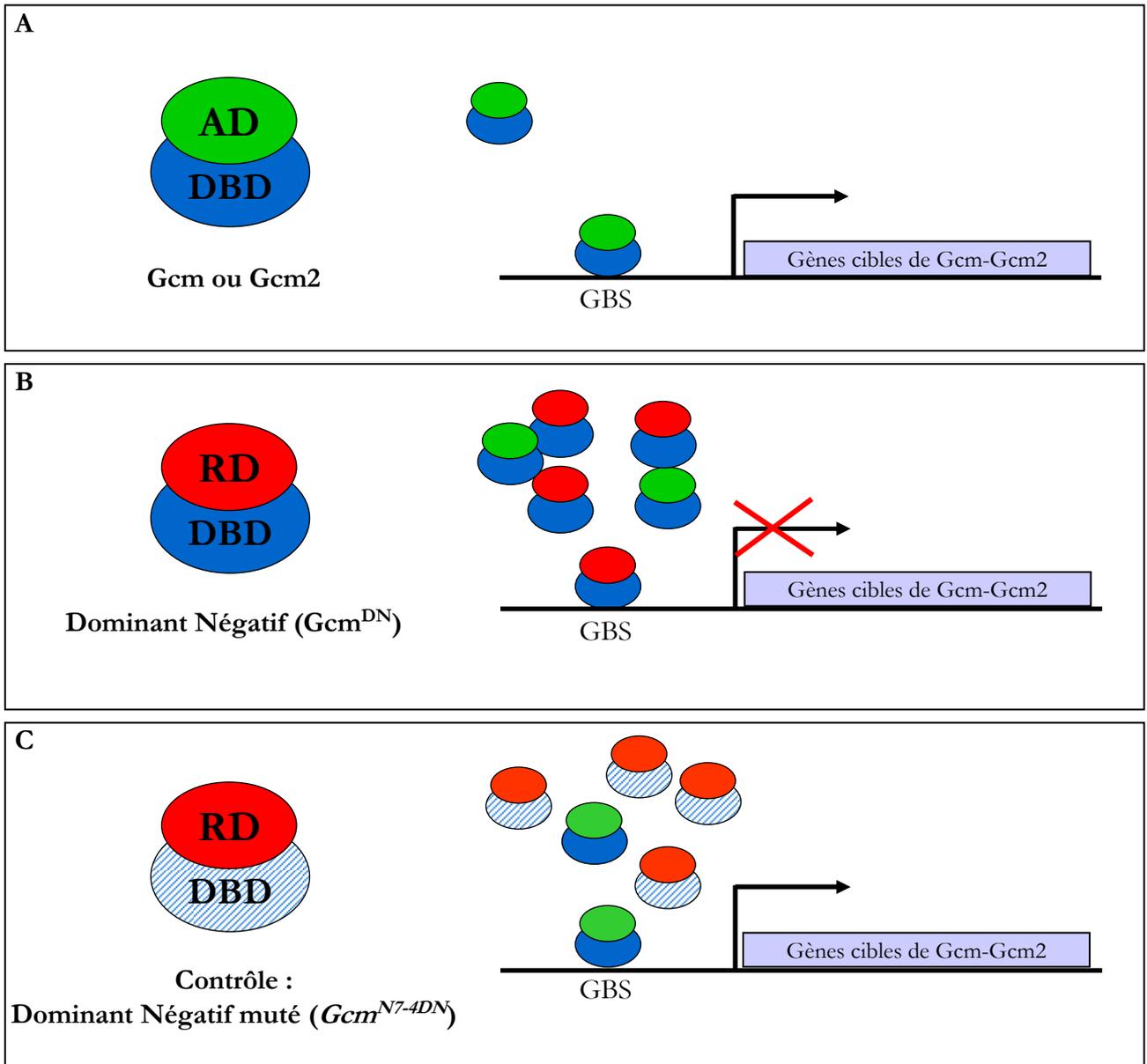


Figure 29. Principe du dominant négatif Gcm. (A) Gcm et Gcm2 sont constitués d'un domaine activateur (AD) et d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD). En conditions sauvages, Gcm et Gcm2 se fixent sur leur séquence cible GBS afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles. (B) Le dominant négatif Gcm (Gcm^{DN}) est constitué du DBD Gcm et du domaine répresseur d'Engrailed. Lorsque gcm^{DN} est exprimé dans les cellules Gcm, il rentre en compétition avec les protéines Gcm et Gcm2 endogènes et réprime l'expression des gènes cibles de Gcm-Gcm2 lorsqu'il se fixe aux séquences GBS. (C) Le dominant négatif muté Gcm (Gcm^{N7-4DN}) est constitué du DBD Gcm muté et du domaine répresseur (RD) d'Engrailed. Lorsque gcm^{N7-4DN} est exprimé dans les cellules Gcm, il ne peut pas se fixer aux séquences GBS, les gènes cibles de Gcm-Gcm2 sont donc toujours exprimés normalement.

musculaires qui débutent normalement en fin d'embryogenèse. Les cellules tendon des animaux *gcm-gcm2* ne sont donc pas sollicitées comme des cellules tendon d'animaux sauvages. Il est donc possible que le phénotype observé soit sous-estimé car les muscles ne se sont pas contractés comme chez les animaux sauvages. Afin de contrecarrer ces effets dû à l'absence de glie, une construction dominant négatif pour *gcm-gcm2* (*gcm^{DN}*, **Figure 29**) qui permet de réaliser une perte de fonction de *gcm-gcm2* spécifiquement dans les cellules tendon a été utilisée. En effet, cette construction dominant négatif (*gcm^{DN}*) contient le domaine de liaison à l'ADN de Gcm ainsi que le domaine répresseur d'Engrailed. L'utilisation d'une deuxième construction *gcm^{N7-4DN}*, le même dominant négatif mais avec la mutation N7-4 dans le domaine de liaison à l'ADN de Gcm, empêchant ainsi sa fixation à l'ADN, permet de vérifier la spécificité des phénotypes observés avec *gcm^{DN}*. Ces constructions ont été placées sous contrôle des séquences UAS afin de pouvoir contrôler leur expression spatiale. Les embryons exprimant *gcm^{DN}* à l'aide d'une lignée pilote précoce dans les cellules tendon (*patched-Gal4*) présentent des phénotypes similaires aux embryons *gcm-gcm2* mais avec une expressivité plus grande, ce qui valide la spécificité de *gcm^{DN}*. Quelques animaux se développent jusqu'en L2 et présentent des problèmes de locomotion tels que des défauts de coordination et des contractions musculaires anormales. Quant à eux, les animaux exprimant *gcm^{N7-4DN}* dans les mêmes conditions que *gcm^{DN}* ne présentent aucun phénotype et sont viables jusqu'à l'adulte, validant ainsi cette approche.

✓ La différenciation des cellules tendon est anormale

Afin de vérifier l'attachement des muscles avec les cellules tendon chez les embryons *gcm-gcm2*, les sites d'attachement entre les muscles et les cellules tendon ont été analysés en microscopie électronique. De façon intéressante, alors que les embryons sauvages présentent au niveau de ces jonctions un matériel dense aux électrons, caractéristique de la différenciation terminale des cellules tendon, celui-ci est absent chez les embryons *gcm-gcm2*. De plus, les

interdigitations normalement observées entre les muscles et les cellules tendon sont absentes en perte de fonction *gcm-gcm2*. Ces résultats montrent donc que *gcm* et *gcm2* sont nécessaires pour que la différenciation terminale des cellules tendon s'effectue correctement.

✓ Epistasie entre *gcm-gcm2* et la voie de signalisation induite par *stripe*

stripe b a été mis en évidence jusqu'à présent comme étant capable d'induire l'expression des gènes spécifiques des cellules tendon (Becker et al., 1997 ; Vorbruggen et Jackle, 1997 ; Nabel-Rosen et al., 1999). Dans le but de vérifier si *stripe b* est également capable d'induire *gcm* et *gcm2*, des expériences d'expression ectopique de *stripe b* dans l'épiderme ont été réalisées. De façon surprenante, l'expression ectopique de *stripe b* n'induit pas l'expression ectopique de *gcm*. *gcm* est donc le premier gène exprimé dans les cellules tendon qui n'est pas induit par *stripe b*. De même, chez les embryons *stripe*, où les deux transcrits *stripe a* et *stripe b* sont absents, *gcm* est toujours exprimé. Afin de clarifier le rôle de *gcm* et de *gcm2* dans les cellules tendon, l'expression de *stripe a* a été analysée chez des embryons *gcm-gcm2*. De cette façon il a été mis en évidence que la perte de fonction de *gcm-gcm2* n'a aucun effet sur l'expression de *stripe a* ni de *stripe b*. Au contraire, l'expression ectopique de *gcm* dans l'épiderme induit l'expression ectopique de *stripe b*, mais pas de *stripe a*. Quant à lui l'expression ectopique de *gcm2* dans l'épiderme n'a aucune incidence sur l'expression de *stripe a* ni de *stripe b*.

De façon intéressante, alors que l'expression ectopique de *stripe b* induit l'expression des gènes marqueurs des cellules tendon, l'expression ectopique de *gcm* n'induit que l'expression ectopique de *stripe b* et de *alien* mais pas les autres gènes spécifiques aux cellules tendon, ce qui peut être dû à un délai de l'expression de *stripe b*. De façon intéressante, l'expression ectopique de *gcm2* dans l'épiderme induit uniquement *alien* mais pas *stripe b*, ce qui signifie que le complexe *gcm-gcm2* est capable d'induire l'expression de gènes des cellules tendon de manière indépendante à *stripe*.

Les gènes dépendants de *stripe* (*shortstop*, *delilah*, $\beta 1$ *tubulin* et *bow*) sont toujours exprimés chez les embryons *gcm-gcm2* suggérant que le complexe *gcm* induit l'expression de gènes non connus dans les cellules tendon. Dans le but d'identifier de nouveaux gènes dépendants de *gcm-gcm2* dans les cellules tendon, des gènes cibles putatifs de *gcm* dans la glie, identifiés au cours des cribles puce à ADN (Egger et al., 2002 ; Freeman et al., 2003) et présentant une expression segmentée dans l'épiderme ont été analysés. Ceci a permis d'identifier une nouvelle cible de Gcm-Gcm2 dans les cellules tendon : *Equilibrative nucleoside transporter 2* (*Ent2*). En effet, l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* dans l'épiderme induit l'expression ectopique de *Ent2* alors que les embryons *gcm-gcm2* n'expriment pas *Ent2*. Le complexe *gcm* est donc nécessaire et suffisant pour induire l'expression de *Ent2*. Au contraire, *stripe b* n'entraîne pas l'expression ectopique de *Ent2*, contrairement aux gènes connus jusqu'à lors dans les cellules tendon. Le complexe *gcm* induit donc une voie de signalisation dans les cellules tendon, indépendante de *stripe*.

✓ **L'expression de *gcm* dans les cellules tendon est dépendante des informations de position dans le segment**

Afin de déterminer la régulation de l'expression des gènes *gcm-gcm2* dans l'épiderme, leur expression a été analysée chez des embryons dépourvus de mésoderme. *gcm-gcm2* sont toujours exprimés dans ces embryons ce qui signifie que leur expression est indépendante des muscles. Par ailleurs, l'analyse de mutants de gènes de polarité segmentaire, comme *patched*, *wingless*, *naked* et *lines*, a permis de mettre en évidence que l'expression de *gcm-gcm2* est dépendante des informations de position qui donnent l'identité « cellule tendon » à l'intérieur du segment ; de la même façon que *stripe* (Volk et VijayRaghavan, 1994).

✓ Mode d'action de *gcm* dans l'épiderme

gcm est le déterminant glial chez l'embryon et peut induire de la glie ectopique à l'extérieur du territoire neural (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996 ; Akiyama-Oda et al., 1998 ; Bernardoni et al., 1998 ; Kammerer et Giangrande, 2001 ; Alfonso et Jones, 2002). L'analyse de l'expression ectopique de *gcm* dans l'épiderme a permis de mettre en évidence que dans la partie antérieure de chaque segment, *gcm* est capable d'induire le marqueur pan glial Repo (Xiong et al., 1994 ; Halter et al., 1995) mais pas Stripe, alors que l'expression ectopique de *gcm* dans la partie postérieure de chaque segment induit l'expression ectopique de Repo ou de Stripe. De façon intéressante, Repo est exprimé préférentiellement dans la région médio/ventrale alors que Stripe est exprimé préférentiellement dorsalement. Tout ceci suggère la présence d'informations de position le long des axes antéropostérieur et dorsoventral dictant la reconnaissance de Gcm pour des cibles spécifiques (cellule tendon versus glie). De façon intéressante, alors que *gcm2* n'induit pas l'expression de *stripe*, son expression ectopique induit Repo, quelque soit la position dans le segment. Les gènes sélecteurs qui informent sur les informations de position n'agissent donc pas directement sur *gcm*. De plus, ces résultats suggèrent la présence de cofacteurs de Gcm cellules spécifiques, et il peut être supposé que Gcm et ces cofacteurs spécifiques se fixent à des gènes cibles spécifiques.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex

Laurent SOUSTELLE, Cécile JACQUES, Benjamin ALTENHEIN, Gerhard M. TECHNAU, Talila VOLK and Angela GIANGRANDE

Development, 2004, vol. 131, 4521-4532

Pages 68- ... :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1242/dev.01290>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Film disponible sur le CD joint au manuscrit.



Movie 1. Tendon cell-specific inhibition of glide complex activity induces locomotion defects. Note that the *ptc::glide^{DN}* larva (right movie) is sluggish, tends to make turns, shows abnormal muscle contractions and displays uncoordinated movements compared with the control animal (*ptc::glide^{DN7-4}* larva, left movie).

<http://dev.biologists.org/content/vol131/issue18/images/data/4521/DC1/movie1.mpg>

➤ **Résultats complémentaires**

Lors de l'identification du gène cible *Ent2* du complexe *gcm-gcm2* dans les cellules tendon, plusieurs autres gènes ont été testés. Ces gènes ont été identifiés au cours des cribles puce à ADN (Egger et al., 2002 ; Freeman et al., 2003) et présentent une expression segmentée dans l'épiderme. Il s'agit de *ogre*, *dnt*, *ara*, *Lac*, *akap200*, *Dll*, *Sap-r*, *BcDNA:GH03502*, *Cp1*, *CG8054*, *CG32423*, *Ent2*, *drpr* et *CG4576*. L'expression de ces gènes a été comparée en conditions sauvages, gain de fonction pour *gcm* dans l'épiderme et en perte de fonction pour *gcm-gcm2*. Uniquement *Ent2* a été identifié parmi ces gènes analysés comme cible de Gcm dans l'épiderme. Les autres gènes sont donc des cibles spécifiques à la glie, suggérant l'absence, dans les cellules tendon, de cofacteurs spécifiques qui sont nécessaires à leur expression. Depuis ces travaux, un autre crible a été réalisé dans le but d'identifier les gènes cibles de Gcm dans le système nerveux (Altenhein et al., 2006). Parmi les gènes identifiés, certains sont également exprimés dans les cellules tendon (*Aasts-phe*, *CG10591*, *CG1153*, *CG15015*, *CG7966*, *CG8066* et *Cys*), il serait intéressant de vérifier si ces cibles de Gcm dans la glie sont également des cibles dans les cellules tendon, et dans ce cas, déterminer leur fonction dans la mise en place d'un attachement muscle/cellule tendon fonctionnel.

Chez les vertébrés, les muscles sont attachés aux os via les tendons. Comme chez la drosophile, la matrice extracellulaire (MEC) a un rôle très important dans l'attachement des muscles aux tendons et comprend les mêmes types de composants (Benjamin et Ralphs, 1997 ; Brown, 2000). Les intégrines constituent les composants essentiels des complexes d'adhésion à la surface cellulaire liant la MEC au cytosquelette (Burrige et Chrzanowska-Wodnicka, 1996 ; Chiquet et al., 1996). Au niveau de la jonction myotendineuse, la perte de fonction des intégrines conduit à des dommages structuraux durant la contraction musculaire (Mayer et al., 1997). En plus des intégrines, le complexe Dystrophin joue un rôle important dans la mécanotransduction

ARNm dystrophin

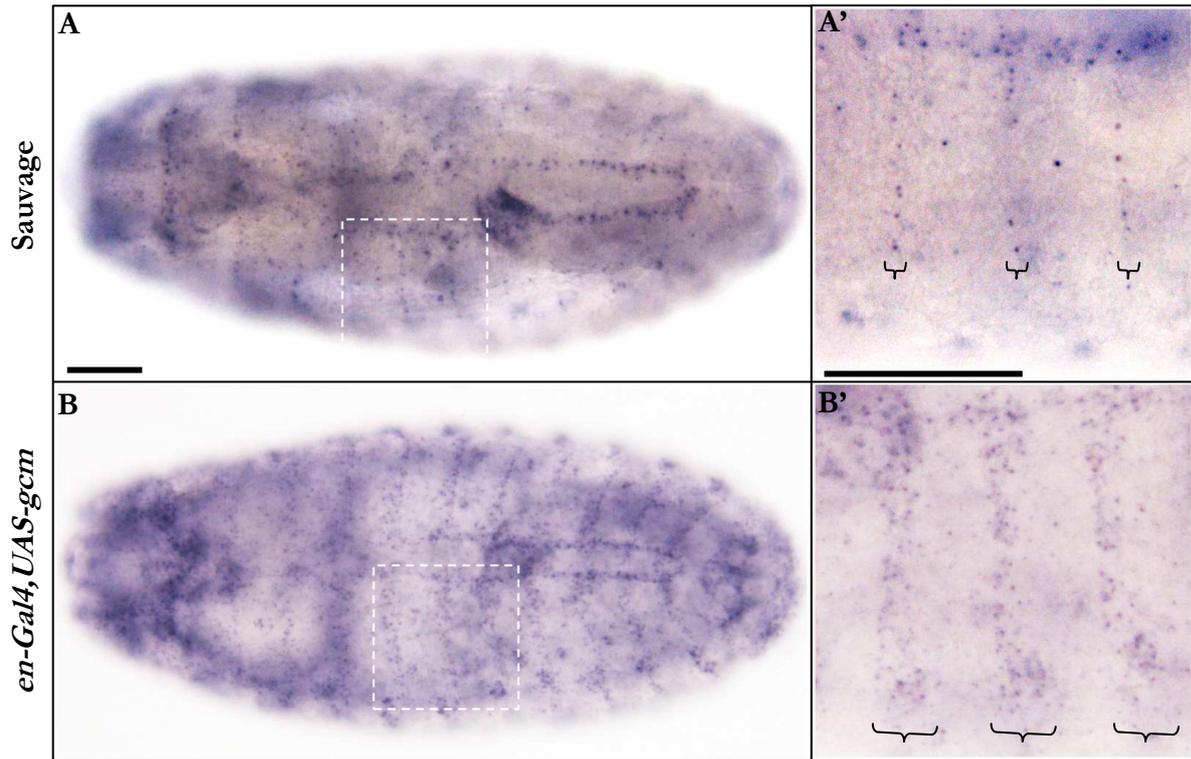


Figure 30. *gcm* est suffisant pour induire le gène *dystrophin* dans les cellules tendon de l'embryon. Hybridation *in situ* pour l'ARNm de *dystrophin* sur des embryons sauvage (A-A') et exprimant ectopiquement *gcm* dans l'épiderme (*en-Gal4,UAS-gcm*, B-B'). Les embryons, au stade 15, sont en vue dorsale, le coté antérieur à gauche. Les encarts en A,B sont agrandis en A',B'. L'expression ectopique de *gcm* dans l'épiderme induit l'expression ectopique de *dystrophin* (accolades). Barres d'échelle 50 μ m.

entre le muscle et le tendon (Burkin et al., 2001 ; Ilsley et al., 2001 ; Chockalingam et al., 2002). Chez les souris sauvages, les jonctions myotendineuses sont caractérisées par des interdigitations qui servent à augmenter la superficie de l'attachement entre la fibre musculaire et le tissu connectif du tendon et qui jouent un rôle important dans la transmission de la force entre le muscle et le tendon. Par contre, chez les souris doublement déficientes pour la *dystrophin* et *utrophin*, les jonctions myotendineuses présentent une réduction de ces interdigitations (Deconinck et al., 1997). Ce phénotype observé au niveau jonctions myotendineuses des souris doublement déficientes pour la *dystrophin* et *utrophin* est similaire à celui présent au niveau jonctions hémiadhérentes entre les cellules tendon et les muscles des embryons *gcm-gcm2*. La présence d'un orthologue au gène *dystrophin* chez la drosophile, nommé également *dystrophin*, et qui code pour plusieurs isoformes dont une exprimée au niveau des sites d'attachement musculaire (Neuman et al., 2001 ; Dekkers et al., 2004) soulève l'hypothèse de son implication dans la différenciation terminale des cellules tendon et suggère une implication de *gcm-gcm2* dans la régulation de son expression. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences d'hybridation *in situ* pour l'ARNm de *dystrophin* sur des embryons sauvages et exprimant ectopiquement *gcm* dans l'épiderme ont été réalisées (Figure 30). Ces expériences montrent que le gène *dystrophin* est exprimé faiblement au niveau des sites d'attachement musculaire et que l'expression ectopique de *gcm* dans l'épiderme est suffisante pour induire son expression. La même expérience a été réalisée sur des embryons *gcm-gcm2*, cependant étant donné la faiblesse du signal obtenu chez les embryons sauvages, l'absence de signal chez les embryons *gcm-gcm2* ne permet pas de conclure sur la nécessité de *gcm-gcm2* pour induire l'expression de *dystrophin* dans les cellules tendon. Un anticorps anti-Dystrophin, permettant de reconnaître la plupart des isoformes (dont celle exprimée dans les cellules tendon) (van der Plas et al., 2006), est disponible dans le laboratoire du Dr Noodermeer. Cet outil pourrait nous permettre de savoir si l'isoforme spécifique des cellules tendon est toujours exprimée, ou non, chez les animaux *gcm-gcm2*. Il peut cependant être supposé que les phénotypes observés en perte de fonction *gcm-gcm2* sont partiellement dus à une perte de

dystrophin. Cette hypothèse peut être vérifiée en exprimant le gène de la *dystrophin* dans les cellules tendon des embryons *gcm-gcm2*. Si le phénotype est sauvé, ou du moins partiellement, cela indiquera que la *dystrophin* est en aval de *gcm-gcm2* et que le complexe *gcm-gcm2* est nécessaire à son expression et expliquera ainsi le phénotype observé au niveau des jonctions hémiadhérentes.

Durant cette étude, il a été mis en évidence que *gcm* est capable d'induire des marqueurs de glie et de cellules tendon dans différentes cellules, indiquant que la spécificité de Gcm dépend de la présence de cofacteurs spécifiques. La suite de mon projet de thèse consista, entre autres, à identifier les cofacteurs de Gcm à l'aide d'un crible double hybride.

Le système nerveux de la drosophile est composé de différents types de neurones et de cellules gliales. Les territoires neurogéniques sont définis par des gènes sélecteurs qui ont pour rôle d'informer les cellules de leur position au cours de l'embryogenèse et de préciser leur positionnement définitif dans l'embryon au cours de la formation des tissus par rapport aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Ensuite interviennent les mécanismes moléculaires fondamentaux de la spécification au niveau cellulaire, mais ceux-ci sont mal compris. Au niveau neuronal, ce sont les gènes proneuraux qui sont responsables à la fois de la différenciation et de la spécification des sous types de neurones. Leur absence entraîne la disparition des sous populations neuronales (Skeath, 1999). Au niveau de la glie, la différenciation des cellules gliales est initiée par *gcm*, cependant est-ce que les mécanismes de spécification font également intervenir *gcm*? Si oui, comment un seul gène peut contribuer à la spécification de plusieurs types cellulaires?

Une première évidence pour l'existence de facteurs cellulaires spécifiques impliqués dans la différenciation de sous populations gliales est venue de l'observation du lignage NGB1-1A qui exprime spécifiquement le facteur Hucklebein (Hkb). En effet, dans un embryon sauvage, le NGB1-1A produit trois cellules gliales de type subpérineurale (SPG) ainsi que six à huit neurones. Or, dans un mutant *hkb*, les cellules gliales issues du NGB1-1A sont absentes au profit de neurones surnuméraires (Bossing et al., 1996a), phénotype identique à celui observé en perte de fonction pour *gcm*. Ceci suggère que Hkb et Gcm sont impliqués dans la même voie dans le NGB1-1A, conduisant à l'utilisation de ce lignage comme modèle afin de comprendre les bases de la spécification gliale et le rôle du déterminant dans la spécification gliale.

Les travaux d'une étudiante en thèse dans notre laboratoire, Rossana De Iaco, mettent en évidence que la spécification du lignage NGB1-1A est déclenchée par l'autorégulation positive de *gcm* dirigée par l'interaction Gcm/Hkb. Ces travaux, auxquels j'ai participé, ont fait l'objet d'une publication présentée ici.

Résumé de la publication :

✓ Hkb est nécessaire pour l'expression de *gcm* dans le lignage NGB1-1A

L'analyse du profil d'expression de *hkb* a mis en évidence que l'ARNm de *hkb* colocalise avec l'ARNm de *gcm* dans le NGB1-1A quand la gliogenèse débute dans ce lignage (stade 11), donc avant la spécification de la glie en glie de type SPG. Chez les embryons *hkb*, le niveau d'expression de *gcm* dans le NGB1-1A est considérablement réduit alors que son expression n'est pas affectée dans le reste de l'embryon. Au contraire, l'expression de *hkb* n'est pas affectée en l'absence de *gcm*. Il a également été montré que l'expression de *gcm* dirigée par les 2 kilobases (kb) en amont de *gcm* (promoteur 2 kb-*gcm*) (Ragone et al., 2003) est suffisante pour sauver la différenciation de la glie issue du lignage NGB1-1A. Cependant, chez les embryons perte de fonction pour *hkb* et *gcm*, le promoteur 2kb-*gcm* ne parvient pas à sauver l'expression de *gcm* dans le NGB1-1A. L'expression de *gcm* dans le NGB1-1A nécessite donc Hkb.

✓ Hkb n'active pas directement la transcription de *gcm*

Bien que Hkb ait été décrit comme un facteur de transcription putatif, aucune transcription n'est induite quand Hkb se fixe au niveau de ses sites spécifiques, les HBS (Huckebein Binding Sites), présents dans le promoteur 2 kb-*gcm*. En effet, nous avons montré que Hkb ne contient finalement pas de domaine activateur de la transcription contrairement aux descriptions précédentes. Il a été mis en évidence que le promoteur 2 kb-*gcm* possède quatre HBS où Hkb est capable de se fixer sans induire l'expression d'un gène rapporteur situé en aval. Chez l'embryon, l'expression de *gcm* dirigée par une construction contenant le promoteur 2 kb-*gcm* avec les sites HBS mutés, permet de sauver le lignage du NGB1-1A en contexte *gcm*, indiquant que Hkb n'agit pas comme un facteur de transcription pour activer la transcription de *gcm*.

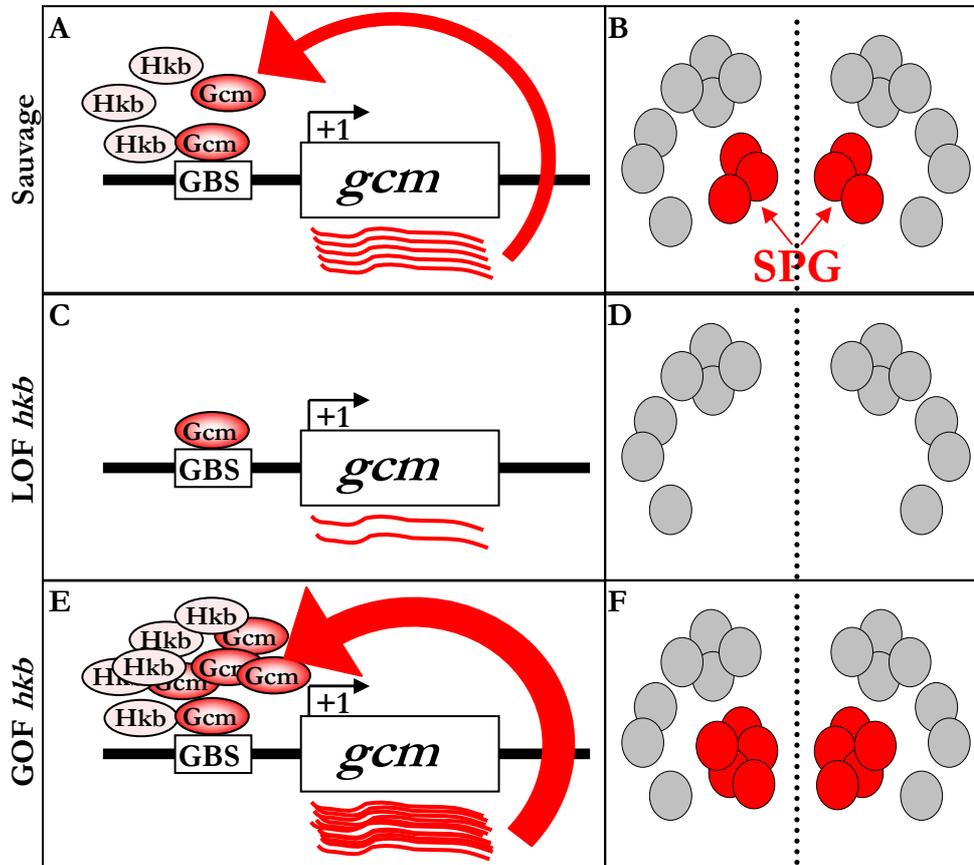
✓ L'interaction Hkb-Gcm contrôle une autorégulation positive de *gcm*

Il a tout d'abord été montré que les protéines Hkb et Gcm interagissent *in vitro*, par GST pull-down. Ayant introduit la technique du double hybride dans le laboratoire, j'ai confirmé cette interaction *in vivo* chez la levure. De façon intéressante, l'interaction Hkb-Gcm augmente l'affinité de Gcm sur son site de fixation à l'ADN (GBS) présent dans le promoteur 2 kb-*gcm*, augmentant ainsi la transcription d'un gène rapporteur situé en aval. Chez l'embryon, l'expression de *gcm* dirigée par une construction contenant le promoteur 2 kb-*gcm* avec le site GBS muté, ne permet pas de sauver le lignage du NGB1-1A en contexte *gcm*, indiquant l'importance de l'autorégulation de *gcm*, dirigée par Hkb, dans la spécification du NGB1-1A.

✓ Hkb amplifie l'expression de *gcm* *in vivo*

L'expression ectopique de *hkb* dans le système nerveux induit des cellules gliales ectopiques, principalement de type SPG (comme celles produites par le NGB1-1A), ainsi qu'une expression ectopique de *gcm*. La double expression ectopique de *gcm* et de *hkb* dans le système nerveux induit une quantité supérieure de cellules gliales, dont du type SPG, que la simple expression ectopique de *hkb*. Cependant, l'expression ectopique de *gcm* induit également des cellules gliales de type SPG, mais en quantité moindre que combinée avec *hkb*.

hkb est donc nécessaire pour soutenir l'expression de *gcm* dans le lignage NGB1-1A et induire la spécification des cellules gliales en type SPG.



D'après Soustelle et Giangrande 2007

Figure 31. *gcm* et la spécification du NGB1-1A. (A,C,E) Schémas représentant l'action de Hkb sur l'autorégulation de Gcm. (B,D,F) Cellules gliales présentes dans un neuromère abdominal, la glie subpérineuriale (SPG) est en rouge, les autres cellules gliales sont en gris. (A,B) Chez un embryon sauvage, l'interaction entre Hkb et Gcm augmente l'affinité de Gcm pour son site de fixation à l'ADN (A), entraînant la formation de six cellules SPG par neuromère (B). (C,D) En absence de Hkb, l'expression de Gcm diminue (C) ce qui entraîne l'absence de SPG (D). (E,F) La surexpression de Hkb est suffisante pour induire le destin SPG (F) à cause d'une augmentation d'une autorégulation de Gcm dépendante de Hkb (flèche, E).

Durant cette étude, il a été mis en évidence que l'interaction Hkb-Gcm permet la maintenance de l'expression de Gcm à des niveaux élevés, ce qui conduit au destin « SPG » (**Figure 31**). Hkb fournit un lien moléculaire entre le rôle général de *gcm* qui induit la différenciation de la glie latérale de l'embryon et son rôle dans la spécification de différentes populations gliales. Cette étude est le premier exemple dans le système nerveux de spécification cellulaire dirigée par un déterminant via sa régulation quantitative. De plus, cette étude est en conformité avec les observations précédentes qui prouvaient que l'autorégulation de *gcm* nécessite des cofacteurs cellulaires spécifiques (Miller et al., 1998 ; Ragone et al., 2003). Il serait intéressant à présent de déterminer si le couple Hkb-Gcm agit également sur des gènes cibles spécifiques impliquées dans la différenciation des SPGs.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Huckebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification

Rossana DE IACO, Laurent SOUSTELLE, Martial KAMMERER, Sandro SORRENTINO,
Cécile JACQUES and Angela GIANGRANDE

The EMBO Journal, 2006, vol. 25, pages 244–254

Pages 75- ... :

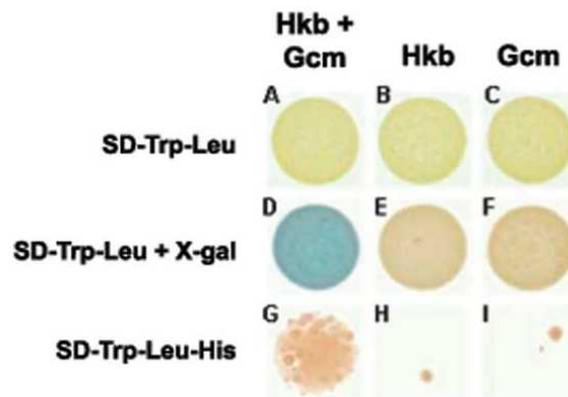
La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600907>

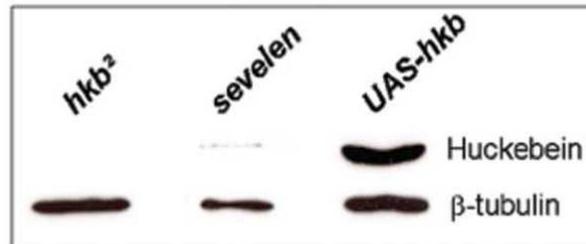
La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>



Sup. 1: Gcm-Hkb interaction by yeast two-hybrid system.

(A-I) Test of Gcm-Huckebein protein interaction using the yeast two-hybrid system based on LexA system. Yeast cells (L40) were co-transfected with pBTM116 plasmid containing the N-terminal part of Gcm (aminoacids 1-263) (pBTM116-Gcm) and pASV4 plasmid containing full length Hkb (pASV4-Hkb). (A-C) Positive controls show yeast growth on plates lacking leucine and tryptophan (SD-trp-Leu): (A) pBTM116-Gcm + pASV4-Hkb, (B) pASV4-Hkb + pBTM116 (empty plasmid carrying Tryptophan encoding gene), (C) pBTM116-Gcm + pASV4 (empty plasmid carrying Leucine encoding gene). (D-F) X-gal assay. Only yeast cotransfected with pBTM116-Gcm and pASV4-Hkb give rise to a blue coloration (D) indicating of Gcm-Hkb interaction. (G-I) Auxotrophy assay on medium lacking Histidine. Only yeast cotransfected with pBTM116-Gcm and pASV4-Hkb grow on selective medium, confirming Gcm-Hkb interaction.



Sup. 2: *hkb*² is a null allele.

Quantitative analysis of Hkb protein levels by Western Blot. Extracts are from *hkb* (*hkb*²), wild-type (Sevelen) or *Scd-GALA,UAS-hkb* (*UAS-hkb*) embryos. Note that Hkb-specific signal is not detected in *hkb* embryos. Anti- β tubulin was used to normalized loading.



Sup. 3: *hkb* overexpression does not affect the first NGB1-1A division.

Ventral views of WT (A) or *hkb* overexpressing embryos (*UAS-hkb* in B) at stage 16. Anti-Even skipped (*eve*) labeling to reveal aCC/pCC neurons (Broadus et al., 1995). A single abdominal segment is shown. Square brackets indicate aCC and pCC neurons. Scale bar: 10 μ m.

Il existe des similitudes entre les cellules gliales des invertébrés et des vertébrés, d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Leur mode de différenciation présente également des analogies, cependant aucun déterminant glial, comme *gcm*, n'a été mis en évidence chez les vertébrés. Dans le but de déterminer si les orthologues de *gcm-gcm2* sont impliqués dans la différenciation gliale chez les vertébrés, nous avons réalisé une collaboration avec le groupe du Professeur Soula (Toulouse), et plus particulièrement le Dr Trousse, qui s'intéresse principalement aux aspects cellulaires et moléculaires de la spécification cellulaire dans le système nerveux central, avec pour principal modèle d'étude l'embryon de poulet.

Résumé de la publication :

✓ *c-Gcm1* est exprimé au cours du développement dans le SNC de poulet

Dans un premier temps, les profils d'expression de *c-GCM1* et *c-GCM2* ont été déterminés au cours du développement par hybridation *in situ*. De façon intéressante, *c-GCM1* est exprimé dès le stade où la ligne primitive est formée (stade 4, E0.8) dans le domaine exprimant *Sox2*, le marqueur précoce des précurseurs neuraux. Dans la suite du développement, le transcrit de *c-GCM1* est détecté à un fort niveau dans la moelle épinière, le long de l'axe rostrocaudal, excepté dans la partie la plus dorsale. Au stade 14 (E2.5), alors que la différenciation neuronale commence, l'expression de *c-GCM1* augmente considérablement dans les cellules correspondant aux neurones nouvellement formés. Finalement, avant l'apparition des précurseurs gliaux (stade 17, E3), l'ARN de *c-GCM1* n'est plus détecté, ce qui sous-entend l'absence d'un rôle gliogénique de *c-GCM1* dans la moelle épinière de l'embryon.

Au contraire de *c-GCM1*, l'ARN de *c-GCM2* n'est jamais détecté dans la moelle épinière en développement, quelques soient les stades de développement analysés (stade 9-34, E1-E8).

Cependant, au stade 11 (E1.5), *c-GCM2* est exprimé dans un domaine rostrocaudal restreint du rhombencéphale. Son rôle reste à déterminer.

✓ *c-Gcm1* induit la différenciation neuronale de l'embryon

Afin de déterminer la fonction de *c-GCM1*, un vecteur d'expression contenant ce gène a été électroporé *in ovo* au stade 11 (E1.5) au niveau de la moelle épinière. De façon intéressante, l'expression ectopique de *c-GCM1* réprime, de façon autonome cellulaire, l'expression de *Sox1-3*, marqueurs spécifiques des précurseurs du SNC en prolifération. La suppression de l'expression de *Sox1-3* est concomitante avec l'augmentation de l'expression de *NeuroM*, marqueur précoce des neurones post-mitotiques. Afin de confirmer que *c-GCM1* dirige les précurseurs neuraux vers un destin neuronal, la prolifération des précurseurs a été analysée par incorporation au BrdU (BromodéoxyUridine). De cette façon, il a été mis en évidence que le gain de fonction de *c-GCM1* induit une sortie des précurseurs du cycle cellulaire. L'analyse de l'expression de *Pax6-7*, gènes exprimés dans les précurseurs dorsaux et intermédiaires de la zone ventriculaire, montre que l'expression ectopique de *c-GCM1* supprime l'expression de *Pax6-7*. L'induction de *NeuroM* par *c-GCM1* est donc liée à une réduction de la prolifération dans la moelle épinière ainsi qu'à une perte de l'état précurseur.

Chez les vertébrés, la neurogenèse est dirigée par des facteurs de transcription de type bHLH, comme la Neurogenin2 (*Ngn2*), qui dirigent les précurseurs neuraux hors du cycle cellulaire en réprimant l'expression de *Sox1-3* et entraînent la différenciation neuronale en induisant l'expression de *NeuroM* et de *NeuroD*, pour revue voir [Bertrand et al., 2002](#). L'expression ectopique de *Ngn2* induit l'expression ectopique de *c-GCM1*, alors que l'expression ectopique de *c-GCM1* n'induit pas celle de *Ngn2*, indiquant que *c-GCM1* est placé en aval des gènes proneuraux et en amont des gènes de différenciation neuronale.

De façon intéressante, l'analyse de marqueurs pan-neuronaux, comme Tuj1 et HuC/D, et du marqueur d'interneurones Lim1/2, montre que l'expression ectopique de *ε-GCM1* induit l'expression de ces marqueurs et donc de surcroît le programme de différenciation neuronale jusqu'à des stades tardifs.

En conditions sauvages, les précurseurs neuronaux, nés dans la zone ventriculaire de la moelle épinière, arrêtent de proliférer dès leur sortie de cette zone et migrent sur des longues distances pour atteindre leur cible finale où ils achèvent leur différenciation et expriment les marqueurs de différenciation neuronale. L'expression ectopique de *ε-GCM1* entraîne la différenciation prématurée des précurseurs neuronaux, car ceux-ci expriment les marqueurs de différenciation avant d'avoir achevé leur migration.

✓ *c-Gcm1* n'induit pas de différenciation gliale chez l'embryon

Chez les vertébrés, le développement du système nerveux embryonnaire se déroule selon deux phases : une première phase de neurogenèse puis une phase de gliogenèse, pour revue voir [Bertrand et al., 2002](#). Afin de déterminer si *ε-GCM1* induit également de la glie dans la moelle épinière, l'expression du marqueur d'astrocytes, Glast, et du marqueur d'oligodendrocytes, O4, a été analysée en gain de fonction pour *ε-GCM1*. En condition sauvage, l'expression de ces marqueurs débute à partir du stade 26-29 (E5-E6), stades correspondant à l'initiation de la gliogenèse chez le poulet. Lorsque *ε-GCM1* est exprimé ectopiquement lors de la phase de neurogenèse, aucune expression ectopique des marqueurs gliaux n'est observée. De même, lorsque *ε-GCM1* est exprimé ectopiquement plus tardivement au cours du développement, c'est-à-dire durant la phase de gliogenèse, aucune gliogenèse prématurée ni d'expression ectopique des marqueurs gliaux n'ont pu être mises en évidence. Par contre, à ce stade du développement, l'expression ectopique de *ε-GCM1* induit une réduction de l'expression des marqueurs gliaux et

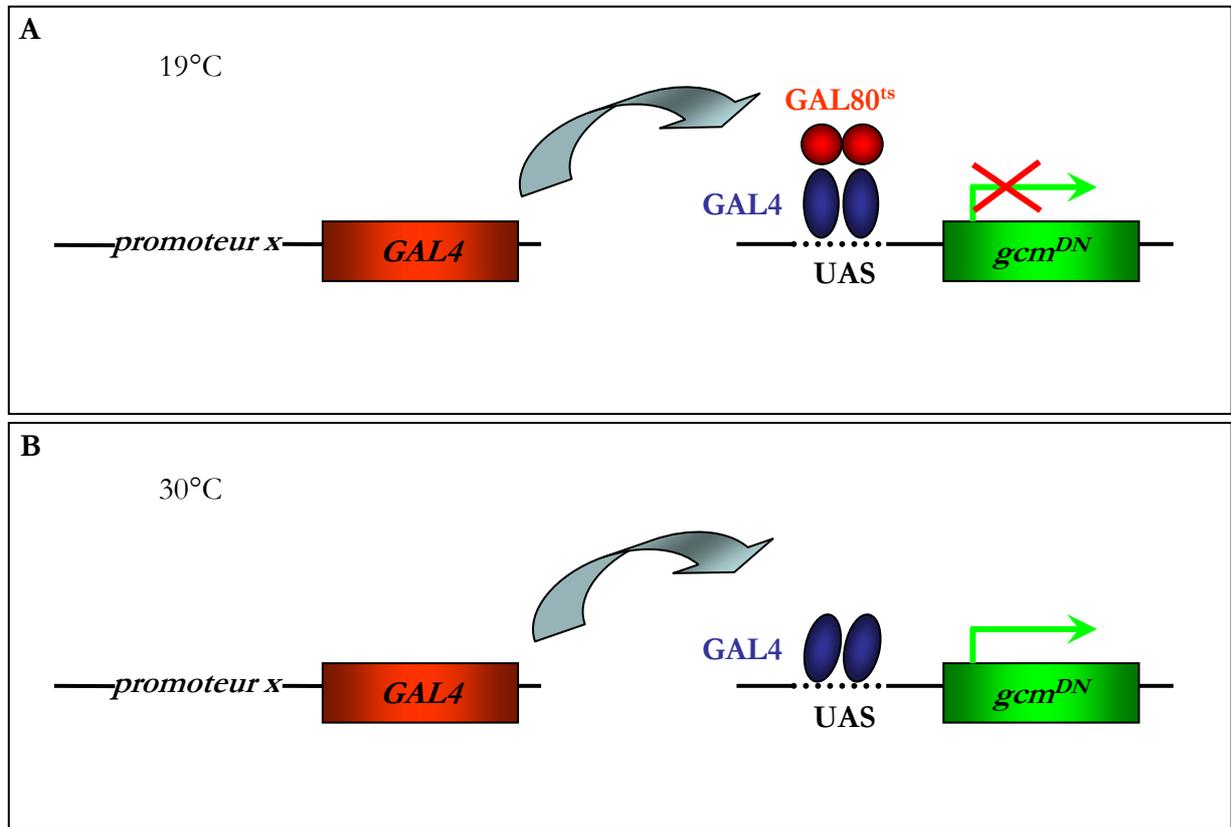
une expression ectopique des marqueurs neuronaux. L'expression ectopique de *c-GCM1* induit donc de la neurogenèse à tous les stades du développement de la moelle épinière.

✓ La perte de fonction de *c-Gcm1* empêche la différenciation neuronale

Afin de réaliser des expériences de perte de fonction pour *c-GCM1*, une construction dominant négatif pour *c-GCM1*, *c-GCM1DB-ER*, a été réalisée de la même façon que le dominant négatif *Gcm* de drosophile. Elle consiste en une fusion du domaine de liaison à l'ADN de *c-GCM1* avec le domaine répresseur du facteur de transcription *Engrailed* (ER, pour *Engrailed Repressor*) de drosophile. Cette technique, avec l'utilisation du domaine ER, est couramment utilisée chez tous les modèles d'études animaux (xénope, drosophile et vertébrés) ainsi que chez les plantes (Markel et al., 2002). L'électroporation de cette construction induit une diminution du nombre de cellules exprimant *Tuj1*, *Lim1/2*, *Mnr2*, un marqueur des motoneurones, et *NeuroM*. *c-GCM1* est donc requis pour induire l'expression des gènes de différenciation neuronale.

Des expériences d'incorporation au BrdU en contexte perte de fonction pour *c-GCM1*, montrent que la prolifération des précurseurs reste inchangée, indiquant que *c-GCM1* n'affecte pas la proportion de cellules en phase S. De même, l'expression de *Sox1-3* et de *Pax6-7* n'est pas modifiée en perte de fonction pour *c-GCM1*. Ces résultats montrent que la perte de fonction de *c-GCM1* prévient l'expression des gènes de différenciation neuronale mais n'empêche pas la sortie du cycle cellulaire et n'affecte pas non plus l'identité des précurseurs.

La coexpression de *c-GCM1* avec *c-GCM1DB-ER* sauve la perte des neurones induite par *c-GCM1DB-ER* seul, confirmant ainsi la spécificité du phénotype et validant l'approche dominant négatif.



Adapté de McGuire et al. 2003

Figure 32. Système TARGET couplé au système UAS-Gal4. Dans ce système, une protéine Gal80 thermosensible (Gal80^{ts}) est exprimée ubiquitairement. *Gal4* est exprimé selon le profil d'expression d'un gène « *x* » choisi et se fixe à ses séquences cibles UAS. La protéine Gal80^{ts} est active à 19°C où elle réprime l'activité transcriptionnelle de Gal4 et empêche donc l'expression du dominant négatif (*gcm^{DN}*). Par contre, à 30°C, la protéine Gal80^{ts} devient inactive permettant à Gal4 d'activer l'expression de *gcm^{DN}*.

✓ **Chez la drosophile, *gcm* et *gcm2* ont également un potentiel neurogénique aux stades post-embryonnaires.**

Le développement du système nerveux post-embryonnaire de la drosophile et embryonnaire des vertébrés présentent des similitudes, telle l'absence de précurseurs mixtes (neuronal-glia), contrairement à ce qui est observé chez la plupart des lignages embryonnaires de la drosophile. Afin de déterminer leur potentiel gliogénique et/ou neurogénique aux stades post-embryonnaires, des expériences de gain de fonction pour *gcm* ou *gcm2*, à l'aide du système UAS-Gal4 couplé au système TARGET (Figure 32) ont été réalisées. De cette façon, il a été mis en évidence que l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* induit de la glie ectopique dans les régions en prolifération du SNC. *gcm* et *gcm2* sont également capables d'induire l'expression du marqueur glial Repo dans les disques imaginaux. De façon intéressante, de nombreuses cellules, exprimant le marqueur neuronal Elav et le marqueur d'interneurones Acj6, sont induites dans les disques imaginaux, mais pas dans le SNC, indiquant que *gcm* et *gcm2* sont également capables d'induire le destin neuronal à un stade post-embryonnaire. Dans les disques imaginaux, les cellules qui expriment le marqueur glial Repo sont différentes de celles qui expriment le marqueur neuronal Elav. *gcm* et *gcm2* sont donc capables d'induire de la différenciation neuronale et aussi bien de la différenciation gliale aux stades post-embryonnaires.

✓ ***gcm* et *gcm2* sont exprimés et requis dans des lignages neuronaux du cerveau de larve**

L'analyse détaillée du profil d'expression de *gcm* et de *gcm2* dans le cerveau de larve a permis de mettre en évidence que ces deux gènes sont également coexprimés dans deux groupes de cellules, un dorsal et un médian, dans chaque hémisphère cérébral : les cbcs (pour central brain clusters). Des expériences d'immunomarquage et d'hybridation *in situ* ont montré que ces groupes de cellules contiennent une quarantaine de neurones qui persistent jusqu'à l'adulte. De façon

intéressante, l'expression de *gcm-gcm2* a été détectée dans une cellule mitotique mais également dans les neurones post-mitotiques cbc. Les neurones cbc ont donc pour origine des précurseurs neuronaux purs, ce qui montre que le rôle neurogénique des gènes *gcm* n'est pas restreint au poulet. La perte de fonction de *gcm-gcm2* dans les neurones cbc induite par *gcm^{DN}* couplé au système TARGET, induit la disparition des neurones cbc. *gcm-gcm2* sont donc nécessaires pour la différenciation neuronale de cette population dans le cerveau de larve. De façon intéressante, ce phénotype est observé avec une seule dose de *gcm^{DN}*, alors que deux doses de *gcm^{DN}* sont nécessaires pour obtenir des phénotypes perte de fonction dans les lobes optiques, suggérant ainsi que la voie Gcm n'agit pas dans les mêmes conditions dans ces différentes populations.

Au cours cette étude, notre équipe en collaboration avec l'équipe du Dr Tabata (Tokyo) ainsi que l'équipe du Dr Salecker, avons mis en évidence que les gènes *gcm-gcm2* sont requis dans la glie mais aussi dans une population neuronale du système visuel larvaire (Chotard et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Soustelle et al., 2007). En effet, *gcm* et *gcm2* sont coexprimés dans les GPCs et les LPCs, cellules produisant respectivement la glie et les neurones de la lamina (Selleck et Steller, 1991). En l'absence des deux gènes, la glie et les neurones de la lamina ne sont pas produits indiquant que *gcm* et *gcm2* sont requis pour la différenciation gliale et neuronale dans le système nerveux post-embryonnaire. Ces études récentes confirment donc la validité de nos résultats.

✓ Les gènes *gcm* de drosophile, poulet et souris induisent des marqueurs neuronaux et gliaux dans les cellules HeLa

Chez la souris, ni le rôle ni l'expression des gènes *GCM* a été clairement établi dans le système nerveux (voir INTRODUCTION p58-61). Cependant, *m-GCM1* est capable de sauver le phénotype chez des embryons de drosophile mutants pour *gcm* (Kim et al., 1998). Le rôle

gliogénique est donc conservé entre *m-GCM1* et les gènes *gcm* de drosophile. Afin de comparer le potentiel neurogénique de ces gènes dans un contexte cellulaire, j'ai transfecté des cellules HeLa, lignée cellulaire humaine d'origine épithéliale, avec *gcm*, *c-GCM1* ou *m-GCM1*. De façon intéressante, ces trois gènes *gcm* sont capables d'induire le marqueur neuronal Tuj1 dans près de la moitié des cellules transfectées.

m-GCM1 étant capable d'induire l'expression de marqueurs astrocytaires dans des fibroblastes en culture (Iwasaki et al., 2003), j'ai également testé si les gènes *gcm* induisent ce type de marqueurs dans les cellules HeLa. De façon intéressante, l'expression des différents gènes *gcm* induit l'expression du marqueur astrocytaire GFAP dans deux tiers des cellules transfectées, mais pas S100. A la vue de ces résultats, j'ai donc déterminé le pourcentage de cellules qui coexpriment les deux marqueurs par un coimmunomarquage Tuj1/GFAP. De façon surprenante, la majorité des cellules coexpriment ces deux marqueurs. A l'opposé, les gènes *gcm* ne sont pas capables d'induire l'expression du marqueur des précurseurs d'oligodendrocytes O4, ce qui signifie que l'expression de Tuj1 et de GFAP n'est pas dû à une augmentation générale non spécifique de l'expression de gènes.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Neurogenic role of Gcm transcription factors is conserved in chicken spinal cord

Laurent SOUSTELLE, Françoise TROUSSE, Cécile JACQUES, Julian CERON, Philippe COCHARD, Cathy SOULA and Angela GIANGRANDE

Development, 2007, vol. 134, pages 625-634

Pages 82- ... :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1242/dev.02750>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

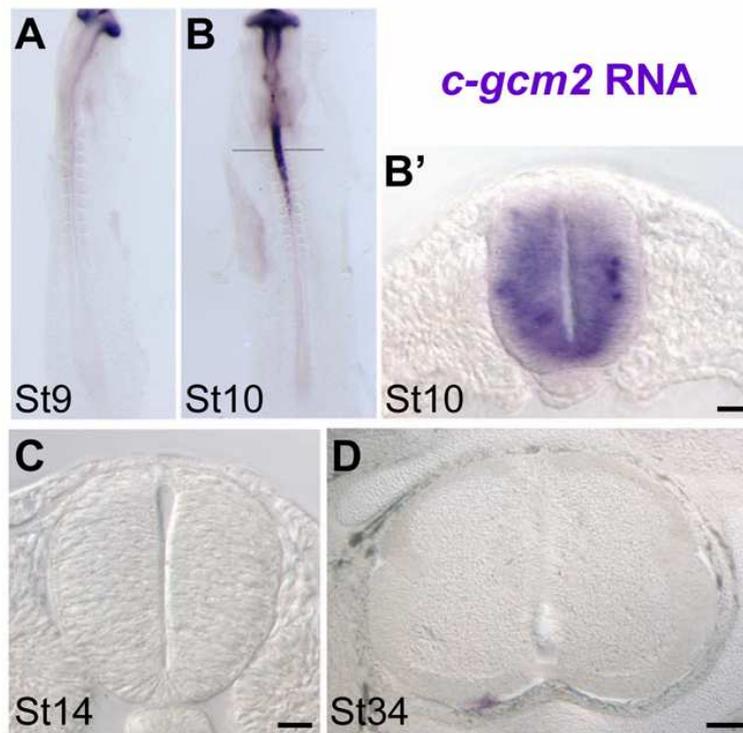


Fig. S1. Expression of *c-Gcm2* in developing chicken embryonic central nervous system.

c-Gcm2 in situ hybridization on whole chick embryos (**A,B**) and on transverse sections of embryonic spinal cord (**B'-D**). Embryonic developmental stages are indicated in each panel. (A) At stage 9 (E1), *c-gcm2* RNA is not detected in the neural tube. Signal observed in the anterior brain is due to non-specific trapping in the ventricles. (B) From stage 10 (E1.5), *c-gcm2* is expressed in a restricted rostrocaudal domain of the neural tube extending from posterior rhombencephalon to somite 4 corresponding to the presumptive hindbrain area. (B') Transverse section through embryo in B shows *c-gcm2* expression in neural progenitors. (C,D) *c-gcm2* RNA remains undetectable in the developing spinal cord at later stages (E2 in C, E8 in D). Scale bars: 30 μm in B'; 20 μm in C; 80 μm in D.

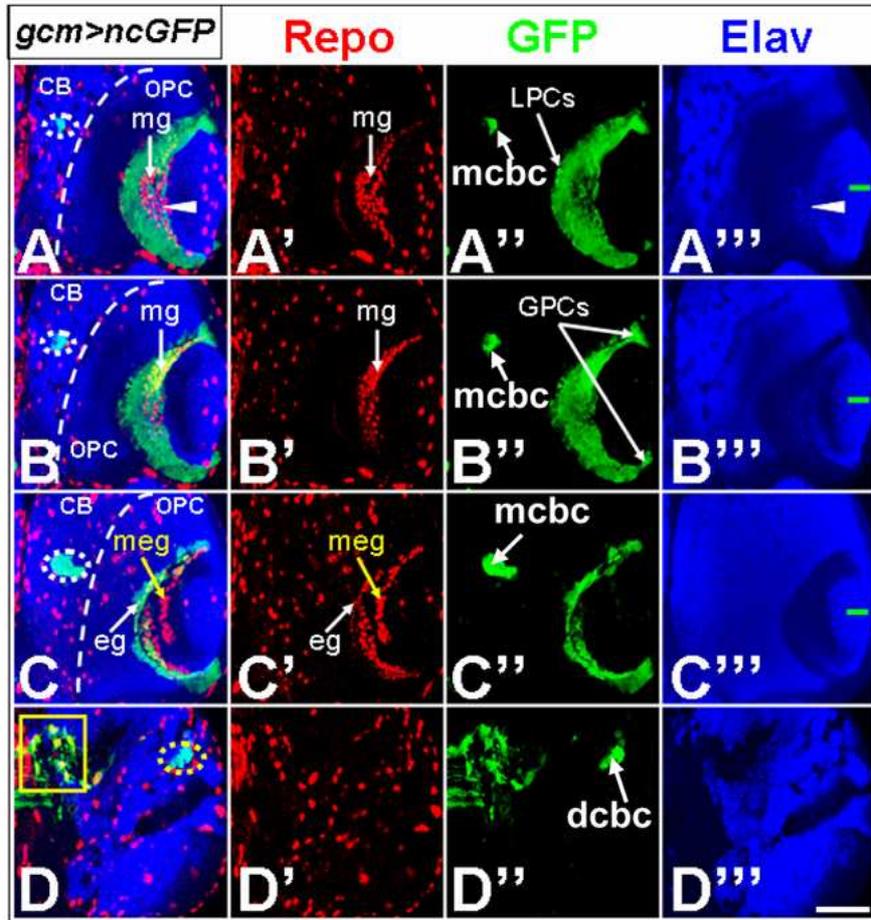


Fig. S2. *gcm* is expressed in glial and neuronal lineages during fly post-embryonic brain development. (A-D''') Confocal images of triple labeling on *gcm-gal4,UAS-ncGFP* (*gcm>ncGFP*) LIII CNS, four non-consecutive lateral to medial partial projections. Anterior is to the left. The dashed line defines the border between outer proliferation center (OPC) and central brain (CB). (A-D) Merge of Repo (red, A',B',C',D'), GFP (green, A'',B'',C'',D'') and Elav (blue, A''',B''',C''',D''') immunolabeling. Green line in A''',B''',C''' indicates dorsoventral midline. In the lamina, GFP labeling is present in epithelial (eg) and marginal (mg) glia as well as in glial precursor cells (GPCs in B'', C'') and lamina precursor cells (LPCs in A'') areas. Note that medulla glia (meg) does not express GFP (yellow arrow in C'). In the lamina, some GFP-positive cells coexpress Elav but not Repo (arrowhead in A',A'''). In addition, GFP is also expressed in two distinct cell clusters in CB (white and yellow dotted areas in A,B,C,D). The medial cluster (mcbc in A'',B'',C'') is shown by the white dotted area in A,B,C (corresponding to cluster detected in Fig.7A-B); the dorsolateral cluster (dcbc in D'') is shown by the yellow dotted area in D. These cell clusters are Elav-positive but not Repo-positive. Yellow rectangle in D shows glia at the interhemispheric junction. Scale bar: 20 μ m.

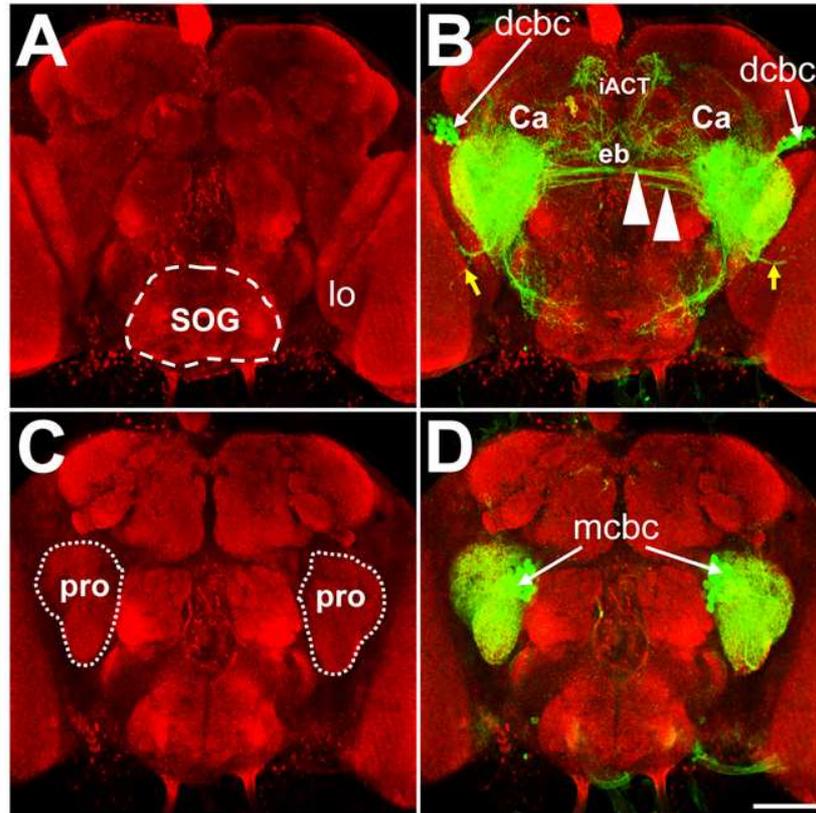


Fig. S3. Axonal pattern of *gcm-gcm2*-positive neurons in fly adult brain. (A-D) Highwire (red) and GFP (green in B,D) coimmunolabeling on *gcm-gal4,UAS-mCD8GFP* adult brain. Right panels (B,D) show merge of GFP and Highwire immunolabeling. (A,B) Adult neurons of the dorsolateral clusters (dcbc in B) display a complex pattern of axonal projections. Ventral projections reach the suboesophageal ganglia (SOG, dashed area in A), contralateral projections form several commissures (white arrowheads in B) bridging the two brain hemispheres and extending around the ellipsoid body region (eb in B), while dorsal projections reach the region of the mushroom calyces (Ca in B) and the inner antennocerebral tract (iACT in B). Note that one neuron of each dorsolateral cluster extends one axonal projection within the lobula (lo in A) (indicated by yellow arrows in B). (C,D) Axonal projections of neurons from the medial cluster (mcbc in D) extend only within the protocerebrum neuropile (pro, dotted area in C). Scale bar: 200 μ m.

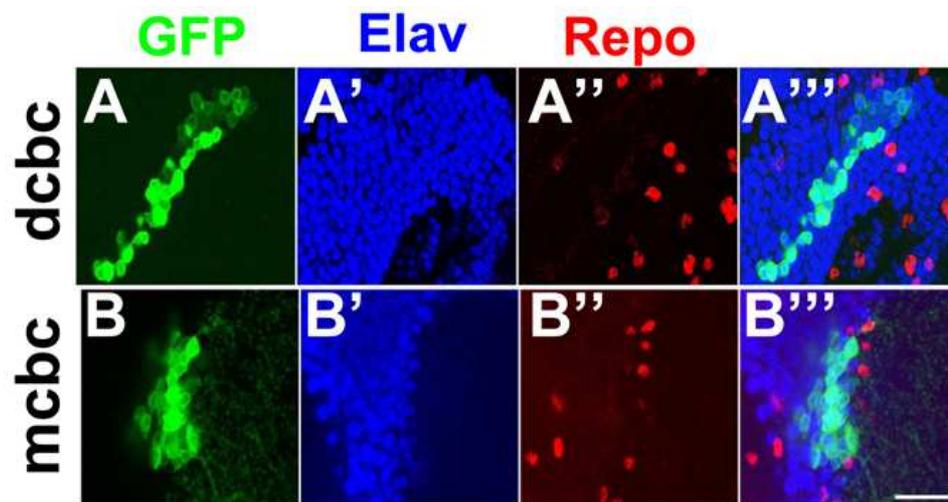


Fig. S4. *gcm-gcm2*-positive adult neurons do not express the glial marker Repo. (A-B''') GFP (green), Elav (blue) and Repo (Red) coimmunolabeling on *gcm-gal4,UAS-mCD8GFP* adult brain. A-A''' and B-B''' show high magnifications of dorsolateral (dcbc) and medial (mcbc) clusters shown in Fig.7C and 7.C', respectively. A'',B'' show merge of GFP (A,B), Elav (A',B') and Repo (A'',B'') immunolabeling, respectively. Note that dcbc and mcbc GFP-positive cells express Elav but not Repo. Scale bar: 200 μ m.

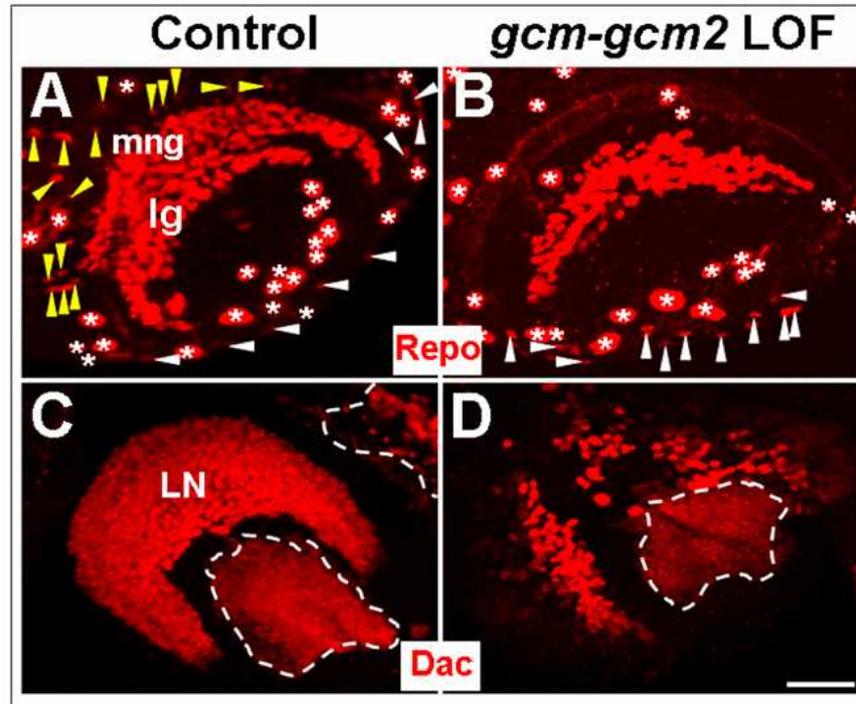


Fig. S5. Glial and neuronal differentiation requires Gcm pathway in the visual system. (A-D) Immunolabeling on *gcm-gal4,tub-gal80^{ts};UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-gcm^{N7-4DN}* (control in A,C) and *gcm-gal4,tub-gal80^{ts};UAS-gcm^{DN},UAS-gcm^{DN}* (*gcm-gcm2* LOF in B,D) LIII CNS. A,B and C,D show Repo (mediolateral view) and Dachshund (Dac) (lateral view) labeling, respectively. (A,B) The number of lamina (including epithelial and marginal glia) and medulla neuropile glia (indicated by lg and mng in A, respectively) is severely reduced in *gcm-gcm2* LOF (B) compared to control (A) CNS. Yellow arrowheads in A indicate migrating mng present in control CNS (note that they are absent in B). Due to projection of several confocal optical sections, some superficial glial cells not belonging to optic lobes are present in A,B (indicated by asterisks and white arrowheads). (C,D) Note that the number of lamina neurons (LN in C) is also strongly affected in *gcm-gcm2* LOF (D) compared to control (C) CNS. Areas delimited by dashed lines in C,D show neurons that do not belong to lamina. Scale bar: 40 μ m.

Table S1. Rescue of c-Gcm1BD-ER-induced neuronal loss by co-electroporation with c-Gcm1 wild-type-expressing vector

Electroporation	Percentage of GFP ⁺ and Lim ⁺ cells
<i>c-Gcm1WT</i>	57.7
c-Gcm1BD-ER + <i>c-Gcm1WT</i> (ratio 2:3)	53
c-Gcm1BD-ER + <i>c-Gcm1WT</i> (ratio 3:2)	43
c-Gcm1BD-ER	7.3

Note that the degree of rescue is directly proportional to the amount of *c-Gcm1* wild-type-expressing vector used in the co-electroporation (comparing data obtained from the 2:3 versus 3:2 ratios).

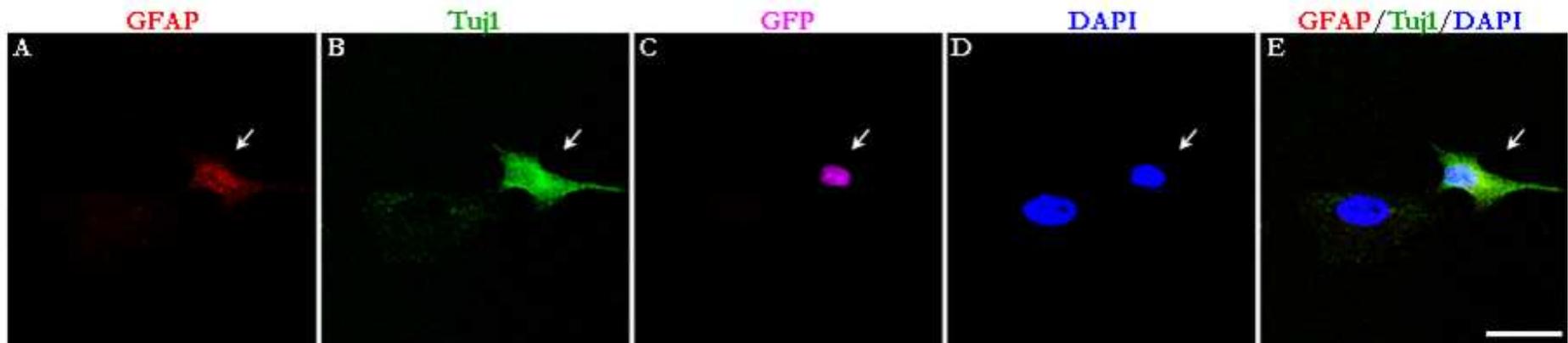
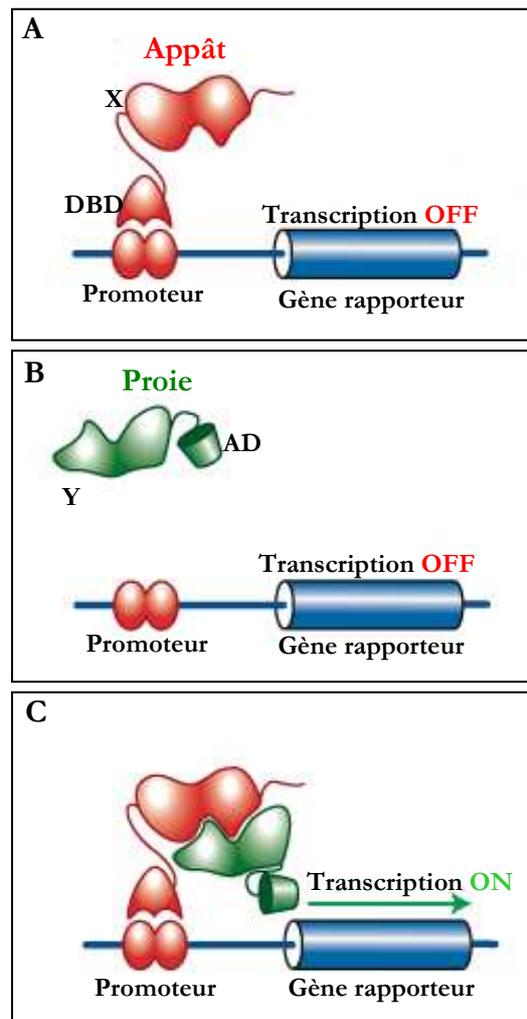


Figure 33. *m-GCM2* induit les marqueurs neuronaux et gliaux dans les cellules HeLa. Immunomarquage GFAP (A, rouge), Tuj1 (B, vert), GFP (C, rose) et DAPI (D, bleu) sur des cellules HeLa transfectées avec le vecteur d'expression contenant *m-GCM2*. (E) Montre simultanément les marquages GFAP, Tuj1 et DAPI. *m-GCM2* induit simultanément le marqueur neuronal Tuj1 et glial GFAP (flèche). Barre d'échelle 20 μm .

➤ **Résultats complémentaires**

Afin de déterminer le potentiel gliogénique et/ou neurogénique de *m-GCM2* en contexte cellulaire, j'ai réalisé des transfections de cellules HeLa comme précédemment. *m-GCM2* est également capable d'induire les marqueurs astrocytaire GFAP et neuronal Tuj1 (**Figure 33**). De même que pour les autres gènes *gcm*, l'expression ectopique de *m-GCM2* dans ces cellules induit la coexpression de ces marqueurs dans près de deux tiers des cellules. Un rôle neurogénique de ce gène *in vivo* peut donc également être envisageable.

Nous avons montré au cours de cette étude que les gènes *gcm* possèdent un potentiel neurogénique qui est conservé de la drosophile aux vertébrés. Sachant que leur rôle dans la gliogenèse des vertébrés est toujours discuté, ces nouvelles données appellent à reconsidérer leur rôle potentiel chez les vertébrés.



D'après www.dualsystems.com

Figure 34. Principe du double hybride. (A) Dans la première étape d'un crible double hybride, l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt X est cloné dans un vecteur contenant la séquence du domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'un facteur de transcription, créant ainsi une protéine chimère : l'appât. Cet appât va aller dans le noyau de la levure et lier ses séquences promotrices spécifiques. L'appât n'ayant pas de domaine d'activation (AD), la transcription du gène rapporteur en aval du promoteur ne sera pas activée. (B) Un second ADNc codant pour une protéine Y est cloné dans un vecteur contenant la séquence d'un AD, créant ainsi une seconde protéine chimère : la proie. Cette seconde protéine de fusion a la capacité d'activer la transcription mais ne peut cependant pas se lier à l'ADN. (C) Si l'appât et la proie interagissent il y a reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel ce qui va entraîner l'expression du gène rapporteur.

IV. IDENTIFICATION DES COFACTEURS POTENTIELS DE Gcm À L'AIDE D'UN CRIBLE DOUBLE HYBRIDE

Nous avons vu précédemment que Gcm a un rôle dans l'acquisition de destins cellulaires (glie, neurones, plasmotocytes) mais aussi dans la spécification ainsi que dans la différenciation terminale d'un type cellulaire (cellules tendon). Tout ceci amène à penser que la fonction de Gcm dépend de cofacteurs temporels et spatiaux spécifiques.

L'identification des cofacteurs de Gcm a été entreprise par un crible double hybride chez la levure. Ce type d'approche est particulièrement intéressante chez la drosophile car, son génome étant totalement séquencé, l'identification des différents cofacteurs est relativement facilitée. De plus, le profil d'expression d'un grand nombre de gènes est connu et nous avons à notre disposition une collection étendue de mutants ce qui permet de tester facilement l'implication des candidats dans un processus donné.

A. Principe du système double hybride chez la levure

La technique du double hybride a été mise au point chez la levure afin de détecter des interactions protéiques directes (Fields et Song, 1989). Cette technique est fondée sur deux propriétés fondamentales des facteurs de transcription. En premier lieu, ces facteurs sont modulaires, réunissant un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine activateur (AD) ou répresseur de la transcription (Latchman, 1990). Les DBD et les domaines transrégulateurs sont interchangeables entre différents facteurs. En second lieu, la reconstitution d'un facteur de transcription actif peut être assurée par le rapprochement topographique entre ces deux domaines.

Le système double hybride original ((Fields et Song, 1989) et **Figure 34**) utilise l'AD et le DBD du facteur de transcription activateur Gal4 et met en œuvre une protéine appât et des

protéines proies. La protéine appât correspond à une chimère composée de la protéine d'intérêt, dont on veut identifier les cofacteurs, fusionnée au DBD de Gal4. Les protéines proies, quant à elles, sont un ensemble de protéines chimères composées d'une protéine X,Y,Z... fusionnée à l'AD de Gal4. Le DBD de Gal4 reconnaît une séquence spécifique de l'ADN, la séquence UAS (Upstream Activator Sequence), insérée en amont du gène *lacZ*. L'expression de *lacZ* est ainsi sous le contrôle de l'interaction entre l'appât et la proie qui permet de « reconstruire » un facteur de transcription Gal4 fonctionnel. L'expression de la β -Galactosidase sert de marqueur de sélection. En effet, cette enzyme dégrade le chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-Gal) en une substance bleue visible dans les colonies de levures.

Théoriquement, n'importe quelle combinaison DBD/AD de facteurs de transcription bipartites (Gal4, LexA, ...) et n'importe quel système rapporteur (avec un ou plusieurs gènes rapporteurs) peut être utilisée. Parmi les plus utilisés en plus du rapporteur colorimétrique *lacZ*, citons les gènes rapporteurs prototrophiques *HIS3* et *LEU2*. *HIS3* encode pour l'enzyme IGPDH (Imidazole Glycerol Phosphate DeHydratase) nécessaire dans la voie biosynthétique d'histidine et *LEU2* encode pour l'enzyme IPMDH (IsoPropylMalate DeHydrogenase) nécessaire dans la voie biosynthétique de la leucine.

Dans le cadre de ce travail, le système décrit par le Dr Losson à l'IGBMC ([Le Douarin et al., 2001](#)) a été utilisé car il utilise le facteur de transcription LexA qui a pour avantage de permettre la détection d'interactions plus faibles qu'avec l'utilisation de Gal4. La protéine appât, protéine d'intérêt dont on veut identifier les cofacteurs, est fusionnée au DBD de LexA (LexA DBD – X), un facteur de transcription bactérien répresseur absent chez la levure et la drosophile. Les protéines proies, quant à elles, sont des protéines chimères composées d'une protéine X,Y,Z... fusionnée à l'AD de la protéine 16 du virus de l'herpès (VP16 AD – Y). L'interaction est testée dans la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* L40 qui contient deux gènes rapporteurs insérés de façon stable dans son génome : *HIS3* et *lacZ*. Ces deux gènes rapporteurs sont placés sous le contrôle d'éléments promoteurs distincts et contenant chacun plusieurs opérateurs de

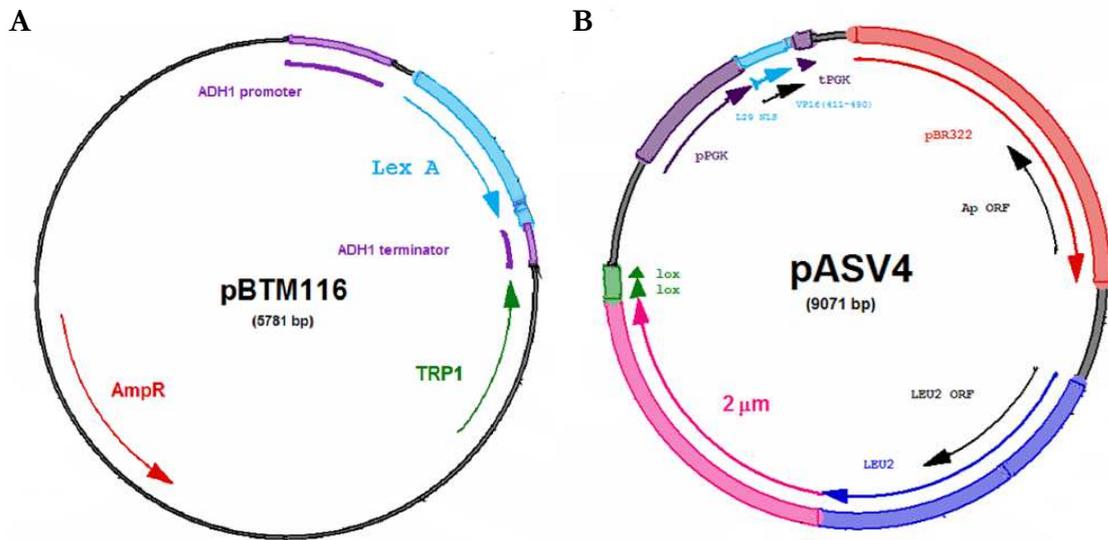


Figure 35. Vecteurs utilisés au cours du crible double hybride. (A) Vecteur permettant l'expression de la protéine appât (pBTM116). La séquence codante de l'appât est insérée dans le site multiple de clonage situé en 3' de celle du domaine de liaison à l'ADN de LexA (bleu clair). L'expression de l'appât est dirigée par le promoteur constitutivement actif du gène de l'alcool déshydrogénase (ADH, violet). (B) Vecteur permettant l'expression des différentes proies de la banque d'ADNc (pASV4). Les ARN messagers des gènes exprimés au cours de l'embryogenèse ont été convertis en ADN complémentaire puis insérés dans le site unique EcoRI permettant ainsi la production de protéines de fusion comportant le domaine d'activation de la transcription de la protéine 16 du virus de l'herpès (VP16). L'expression de la protéine de fusion est dirigée par le promoteur constitutivement actif du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK, violet).

LexA (séquences reconnues par LexA). La transcription des gènes rapporteurs est activée seulement s'il y a interaction entre l'appât (LexA DBD – X) et la proie (VP16 AD – Y). De plus, pour que l'interaction soit considérée positive, les clones sélectionnés devront être capables d'activer simultanément les deux gènes rapporteurs bien qu'ils soient munis de promoteurs différents, ceci contribue à une réduction du nombre de faux positifs.

Expérimentalement, les levures L40 (génotype : *MAT α his3 Δ 200 trp1–901 leu2–3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-lacZ)*), mutantes auxotrophes pour les gènes *his3 trp1 leu2*, donc incapables de pousser sur un milieu dépourvu d'histidine (His), de tryptophane (Trp) et de leucine (Leu) car incapables de synthétiser ces acides aminés, sont transformées simultanément par deux plasmides : le premier (pBTM116 ; **Figure 35A**) code pour LexA DBD – X et porte le gène codant pour le tryptophane *trp1*, tandis que le deuxième (pASV4 ; **Figure 35B**) code VP16 AD – Y et porte le gène codant pour la leucine *leu2*. Les protéines de fusion exprimées possèdent un signal de localisation nucléaire permettant leur translocation au noyau, ce qui est nécessaire pour tester l'interaction.

La première étape consiste à sélectionner les levures transformées simultanément par les deux plasmides en les étalant sur un milieu sélectif dépourvu de Trp et de Leu (TL-) car seules les levures ayant intégré les deux plasmides auront leur auxotrophie compensée. La deuxième étape consiste à déceler une éventuelle interaction entre les deux protéines d'intérêt. L'interaction des protéines X et Y permettra la reconstitution d'un transactivateur fonctionnel et la transcription subséquente des gènes rapporteurs *HIS3* et *lacZ*, permettant respectivement la synthèse d'histidine et de la β -Galactosidase.

La force de l'interaction entre les deux protéines peut être estimée par le calcul de l'activité spécifique de la β -Galactosidase. En effet, en double hybride, le taux d'expression des gènes rapporteurs est corrélé avec la force d'interaction entre l'appât et la proie permettant ainsi de classer les interactions faible, intermédiaire ou forte.

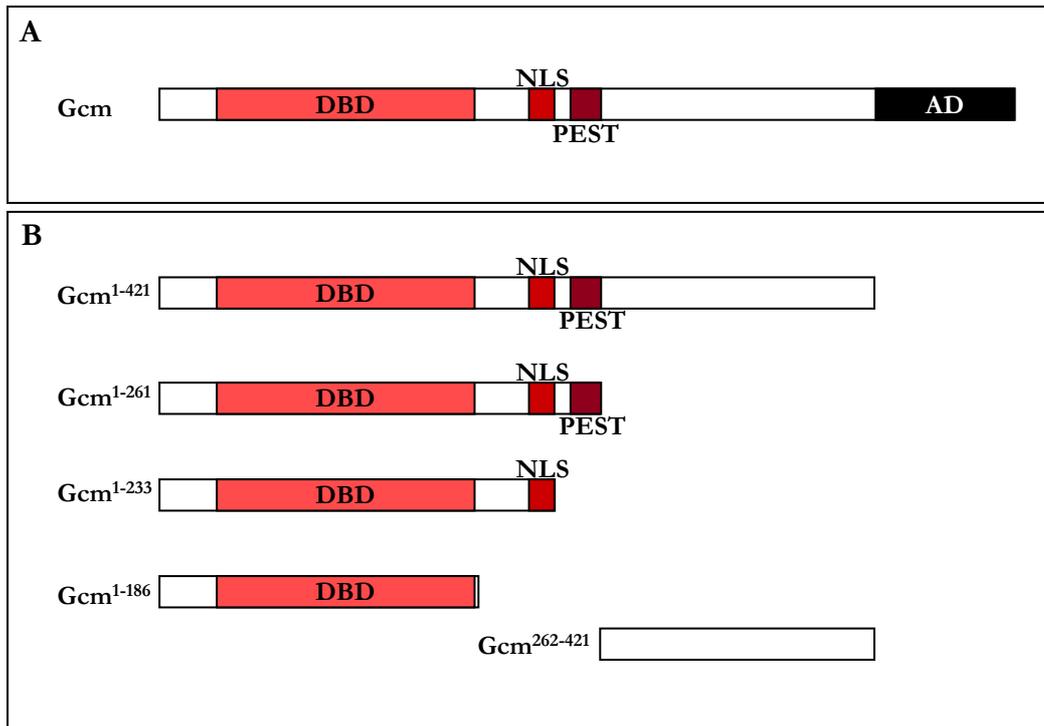


Figure 36. Représentation schématique des différents appâts Gcm testés pour le crible double hybride chez la levure. (A) Gcm (B) Appâts. AD, domaine d'activation ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; NLS, signal de localisation nucléaire ; PEST, séquence d'instabilité protéique. Gcm¹⁻²⁶¹ correspond à l'appât utilisé pour le crible double hybride.

B. L'appât

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Gcm est un facteur de transcription constitué de différents domaines : un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un signal de localisation nucléaire (NLS), un élément d'instabilité protéique (PEST) et un domaine d'activation (AD) (**Figure 36A**). La première étape du crible double hybride est de choisir le « bon appât ».

En effet un bon appât :

- 1 : doit être exprimé correctement dans la levure
- 2 : ne doit pas être toxique pour la levure
- 3 : ne doit pas entraîner d'autoactivation des gènes rapporteurs à lui seul

Gcm étant un activateur de la transcription, son domaine d'activation doit être exclu de l'appât. J'ai donc décidé de réaliser plusieurs appâts en délétant progressivement différents domaines de Gcm (**Figure 36B**).

Afin de vérifier l'expression de l'appât, le plasmide appât est transformé dans la souche de levure sur un milieu sélectif sans Trp (T⁻) puis la présence de la protéine appât est révélée en western blot à l'aide d'un anticorps anti-LexA. La transformation de levures avec l'appât permet également de vérifier sa toxicité chez la levure.

Dans le but de tester si l'appât n'entraîne pas d'autoactivation, le plasmide appât est transformé dans la souche de levure avec le plasmide de la banque sans insert, c'est-à-dire que notre appât sera en présence du domaine activateur de VP16 dans la levure. Cette transformation est tout d'abord étalée sur un milieu sélectif dépourvu de Trp et de Leu (TL⁻) afin de sélectionner les levures contenant les deux constructions. Puis les levures sont repiquées sur un milieu dépourvu en Trp, Leu et His (TLH⁻) afin de vérifier si l'appât est transactivateur, c'est-à-dire capable d'activer le gène rapporteur *HIS3* et par conséquent la croissance des levures sur ce milieu sélectif.

Appât \ 3-AT	0 mM	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM
Gcm ¹⁻⁴²¹	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Gcm ¹⁻²⁶¹	-	-	-	-	-	-	-
Gcm ¹⁻²³³	-	-	-	-	-	-	-
Gcm ¹⁻¹⁸⁶	-	-	-	-	-	-	-
Gcm ²⁶²⁻⁴²¹	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

+++ : Autoactivation forte

++ : Autoactivation moyenne

+ : Autoactivation faible

- : Pas d'autoactivation

Tableau 2. Test et inhibition de l'autoactivation des différents appâts Gcm. Afin de déterminer le « meilleur » appât à utiliser pour le crible double hybride, un test d'autoactivation a été réalisé. Ce test permet de vérifier si l'appât seul est capable d'activer la transcription des gènes rapporteurs à lui seul (+ à +++) ou non (-). L'utilisation de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), un inhibiteur compétitif de l'histidine, permet de réduire le niveau d'expression basale du gène rapporteur. Cependant, dans le cas de Gcm¹⁻⁴²¹ et de Gcm²⁶²⁻⁴⁶⁶ l'autoactivation ne peut être inhibée, rendant l'utilisation de ces appâts impossible pour le crible double hybride.

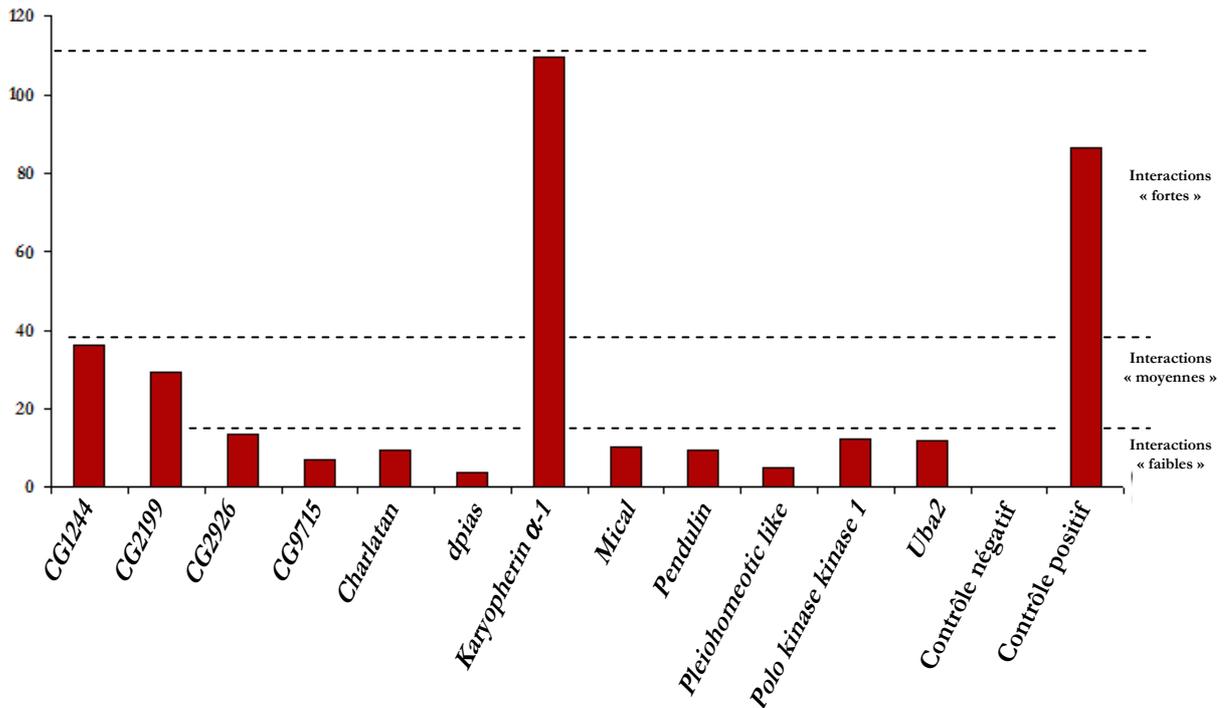
Les tests d'autoactivation (**Tableau 2**) montrent que le domaine compris entre la séquence PEST et l'AD de Gcm (AA 262-421) est capable d'induire une forte autoactivation des deux gènes rapporteurs. Dans le but de contrecarrer cette autoactivation, l'utilisation d'un inhibiteur compétitif de l'enzyme IGPDH chez la levure, le 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) a été utilisé (**Tableau 2**). Cette technique permet de réduire le niveau d'expression d'autoactivation du gène rapporteur *HIS3* afin de permettre l'utilisation de l'appât donnant cette autoactivation. Cependant, l'autoactivation induite par la construction Gcm²⁶²⁻⁴²¹ n'a pas pu être inhibée même en présence de fortes concentrations de 3-AT.

Par contre, la partie N-terminale de Gcm (DBD-NLS-PEST, Gcm¹⁻²⁶¹) n'entraîne jamais d'autoactivation. J'ai donc choisi, comme appât pour le crible, la construction contenant le maximum de domaines (Gcm¹⁻²⁶¹) afin d'identifier des interacteurs les plus variés possible. Les autres constructions (Gcm¹⁻²³³ et Gcm¹⁻¹⁸⁶) permettront d'identifier plus précisément le domaine d'interaction de Gcm avec ses potentiels cofacteurs.

C. La banque d'ADNc : les proies

La banque utilisée est une banque d'expression des ARN messagers présents au cours de l'embryogenèse de la drosophile (4-18 heures de développement à 25°C). Cette banque d'ADNc a été générée par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides hexamériques aléatoires. Cette banque contient donc des ADNc, de taille aléatoire, clonés dans le vecteur pASV4. Il est important de noter que ces fragments ont été clonés sans respecter les phases ouvertes de lecture, ce qui peut conduire à l'expression de protéines aberrantes. Cette banque, qui a été construite dans l'institut, a été utilisée pour deux cribles doubles hybrides qui ont révélés de nombreux candidats validés par d'autres approches biochimiques (Schaerlinger, 2004 ; Vanolst et al., 2005).

Activité β -Galactosidase
(nmol/mg/min)



Graphique 1. Estimation de la force d'interaction entre Gcm et ses interacteurs. En double hybride, le taux d'expression des gènes rapporteurs est corrélé avec la force d'interaction entre l'appât (Gcm^{1-261}) et la proie. Dans mon cas, le gène rapporteur *lacZ* permet d'estimer la force d'interaction entre deux protéines à l'aide de la mesure de l'activité spécifique de la β -Galactosidase. Cette activité est calculée avec la formule $(As=DO_{420nm} \times 0,85)/(0,0045 \times [protéines] \times volume \times temps)$. En ordonnées est représentée l'activité de la β -Galactosidase en nmol/mg/min et en abscisses les différents interacteurs de Gcm en double hybride chez la levure. Le contrôle négatif correspond à l'activité de la β -Galactosidase de la souche de levure sans appât ni proie. Le contrôle positif correspond à la force d'interaction entre Pannier et Toutatis, deux interacteurs connus chez la drosophile (constructions de Luc Vanolst).

D. Crible de la banque

Après avoir transformé les levures avec les vecteurs contenant l'appât et la banque d'ADNc, les interactions ont été testées en vérifiant l'activation des gènes rapporteurs. Pour ce faire, 10×10^6 cellules sont criblées sur milieu sélectif TLH- afin que chacun des clones initiaux de la librairie (titrée à 10^6 cfu) soit statistiquement représenté au moins 10 fois. Au final, 166 clones ont montré une capacité de pousser sur milieu sélectif. Ces clones ont ensuite été séquencés, puis la séquence nucléotidique correspondant à chaque clone a été traduite en séquence protéique en respectant la phase de lecture du vecteur puis les clones ont été identifiés à l'aide du programme informatique blastp (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>). Ceci permet d'écarter les faux positifs correspondant à des ADNc non en phases ou inversés. En effet, la banque ayant été construite par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides hexamériques aléatoires il est possible de détecter des interactions de la protéine appât avec des peptides aberrants ne correspondant pas à de réelles protéines. Ainsi, 26 clones ont été retenus et correspondent aux gènes suivants :

- *CG11676*
- *CG1244*
- *CG13942*
- *CG14110*
- *CG14639*
- *CG2199*
- *CG2926*
- *CG3445*
- *CG8562*
- *CG9715*
- *CG9973*
- *charlatan*
- *dpia*
- *karyopherine- α 1*
- *lozenge*
- *mical*
- *mod(mdg4)*
- *notch*
- *pendulin*
- *pipsqueak*
- *pleiobomeotic like*
- *polo kinase kinase 1*
- *short Wing*
- *su(var)205*
- *tramtrack*
- *uba2*

Afin de vérifier la spécificité de ces interactions, les levures L40 ont été de nouveau transformées avec le vecteur appât vide (pBTM116) et les plasmides contenant les interacteurs potentiels, ceci dans le but de vérifier que l'interaction n'a pas lieu avec le DBD de LexA seul mais bien avec la construction d'intérêt. En parallèle, la qualité de l'interaction entre les cofacteurs potentiels et Gcm¹⁻²⁶¹ a été dosée par dosage de l'activité β -Galactosidase (**Graphique 1**). Les forces d'interactions observées peuvent être séparées en trois catégories : les interactions fortes,

Interacteur \ Appât	Gcm ¹⁻²⁶¹ DBD + NLS + PEST	Gcm ¹⁻²³³ DBD + NLS	Gcm ¹⁻¹⁸⁶ DBD
CG1244	+++	+++	++
CG2199	+++	+++	+++
CG2926	+++	+	-
CG9715	+++	++	+
Charlatan	+++	+++	+++
dpia5	+++	+/-	+/-
Karyopherin- α 1	+++	+++	-
Mical	+++	+	+/-
Pendulin	+++	+++	-
Pleiohomeotic like	+++	+++	+
Polo kinase kinase 1	+++	-	-
Uba2	+++	+/-	+/-

+++ : Interaction forte

++ : Interaction moyenne

+ : Interaction faible

+/- : Interaction quasi-nulle

- : Pas d'interaction

Tableau 3. Domaines requis et force d'interaction entre Gcm et ses cofacteurs. Force d'interaction relative entre chaque interacteur de Gcm en double hybride chez la levure selon les domaines de Gcm présents dans l'appât. Ces forces d'interactions qui sont relatives ne sont pas comparables entre les différents interacteurs. DBD : domaine de liaison à l'ADN, NLS : signal de localisation nucléaire, PEST : séquence d'instabilité protéique.

moyennes et faibles, l'échelle étant placée de façon arbitraire. Ceci permet également de confirmer l'interaction car cela permet de vérifier l'activation du second gène rapporteur.

Finalement, 12 clones ont rempli tous ces critères :

- *CG9715*
- *CG1244*
- *CG2199*
- *CG2926*
- *charlatan*
- *dpia*
- *karyopherine- α 1*
- *mical*
- *pendulin*
- *pleiobomeotic like*
- *polo kinase kinase 1*
- *uba2*

De façon intéressante, la proportion de clones ayant remplis tous les critères par rapport au nombre de clones initiaux est du même ordre que lors des cribles double hybride précédemment réalisés dans l'institut.

Les interactions ont ensuite été testées avec les autres constructions Gcm^{1-233} et Gcm^{1-186} afin de déterminer le domaine d'interaction de *Gcm* avec ses interacteurs (**Tableau 3**).

E. Les cofacteurs potentiels de *Gcm*

Parmi les cofacteurs potentiels de *Gcm* il peut être distingué deux catégories. Les cofacteurs codés par des gènes qui ont déjà fait l'objet de plusieurs études, et les cofacteurs codés par des gènes prédits CG (Computed Genes).

1. Les gènes « connus »

✓ Charlatan

Charlatan (*Chn*) est un facteur de transcription à doigts de zinc qui nécessite le DBD de *Gcm* pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (**Graphique 1**). A l'aide d'expériences d'hybridation *in situ* chez l'embryon, il a été montré que l'expression de *chn* est ubiquitaire jusqu'au stade 5, puis son ARNm est accumulé

dans la région dorsale, dans le sillon céphalique et dans le mésoderme présomptif, mais pas au niveau du primordium des hémocytes. Au stade 11, l'ARNm de *chn* est trouvé principalement dans le mésoderme ainsi que dans la région épidermique correspondant au lieu où les neurones du SNP apparaissent. Les embryons plus tardifs, à partir du stade 15, montrent une forte expression de *chn* dans les neurones embryonnaires. En L3, *chn* est exprimé dans les groupes proneuraux des disques imaginaux d'ailes, œil/antenne, et de pattes (Escudero et al., 2005). Par contre, le profil d'expression de *chn* dans le SNC post-embryonnaire n'a pas été établi.

Il a été montré que Chn renforce l'expression des gènes proneuraux *achaete/scute* dans les disques imaginaux en agissant sur des séquences activatrices spécifiques de ces gènes. *chn* est également requis pour le développement correct du SNP de l'embryon et de la larve, son absence entraînant la disparition de neurones ainsi que des malformations des organes chordotonaux (Escudero et al., 2005). Par ailleurs, il a été révélé que Chn partage plusieurs caractéristiques communes au facteur répresseur humain NRSF/REST (Neuronal Restricted Silencing Factor/Repressor Element RE-1 Silencing Transcription factor) qui est un répresseur spécifique de gènes neuronaux, pour revue voir Jones et Meech, 1999. En effet, il a été montré que Chn réprime directement Delta (ligand du récepteur Notch) et que ce rôle est important dans l'initiation du développement de l'œil (Tsuda et al., 2006).

✓ Mical

Mical est une protéine de liaison à l'actine de la famille des flavoprotéines monooxygénases MICAL (Molecule Interacting with CasL) qui nécessite la séquence PEST de Gcm pour interagir (Tableau 3) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (Graphique 1). *mical* est exprimé dans les neurones embryonnaires (Terman et al., 2002) mais son domaine d'expression dans le système nerveux post-embryonnaire n'est pas connu. Par des expériences de génétique classique, il a été montré que Mical intervient dans la guidance axonale durant l'embryogenèse (Terman et al., 2002). Mical est également exprimé dans

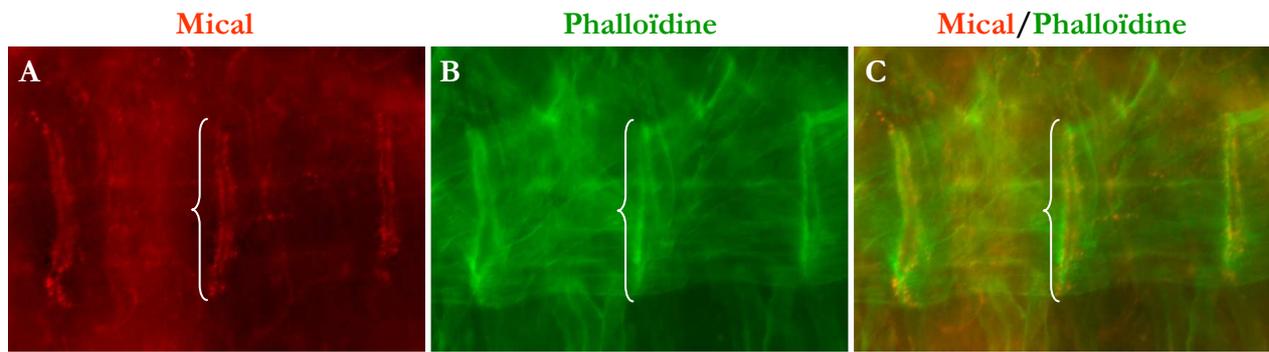


Figure 37. Mical est exprimé dans les muscles. Embryon au stade 16 en vue latérale. Coimmunomarquage Mical (rouge, A) et phalloïdine (vert, B) qui marque l'actine F. (C) Montre simultanément les deux marquages. Mical est exprimé dans les muscles et est présent notamment au niveau des sites d'attachements musculaire (accolades).

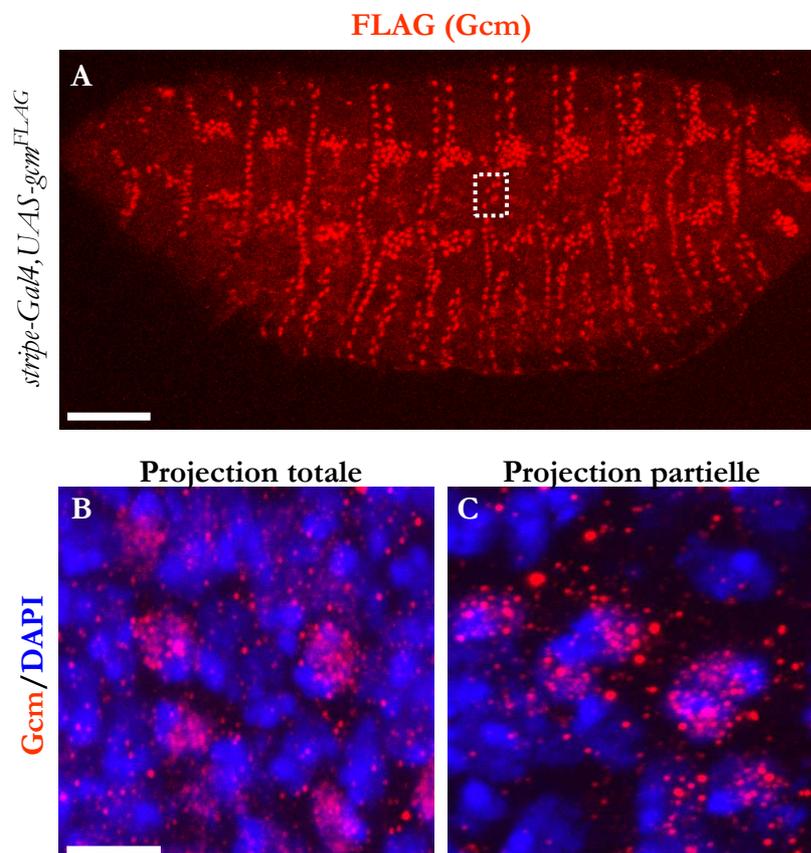


Figure 38. Gcm n'est pas uniquement nucléaire. (A) Immunomarquage anti-FLAG sur embryon *stripe-Gal4, UAS-gcm^{FLAG}* au stade 14-15 exprimant une version étiquetée de Gcm dans les cellules tendon de l'embryon. La zone encadrée en A est présentée en B et C. (B) Projection totale des sections en Z de la zone d'intérêt avec le marquage anti-FLAG (rouge) et DAPI (bleu) qui marque le noyau des cellules. (C) Projection partielle des sections en Z qui montre que la protéine Gcm n'est pas uniquement présente dans le noyau des cellules. Barres d'échelle en A : 50 μm , en B : 25 μm .

les muscles de l'embryon où il assure une bonne organisation des myofilaments en sarcomères ainsi qu'au niveau de l'attachement des muscles aux cellules tendon, mais du côté musculaire (**Figure 37**) (Beuchle et al., 2007). A la vue du rôle neurogénique de *gcm* nouvellement identifié, il pourrait être intéressant de vérifier si *mical* et *gcm* ne sont pas coexprimés dans une sous population neuronale aux stades post-embryonnaires. Mical présente une localisation cytoplasmique ce qui ne signifie pas qu'il ne peut pas interagir avec Gcm, car Gcm est présent dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme de la cellule (**Figure 38**). Cette observation a été réalisée à l'aide d'une construction de Gcm étiquetée avec un épitope FLAG que j'ai réalisé durant ma thèse afin de confirmer les interactions entre Gcm et ses cofacteurs. Cette construction, placée sous le contrôle des séquences UAS, est active *in vivo*, c'est-à-dire que de la même façon que *gcm*, l'expression ectopique de *gcm*^{FLAG} induit des cellules gliales ectopiques et Stripe b. Cette construction permet également de visualiser la protéine *in vivo* lorsque *gcm*^{FLAG} est exprimé ectopiquement avec une lignée pilote. Cette technique a été utilisée dans le but de visualiser la localisation de Gcm car nous ne disposons pas d'anticorps anti-Gcm fonctionnant en immunohistochimie (ni en western blot) dans notre laboratoire. Lors de ma thèse, j'ai immunisé plusieurs lapins avec différents fragments protéiques de Gcm, cependant les sérums obtenus ne permettent pas d'identifier la protéine *in vivo*, ni en western blot, comme les anticorps réalisés par plusieurs groupes.

Ces deux candidats, n'ont donc pas été décrits comme étant exprimés dans des les mêmes tissus que *gcm* au cours du développement de l'embryon. Charlatan et Mical peuvent à priori être considérés comme des « faux positifs ». Ceci dit, il n'est pas à exclure que *mical* et/ou *charlatan* soit coexprimés dans un même tissu que *gcm* étant donné que les profils d'expression de ces gènes aux stades post-embryonnaires ne sont pas totalement connus. En effet, ces gènes étant exprimés dans des territoires neuronaux, il est possible que leurs domaines d'expression se rejoignent dans une sous population spécifique ou à un stade précis. Lorsque j'ai réalisé ce crible, le rôle

neurogénique de Gcm n'avait pas encore été mis en évidence, c'est pourquoi je n'ai pas déterminé le profil d'expression de ces gènes dans le système nerveux post-embryonnaire. Cependant, à la vue du nouveau rôle neurogénique de *gcm* il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude de ces potentiels cofacteurs. Toutefois, il est également possible que deux protéines interagissent en double hybride chez la levure mais que cette interaction soit impossible *in vivo*, les protéines étant dans des tissus/compartiments cellulaires différents.

✓ Polo kinase kinase 1

La Polo kinase kinase 1 (connu également sous le nom de Sterile 20-like kinase (Slik)) est une protéine kinase qui nécessite le DBD de Gcm pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (**Graphique 1**). La protéine Polo kinase kinase 1 est majoritairement submembranaire et est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Hipfner et Cohen, 2003 ; Hipfner et al., 2004). La perte de fonction de *polo kinase kinase 1* induit des animaux de taille réduite ce qui suggère qu'elle est nécessaire dans toutes les cellules de l'organisme, cependant son expression n'a été déterminée que dans le disque d'aile par immunomarquage. Dans ce tissu, Slik est présent dans toutes les cellules et à un niveau comparable (Hipfner et Cohen, 2003), ce qui sous entend qu'il doit en être de même dans toutes les cellules de l'organisme.

✓ Karyopherin- α 1 et Pendulin

La karyopherin- α 1 et Pendulin (connus également sous le nom de importin- α 1 et importin- α 2, respectivement) sont des protéines de transport impliquées dans le transfert de protéines, possédant un NLS, du cytoplasme au noyau de la cellule (pour revue Goldfarb et al., 2004). Il existe trois homologues chez la drosophile qui peuvent fonctionner de façon interchangeable selon le tissu. Ces deux protéines nécessitent le NLS de Gcm pour interagir avec Gcm ce qui valide, en outre, le crible double hybride car, Gcm étant un facteur de transcription

avec une séquence NLS, il nécessite des transporteurs afin d'être localisé dans le noyau de la cellule. L'interaction entre la Karyopherin- $\alpha 1$ et Gcm est très forte, alors que l'interaction entre Pendulin et Gcm peut être qualifiée de faible (**Graphique 1**). Il est donc probable que la Karyopherin- $\alpha 1$ soit la protéine qui soit principalement impliquée dans le transport de Gcm, par rapport à Pendulin.

Les animaux mutants perte de fonction pour *pendulin* sont stériles. Il a été mis en évidence que ce phénotype de stérilité peut être sauvé chez les mâles par l'introduction d'un transgène emmenant soit *karyopherin- $\alpha 1$* , *pendulin* ou *importin $\alpha 2$* (Mason et al., 2002), suggérant que les trois importines peuvent réaliser le rôle de *pendulin* durant la spermatogenèse. Par contre, chez les femelles, ce phénotype ne peut être sauvé que par *pendulin* (Mason et al., 2002), suggérant que celui-ci joue un rôle spécifique durant l'oogenèse.

✓ Uba2

Les mécanismes conduisant à la modification par l'ubiquitine ou par Sumo membre de la famille des « Ubiquitin-like » font appel à des complexes d'organisation similaire bien que composés de protéines différentes (Herrmann et al., 2007). Ils sont constitués d'une ligase E1 qui active le résidu, d'une ligase E2 permettant le transfert de Sumo sur le substrat et d'une ligase E3 qui assure la spécificité de reconnaissance du substrat. Le processus de sumoylation est donc très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination. En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome, la sumoylation semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles (trafic intracellulaire, interaction protéique, interaction ADN-protéine, activité transcriptionnelle...), pour revue voir Zhao, 2007.

Uba2 (connu également sous le nom de Smt3 activating enzyme 2) est une protéine composant l'enzyme Sumo E1, présente à tous les stades du développement, mais en quantité plus abondante dans les tissus en prolifération (Donaghue et al., 2001). Chez l'embryon, il a été

mis en évidence que Uba2 est exprimé de façon ubiquitaire dans tout le SNC (Altenhein et al., 2006). Uba2 nécessite la séquence PEST de Gcm pour interagir (Tableau 3) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (Graphique 1). A ce jour, la fonction de cette protéine n'est pas élucidée. Nous avons entamé une collaboration avec le Dr Ho de l'équipe du Dr Chien (Taiwan) afin d'étudier la régulation de l'activité de Gcm dans le système nerveux.

✓ Pleiohomeotic like

Pleiohomeotic like (Phol) est un facteur de transcription à doigts de zinc. Phol nécessite le NLS de Gcm pour interagir (Tableau 3) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (Graphique 1). Le profil d'expression de *phol* n'a pas été établi à ce jour. Phol a été montré comme impliqué dans la répression de l'expression des gènes homéotiques lors du développement (Brown et al., 2003), en recrutant les protéines du groupe Polycomb à l'ADN et ainsi induire une répression transcriptionnelle dirigée par les protéines Polycomb (Wang et al., 2004).

Polo kinase kinase 1, karyopherin- α 1, Pendulin, Uba2 et Pleiohomeotic like représentent des protéines qui laisse penser à une fonction « générale » dans la cellule. Le but de ce crible double hybride étant l'identification des cofacteurs de Gcm induisant la spécificité de sa fonction selon le tissu où il est exprimé, ces candidats n'ont pas retenu mon attention pour la suite de ma thèse. Cependant, leur étude peut être intéressante afin de mieux comprendre la régulation de la protéine Gcm au cours du développement.

✓ dpias

dpias est une protéine nucléaire à doigts de zinc (impliqué dans les interactions protéine/protéine) qui nécessite la séquence PEST de Gcm pour interagir (Tableau 3) et la force

d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (**Graphique 1**). *dpias* est impliquée dans différents processus tels que l'organisation et la condensation des chromosomes (Hari et al., 2001), dans le développement de l'œil (Betz et al., 2001), ainsi que dans l'hématopoïèse larvaire (Betz et al., 2001 ; Hari et al., 2001) (voir INTRODUCTION page 47-48). Cette protéine a particulièrement retenue mon attention à cause de son rôle dans l'hématopoïèse larvaire. Or, nous savions que *Gcm* est impliqué dans l'hématopoïèse embryonnaire mais une fonction potentielle de *Gcm* au cours de l'hématopoïèse larvaire n'avait jusqu'à lors jamais été décrite. Ce candidat représentait donc un bon prétendant pour mieux comprendre la spécificité de la fonction de *Gcm* au cours du développement.

2. Les gènes « inconnus »

Lors de ce crible, quatre hypothétiques cofacteurs de *Gcm*, CG9715, CG2926, CG2199 et CG1244, correspondent à des protéines dont la fonction et le domaine d'expression sont inconnus.

✓ CG9715

CG9715 est une protéine à doigts de zinc de type CCHC qui nécessite le NLS de *Gcm* pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de faible (**Graphique 1**). L'analyse de la séquence protéique, à l'aide du programme megablast du site Internet www.ncbi.nlm.nih.gov, de CG8715 ne m'a pas permis d'identifier d'homologue chez la drosophile ni d'orthologue chez les vertébrés.

✓ CG2926

CG2926 est une protéine à doigts de zinc de type RING/PHD qui nécessite la séquence PEST de *Gcm* pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut

être qualifiée de faible (**Graphique 1**). L'analyse de la séquence protéique de CG2926, réalisé de la même façon que pour CG9715, a révélé 37 % d'homologie avec la protéine prédite CTD-binding SR-like protein rA9 du rat. Cette protéine est également présente chez les autres vertébrés mais son domaine d'expression et sa fonction ne sont également pas connus.

✓ CG2199

CG2199 est une protéine à doigts de zinc de type C2H2 qui nécessite le DBD de Gcm pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de moyenne (**Graphique 1**). Aucun homologue chez la drosophile ni d'orthologue chez les vertébrés n'ont pu être identifiés.

✓ CG1244

CG1244 est une protéine à doigts de zinc de type C2H2 qui nécessite le DBD de Gcm pour interagir (**Tableau 3**) et la force d'interaction entre ces deux protéines peut être qualifiée de moyenne (**Graphique 1**). Aucun homologue chez la drosophile ni d'orthologue chez les vertébrés n'ont pu être identifiés.

La détermination du profil d'expression embryonnaire de ces quatre gènes par des expériences d'hybridation *in situ* pour leur ARNm permettra de savoir dans un premier temps si ceux-ci sont exprimés dans un tissu *gcm* au cours de l'embryogenèse. Dans ce cas, la création d'outils, tels que des protéines étiquetées, des lignées transgéniques et mutantes, seront nécessaires pour déterminer la fonction de ces gènes au cours du développement.

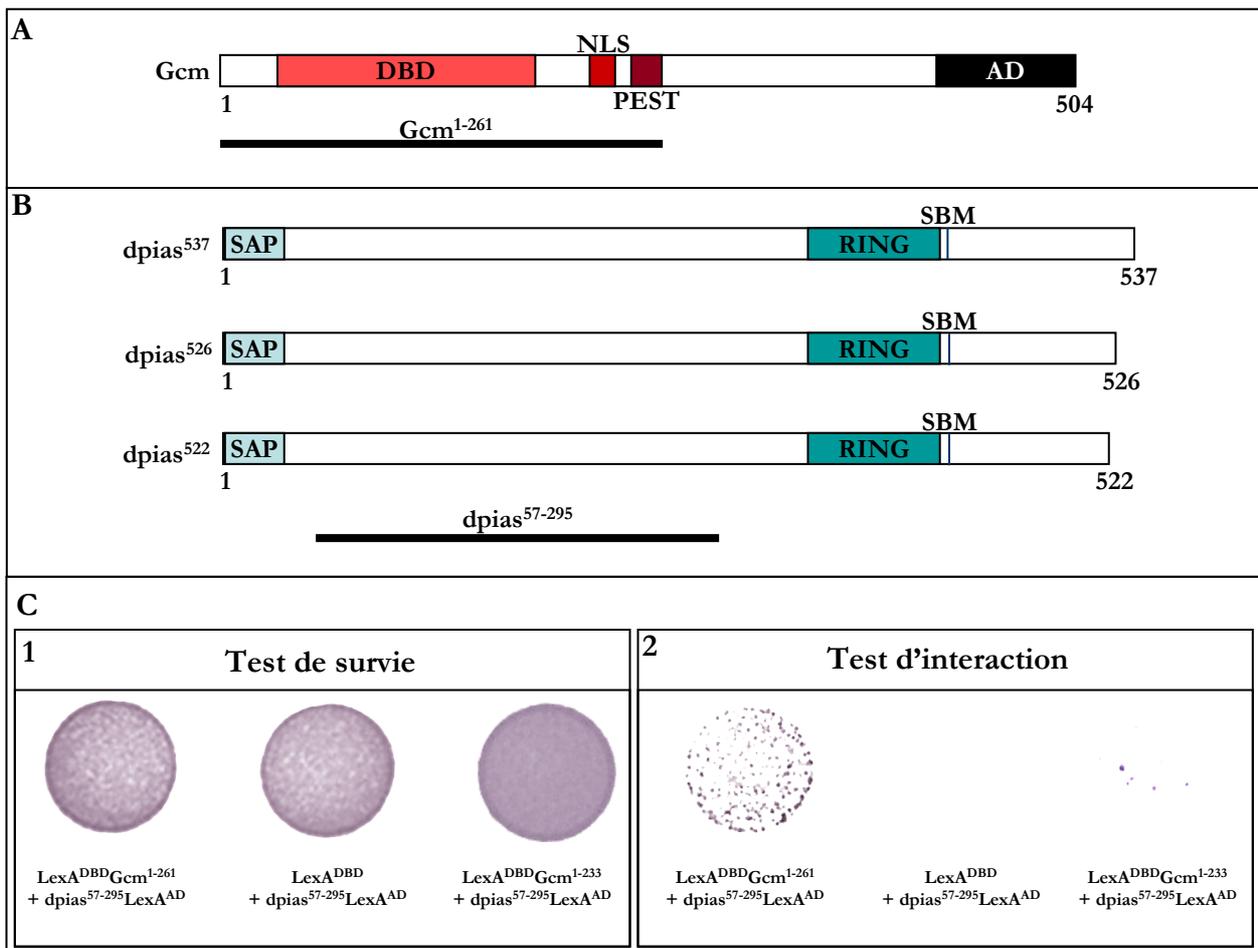


Figure 39. Gcm interagit avec dpias. (A) Structure de la protéine Gcm : AD, domaine d'activation ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; NLS, signal de localisation nucléaire ; PEST, séquence d'instabilité protéique. La ligne noire indique le domaine de Gcm utilisé dans le crible double hybride. (B) Structure des différentes isoformes protéiques de dpias : RING, domaine à doigt de zinc de type RING ; SAP, motif caractéristique des protéines SAF-A/B, Acinus et PIAS ; SBM, site de liaison des protéines SUMO. La ligne noire indique le domaine de dpias utilisé en double hybride chez la levure. (C) Interaction en double hybride entre Gcm et dpias. Des levures auxotrophes pour le tryptophane, la lysine et l'histidine ont été co-transformées avec les vecteurs contenant (i) la construction LexA^{DBD}Gcm¹⁻²⁶¹ ou LexA^{DBD} seul ou LexA^{DBD}Gcm¹⁻²³³, qui compensent l'auxotrophie au tryptophane et (ii) la construction dpias⁵⁷⁻²⁹⁵LexA^{AD}, qui compensent l'auxotrophie à la lysine. Ces levures transformées ont été repiquées sur un milieu sélectif sans tryptophane et sans lysine afin de vérifier la présence des deux constructions (C1). Puis ces levures ont été repiquées sur un milieu sélectif manquant de tryptophane, de lysine et d'histidine (C2). Seules les levures où il y a interaction protéique voient leur auxotrophie en histidine compensée et poussent sur le milieu sélectif manquant de tryptophane, de lysine et d'histidine.

V. ETUDE DU ROLE DE Gcm-Gcm2 DANS L'HEMATOPOIESE POST-EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE

A. *dpias* : un interacteur de Gcm identifié par double hybride chez la levure

A l'issue du crible double hybride, *dpias* a été identifié comme cofacteur potentiel de Gcm chez la levure (voir page 95-96 et **Figure 39**). Chez la drosophile, le gène *dpias* est le seul gène qui code pour une protéine de la famille des PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT), protéines connues pour leur rôle d'inhibition sur les facteurs de transcription STATs. Il code pour trois isoformes protéiques qui diffèrent dans leurs 22 derniers acides aminés en C-terminal (**Figure 39B**). La partie de *dpias* identifiée en double hybride recouvre une région commune aux trois isoformes (acides aminés 57 à 295), il n'est donc pas possible de savoir quelle(s) isoforme(s) interagit avec Gcm. Parallèlement, les différentes constructions de Gcm qui ont été utilisées en double hybride chez la levure (voir RESULTATS – IV – Tableau 3) indiquent que le domaine PEST est requis pour l'interaction Gcm-*dpias*. En effet, *dpias*⁵⁷⁻²⁹⁵ est capable d'interagir avec un fragment de Gcm contenant le domaine de liaison à l'ADN (**Figure 39C**), la séquence de localisation nucléaire ainsi que la séquence PEST de Gcm (AA 1-261), par contre cette interaction n'a pas lieu avec le même fragment dépourvu de la séquence PEST (AA 1-233) (**Figure 39C**).

B. Induction de tumeurs mélaniques en condition mutante perte de fonction pour *gcm-gcm2* et *dpias*

Chez la drosophile, *dpias* a été mis en évidence pour son rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation JAK/STAT (Mohr et Boswell, 1999 ; Betz et al., 2001 ; Hari et al., 2001) et pour sa participation à l'hématopoïèse larvaire (Betz et al., 2001 ; Hari et al., 2001) (voir

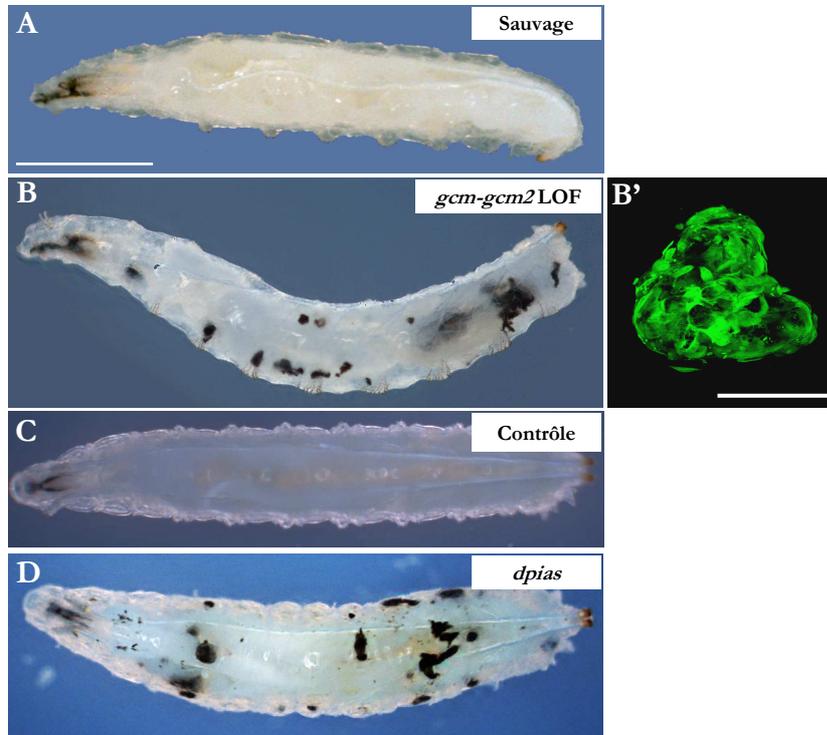


Figure 40. Phénotypes perte de fonction pour *gcm-gcm2* et *dpias*. Photographies de larves L3 sauvage (A), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP* (*gcm-gcm2* LOF, B), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP* (Contrôle, C), *dpias¹/dpias²* (*dpias*, D). (B') Tumeurs présentes dans les animaux *gcm-gcm2* LOF (induction en L1). Les pertes de fonctions pour *gcm-gcm2* ont été induites en L1 en plaçant les larves à 29°C jusqu'en L3. Les larves contrôles ont subi le même traitement. Les larves sauvages et les larves *dpias* sont quant à elles restées à 25°C. Les larves pertes de fonction pour *gcm-gcm2* (B) et *dpias* (D) présentent de nombreuses tumeurs mélaniques alors que les larves exprimant une construction dominant négatif mutée dans le domaine de liaison à l'ADN de Gcm ne présentent aucune tumeur dans leur hémocoel (C). (B') Les tumeurs mélaniques correspondent à un agrégat de plasmatocytes, de cellules à cristaux et de lamellocytes entre eux. Barres d'échelle en A : 1 mm, B' : 250 µm.

INTRODUCTION p. 47-48). Son profil d'expression précis n'a pas été à ce jour déterminé. Dans ce but, des expériences d'hybridation *in situ* sont en cours. Plusieurs allèles mutants pour ce gène existent, cependant les mutants perte de fonction nuls sont létaux en fin d'embryogenèse à l'état homozygote, et les hétérozygotes ne présentent pas de défauts durant le développement (Hari et al., 2001). Par contre, les animaux transhétérozygotes pour les allèles *dpias¹/dpias²* sont viables jusqu'en fin L3-pupe ce qui permet d'analyser la fonction de *dpias* au cours de la vie larvaire (Hari et al., 2001). Le mutant *dpias¹* est un mutant perte de fonction où la Leu³²⁷ est substituée par une Met, et le mutant *dpias²* est un mutant perte de fonction où le Trp²⁶⁰ est substitué par un codon STOP.

Il a été montré que les larves *dpias¹/dpias²* (*dpias* LOF) présentent, dans 3 à 15 % des cas, des tumeurs mélaniques en L3 à 25°C. La pénétrance de ce phénotype augmente avec la température (63 % à 28°C) (Hari et al., 2001). De plus, l'expressivité du phénotype de tumeur mélanique est variable, le nombre de tumeurs dans l'hémocoèle n'étant pas constant. Le phénotype présenté en **Figure 40D** est le plus fort que l'on puisse obtenir à 25°C.

dpias a été révélé comme étant un répresseur de la voie JAK/STAT en interagissant directement avec STAT92E. La perte de fonction de *dpias* entraîne une augmentation de la signalisation de la voie JAK/STAT ce qui se traduit par la présence de tumeurs mélaniques chez les animaux en L3. Afin de déterminer la fonction post-embryonnaire de *Gcm* et/ou *Gcm2*, j'ai procédé à des pertes de fonction conditionnelles à l'aide d'une approche dominant négatif. En effet, la perte de fonction pour *gcm-gcm2* étant létale en fin d'embryogenèse, il n'est pas possible d'utiliser des mutants classiques perte de fonction. La construction dominant négatif *gcm^{DN}* (**Figure 29**), couplée au système TARGET (**Figure 32**) a été utilisée dans le but de contrecarrer la létalité embryonnaire. Cette technique a été préalablement employée avec succès. Effectivement, il a été montré dans différents systèmes que *gcm^{DN}* bloque l'activité de *Gcm* et de *Gcm2* et induit les mêmes phénotypes que ceux observés dans la double perte de fonction *gcm-*

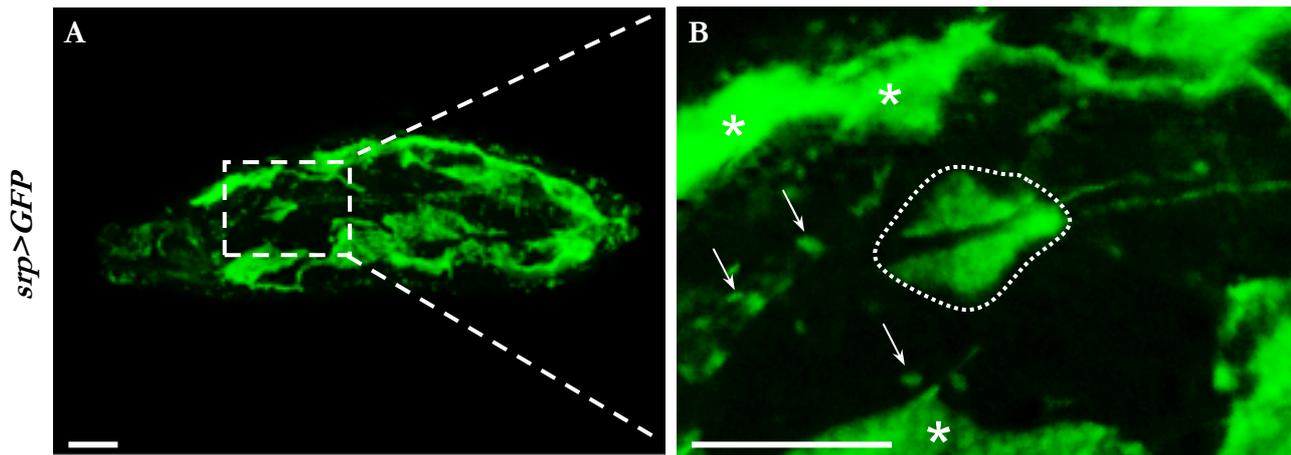


Figure 41. Profil d'expression de *serpent* en L1. (A) Photographie de larve *serpent-Gal4,UAS-encGFP* entière. (B) Montre un agrandissement de la région encadrée en A. Les larves L1 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*) expriment la GFP dans la glande lymphatique (pointillés en B), dans le corps gras (astérisques en B) et dans les hémocytes (têtes de flèches en B). Barres d'échelle 50 μ m.

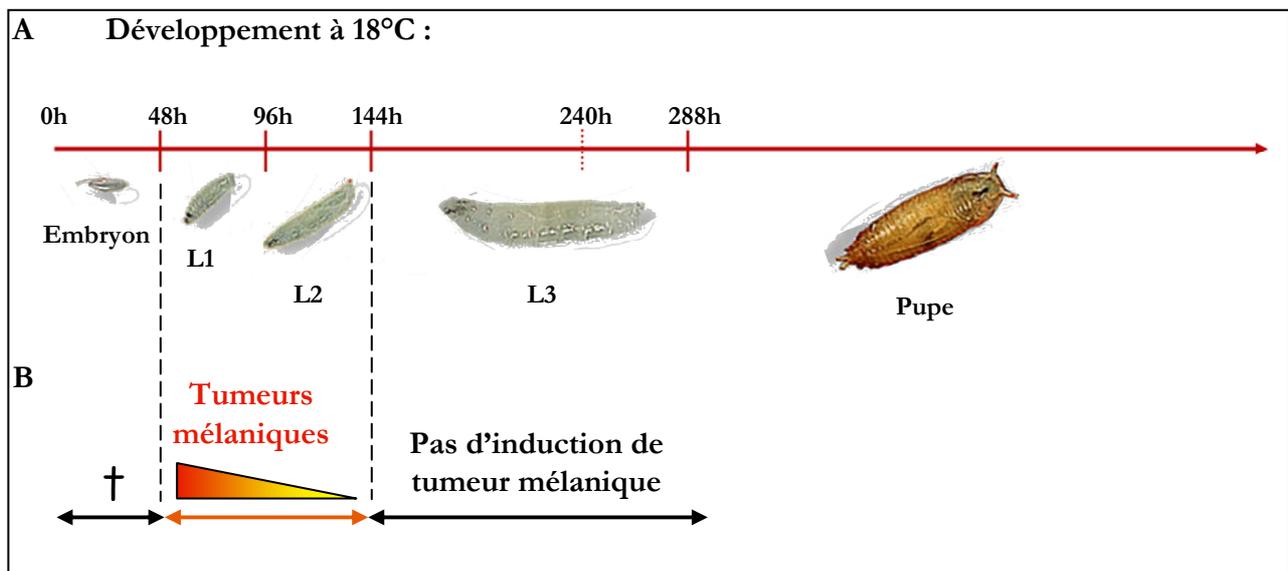


Figure 42. Phénotypes perte de fonction pour *gcm-gcm2*. (A) Cycle de développement de *Drosophila melanogaster* à 18°C. (B) Variation des phénotypes obtenus selon le stade de développement auquel l'expression de la construction dominant négatif (*gcm^{DN}*) est induite (à 29°C). L'induction de *gcm^{DN}* durant l'embryogenèse induit la mort en fin d'embryogenèse. L'induction aux stades L1-L2 aboutit à des phénotypes de tumeurs mélaniques en L3. La force relative du phénotype en L3 selon le moment de l'induction est indiquée par un gradient. Lorsque la perte de fonction *gcm-gcm2* est induite en début L3, aucun phénotype de tumeur mélanique n'est observé mais les animaux meurent en pupes, seulement quelques « fugitifs » parviennent au stade adulte.

gcm2 (*gcm-gcm2* LOF) (Cellules tendon : voir RESULTATS – I ; SNC post-embryonnaire : voir RESULTATS – III). En effet, dans les cellules tendon de l'embryon, où *gcm* et *gcm2* sont tous deux requis, *gcm^{DN}* induit les mêmes phénotypes que dans *gcm-gcm2* LOF (Soustelle et al., 2004). De même, au cours de la vie larvaire, il a été montré que *gcm* et *gcm2* sont requis pour la différenciation des cellules gliales et des neurones de la lamina (Chotard et al., 2005) et que leur absence induit les mêmes phénotypes que ceux obtenus avec *gcm^{DN}* (Soustelle et al., 2007). Nous pouvons donc dire que *gcm^{DN}* mime la double perte de fonction pour *gcm* et *gcm2*.

Pour les expériences de pertes de fonction conditionnelles, le pilote *serpent-Gal4* a été utilisé. En effet, ce pilote dirige l'expression de *Gal4* dans tous les tissus jouant un rôle dans la réponse immunitaire à tous les stades du développement, c'est-à-dire : toute la glande lymphatique, mais aussi dans tous les hémocytes, qu'ils soient circulants ou sessiles, ainsi que dans le corps gras (**Figure 41**). La perte de fonction pour *gcm-gcm2* est induite en L1 (**Figure 42**) par un « shift » à la température restrictive, ce qui entraîne l'inhibition de *Gal80^{ts}* et l'activation du rapporteur *gcm^{DN}* (**Figure 32**). Les animaux *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP* (*srp>gcm^{DN}*) présentent de multiples tumeurs mélaniques dans leur hémocoèle en L3 (**Figure 40**) et meurent en fin L3-début de la vie pupale. Ce phénotype est 100 % pénétrant, c'est le phénotype le plus fort décrit jusqu'à présent chez les mutants qui affectent l'hématopoïèse larvaire. De façon intéressante, ces animaux présentent un délai dans le développement ainsi qu'une désintégration du corps gras (**Figure 43**) comme il a été observé chez les mutants *hop^{Tum-1}* où la voie JAK/STAT est constitutivement activée (Harrison et al., 1995 ; Luo et al., 1995). Il est important de noter qu'aucun phénotype n'est observé chez les larves *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP* (*srp>gcm^{N7-4DN}*, dominant négatif muté) qui ont été soumises au même régime de température (**Figure 40**). De même, les lignées *srp>gcm^{DN}* et *srp>gcm^{N7-4DN}* ne présentent aucun phénotype à température permissive (18°C).

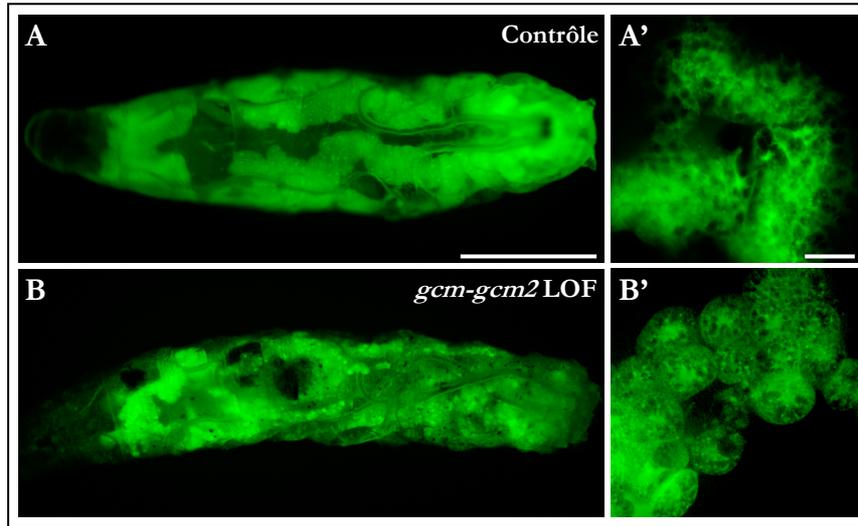


Figure 43. Phénotypes perte de fonction pour *gcm-gcm2*. (A-B) Photographies de larves L3 en macroscopie à fluorescence, *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP* (A,A' Contrôle), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP* (B,B' *gcm-gcm2* LOF). (A',B') Fort grossissement montrant le corps gras des larves en A et B. (A,A') Les larves contrôles ont un corps gras compact alors que les larves *gcm-gcm2* LOF montrent une désintégration de celui-ci (B) qui prend un aspect de polystyrène (B'). Barres d'échelle en A : 1 mm, A' : 30 μ m.

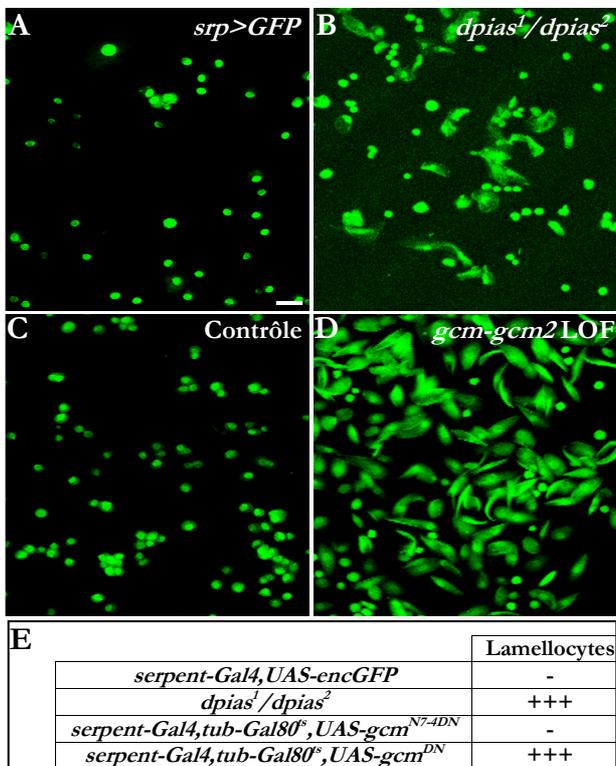
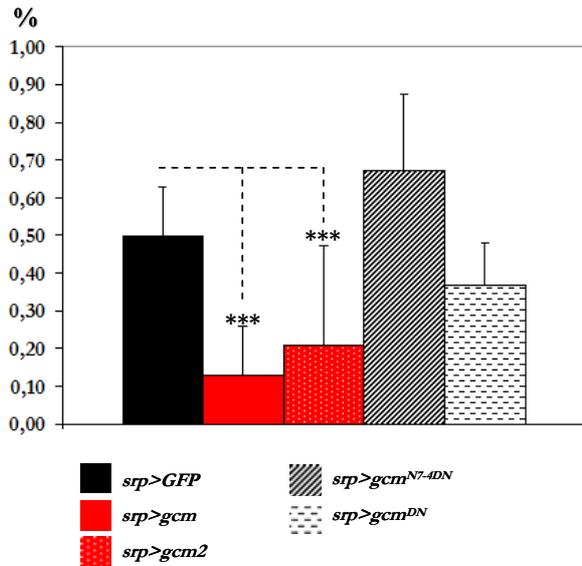


Figure 44. Induction de lamellocytes dans les pertes de fonction pour *gcm-gcm2* et *dpias*. Hémocytes en circulation chez des larves L3 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*, A), *dpias¹/dpias²* (B), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP* (Contrôle, C), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP* (*gcm-gcm2* LOF, D). Les pertes de fonctions pour *gcm-gcm2* ont été induites en L1 en plaçant les larves à 29°C jusqu'en L3. Les larves contrôles et les larves *serpent-Gal4,UAS-encGFP* ont subi le même traitement. Les larves *dpias¹/dpias²* sont quant à elles restées à 25°C. Les larves pertes de fonction pour *dpias* (B) et *gcm-gcm2* (D) présentent des lamellocytes dans leur hémolymphe (grosses cellules aplaties en B et D) alors que les larves exprimant une construction dominant négatif mutée dans le domaine de liaison à l'ADN de Gcm ainsi que les larves *serpent-Gal4,UAS-encGFP* n'ont aucun lamellocyte dans leur hémolymphe (A,C). (E) Tableau récapitulatif. Barre d'échelle 20 μ m.

Afin de déterminer à quel moment du développement larvaire la fonction de *gcm* et/ou *gcm2* est requise, j'ai induit l'expression de *gcm^{DN}* à différents stades du développement larvaire (L1 à fin L3). La perte de fonction de *gcm-gcm2*, induite entre le stade L1 et L2, aboutit à des larves en fin L3 ayant des tumeurs mélaniques (**Figure 42**). De façon intéressante, plus la perte de fonction *gcm-gcm2* est réalisée tôt au cours de la vie larvaire plus la pénétrance et l'expressivité augmentent (plus de tumeurs mélaniques dans l'hémocoèle). Par contre, la perte de fonction *gcm-gcm2*, induite en L3, n'induit aucune tumeur mélanique en fin L3. Il pourrait être intéressant de réaliser une perte de fonction pour *gcm-gcm2* en L2, qui induit un phénotype plus modéré, en contexte hétérozygote pour *gcm*, afin de déterminer si l'expressivité du phénotype augmente, ce qui réaffirmerait notre approche par *gcm^{DN}* dans ce système.

Afin de comparer plus précisément les phénotypes observés dans les expériences de perte de fonction *gcm-gcm2* et *dpia*s, la composition hémocytaire des larves en fin L3 a été déterminée. Dans ce but, l'hémolymphe de chaque larve est récupérée sur une lame en verre. Les hémocytes vont s'y fixer permettant ainsi de réaliser un immunomarquage. Dans les larves contrôles, *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-encGFP* et *srp>gcm^{N7-4DN}*, qui ont été placées à température restrictive en L1, la population hémocytaire se compose uniquement de plasmatoctes et de cellules à cristaux (**Figure 44A,C**). Par contre, en conditions *dpia*s et *gcm-gcm2* LOF, bien que la quantité de plasmatoctes et de cellules à cristaux reste la même, une augmentation du nombre total d'hémocytes est évidente, due à la présence de nombreux lamellocytes dans l'hémolymphe (**Figure 44B,D**).

Gcm et *dpia*s interagissent physiquement chez la levure. Afin de vérifier leur implication dans le même processus cellulaire, les relations épistatiques entre *gcm-gcm2* et *dpia*s ont été analysées. Les différents allèles mutants pour *dpia*s : *dpia*s¹, *dpia*s² ou *dpia*s⁰³⁶⁹⁷ ont été croisés avec les différents allèles mutants pour *gcm* et *gcm-gcm2* : *gcm*²⁶, *gcm*³⁴, *gcm*^{N74} ou *Df(2L)132*. Cependant, aucun transhétérozygote ne présente de tumeur mélanique en L3, ceci pouvant s'expliquer par le fait qu'aucun de ces mutants ne montre de défaut à l'état hétérozygote, donc la combinaison de



Graphique 2. Les hémocytes en circulation prolifèrent moins dans les mutants gain de fonction pour *gcm* et *gcm2*. Histogramme représentant le pourcentage d'hémocytes en division dans des larves L3 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP* ; noir) ; *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm,UAS-encGFP* (*srp>gcm* ; rouge) ; *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm2,UAS-encGFP* (*srp>gcm2* ; rouge à pois blancs) ; *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP* (*srp>gcm^{N7-4DN}* ; noir rayé) ; *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP* (*srp>gcm^{DN}* ; blanc à tirets noirs) (n=10). Pour chaque génotype, l'induction des transgènes a été faite en L1 en plaçant les larves à 29°C jusqu'à leur analyse en L3. L'expression ectopique de *gcm* et de *gcm2* entraîne une diminution de la prolifération hémocytes. Les barres représentent la déviation standard. Test de Student, *** P<0,001.

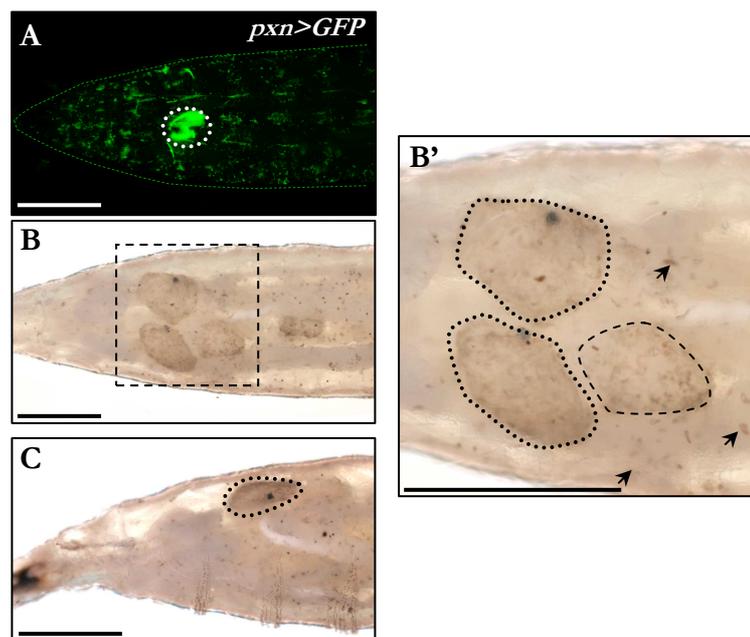


Figure 45. Induction de lamellocytes dans la glande lymphatique dans les mutants perte de fonction pour *gcm-gcm2*. (A) Photographie de larve L3 *peroxidasin-Gal4,UAS-encGFP* (*pxn>GFP*). La GFP est exprimée dans la glande lymphatique (pointillés), ainsi que dans les plasmatocytes sessiles et circulants. (B-C) Photographies de larves *gcm-gcm2* LOF avant apparition du phénotype de tumeur mélanique. Les larves ont été chauffées 10 min à 65°C afin d'induire les cascades de mélanisation ce qui permet de visualiser les cellules à cristaux ainsi que les lamellocytes. (B) Vue dorsale montrant la glande de la lymphe hypertrophiée par rapport au contrôle en A. (B') Agrandissement de l'encart en B, les lignes pointillées entourent les lobes primaires de la glande de la lymphe et la ligne interrompue entoure un lobe secondaire. Les flèches montrent des lamellocytes en circulation. (C) Vue latérale montrant la glande de la lymphe entourée en pointillés. Barres d'échelle 500 μm.

ces mutants n'induit également pas de phénotype. L'analyse d'animaux transhétérozygotes *dpias¹ / dpias²* et hétérozygotes pour *gcm* ou *gcm-gcm2* devrait permettre de mettre en évidence une interaction génétique entre *dpias* et *gcm*.

Afin de confirmer que l'augmentation du nombre d'hémocytes provient bien d'une différenciation *de novo* dans la glande lymphatique et non pas d'une prolifération des hémocytes circulants, un immunomarquage anti-PH3 (marqueur de la division cellulaire), a été effectué sur les hémocytes circulants des animaux *gcm-gcm2* LOF. Le pourcentage d'hémocytes en division dans ces animaux est comparable aux animaux sauvages et contrôles (**Graphique 2**). Les lamellocytes présents dans l'hémolymphe proviennent donc bien d'une différenciation *de novo* dans la glande lymphatique.

Les cellules à cristaux contiennent des prophénoxidases (pro-PO) qui, sous l'action de la chaleur colorent la cellule en noir. Les lamellocytes contiennent également des pro-PO, mais en quantité moindre que les cellules à cristaux. Afin de visualiser les cellules à cristaux, ainsi que les lamellocytes, chez des larves *gcm-gcm2* LOF n'ayant pas encore le phénotype de tumeur mélanique, j'ai chauffé pendant 10 min à 65°C les larves afin d'induire les cascades de mélanisation. De façon intéressante, cette expérience montre que ces animaux ont une glande lymphatique hypertrophiée contenant des lamellocytes, ainsi que des lamellocytes en circulation dans l'hémolymphe (**Figure 45**).

C. Le phénotype de tumeurs mélaniques obtenu dans les expériences de perte de fonction *gcm-gcm2* requiert *hop*

Chez la drosophile, la seule kinase de type JAK impliquée dans la voie JAK/STAT s'appelle Hop. Il a été décrit que la formation des lamellocytes nécessite *hop* (Sorrentino et al., 2002) et que les mutants gain de fonction *hop* développent des tumeurs mélaniques dues à une agrégation de lamellocytes dans l'hémolymphe (Harrison et al., 1995 ; Luo

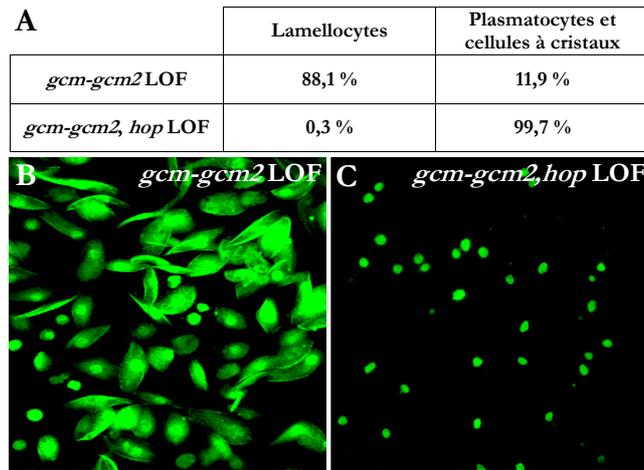


Figure 46. Le phénotype de tumeurs mélaniques induit par la perte de fonction *gcm-gcm2* requiert *hop*. (A) Tableau représentant le pourcentage des différents types hémocytaires dans une larve au troisième stade larvaire. Ce pourcentage a été obtenu après comptage de la population hémocytaires circulantes de 10 animaux (n=10). L'induction de la perte de fonction pour *gcm-gcm2* a été réalisée en plaçant les larves L1 à 29°C jusqu'au moment de l'analyse. Les larves contrôles ont subi le même traitement. Les larves mutantes perte de fonction pour *gcm-gcm2* présentent une quantité importante de lamellocytes (B) alors que l'introduction d'une mutation perte de fonction pour *hop* supprime le phénotype (C).

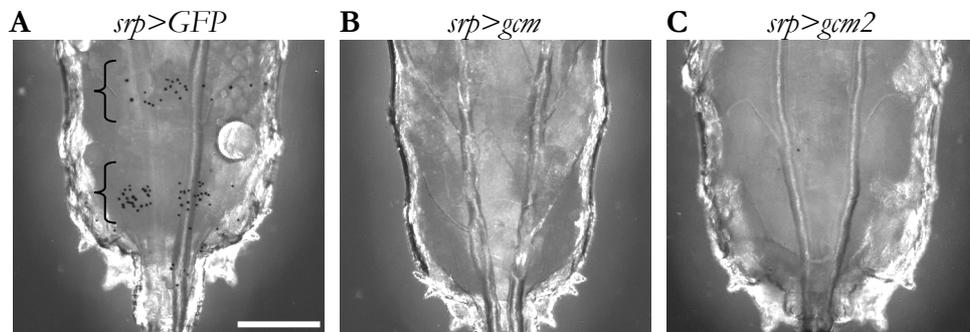


Figure 47. L'expression ectopique de *gcm* et de *gcm2* induit la perte complète des cellules à cristaux matures de la larve. Les deux derniers segments postérieurs de larves L3 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*, A), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm,UAS-encGFP* (*srp>gcm*, B) et *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm2,UAS-encGFP* (*srp>gcm2*, C) sont présentés. L'expression ectopique de *gcm* et de *gcm2* a été induite en L1 en plaçant les larves à 29°C, les larves contrôles *srp>GFP* ayant subi le même traitement. Les larves des différents génotypes ont été chauffées 10 min à 65°C, processus qui induit le noircissement des cellules à cristaux matures, qui sont par conséquent visibles à travers la cuticule de la larve. Sur ces photos, ce sont majoritairement les cellules à cristaux sessiles qui sont visibles. Les larves L3 *srp>GFP* possèdent des cellules à cristaux matures (A, accolades noires) alors que les larves L3 *srp>gcm* et *srp>gcm2* (B,C) n'en n'ont aucune. Barre d'échelle 100 µm.

et al., 1995 ; Zettervall et al., 2004). Afin de déterminer si la voie JAK/STAT est requise pour l'induction de lamellocytes et tumeurs mélaniques observés chez les animaux *gcm-gcm2* LOF, j'ai réalisé les mêmes expériences en contexte mutant perte de fonction pour *hop*. Les animaux *hop²/Y,serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{DN},UAS-encGFP*, placés à 29°C en L1, ne présentent ni tumeur mélanique, ni lamellocyte dans leur hémolymphe (**Figure 46**). De plus, de façon intéressante, les animaux ont un cycle de développement comparable aux contrôles *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm^{N7-4DN},UAS-encGFP*, et un corps gras intact. Les phénotypes de tumeurs mélaniques, de lamellocytes et de corps gras désintégré induit dans la perte de fonction *gcm-gcm2* nécessitent donc *hop*.

D. Le gain de fonction pour *gcm* et *gcm2* induit une diminution de la prolifération des hémocytes

Afin de compléter l'analyse de la fonction de *gcm* et/ou *gcm2* dans le système hématopoïétique larvaire, des expériences gain de fonction *gcm* et *gcm2* ont été réalisées de façon conditionnelle (système TARGET) en L1 chez des animaux *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm,UAS-encGFP* et *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm2,UAS-encGFP* (*gcm* ou *gcm2* GOF), le gain de fonction de *gcm* ou de *gcm2* induit dès l'embryogenèse étant létal.

L'analyse de la composition de l'hémolymphe de ces animaux, réalisée en comptant le nombre d'hémocytes circulants chez au minimum dix larves par génotypes ($n \geq 10$), montre que les larves *gcm* et *gcm2* GOF ont moins d'hémocytes en circulation (*serpent-Gal4,UAS-encGFP* : 605 ± 176 ; *gcm* GOF : 222 ± 61 ; *gcm2* GOF : 202 ± 67). Un immunomarquage anti-PH3 sur les hémocytes de ces larves confirment une diminution de leur prolifération (**Graphique 2**). De plus, l'hémolymphe ne contient aucune cellule à cristaux (**Figure 47**), en accord avec l'observation que les animaux exprimant ectopiquement *gcm* ou *gcm2* dans les précurseurs des cellules à cristaux présentent une carence en cellules à cristaux matures (Lebestky et al., 2000).

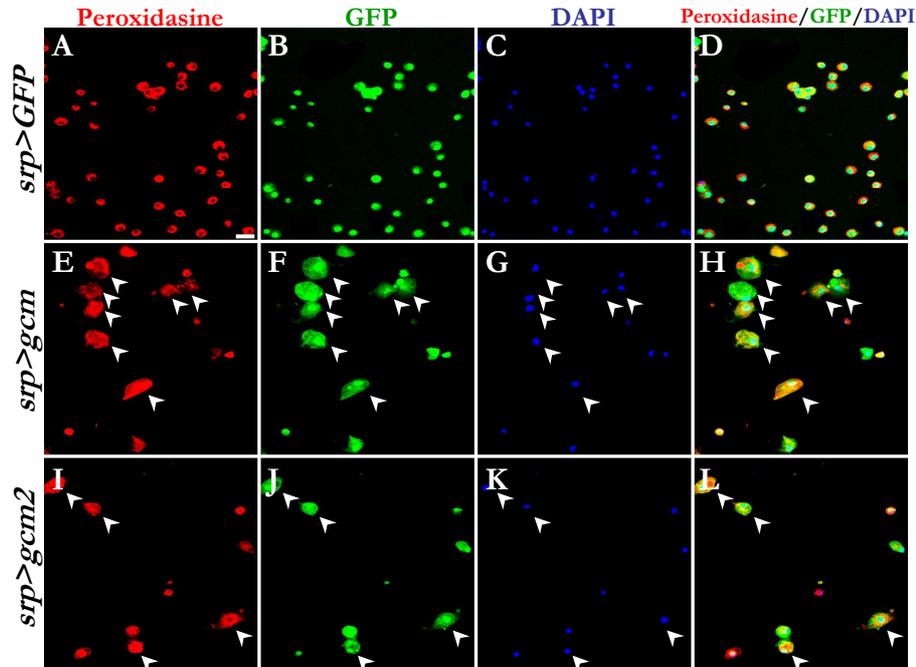


Figure 48. Phénotype gain de fonction *gcm-gcm2* dans les hémocytes circulants. Co-immunomarquage Peroxydase (rouge, A,E,I), GFP (vert, B,F,J) et DAPI (bleu, C,G,K) sur des hémocytes en circulation chez des larves L3 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*, A-D), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm,UAS-encGFP* (*srp>gcm*, E-H), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm2,UAS-encGFP* (*srp>gcm2*, I-L). Les expériences de gain de fonction pour *gcm* ou *gcm2* ont été réalisées en plaçant les larves du premier stade larvaire à 29°C jusqu'en L3. (D,H,L) montre simultanément les trois marquages. Les larves exprimant ectopiquement *gcm* ou *gcm2* présentent des hémocytes exprimant le marqueur des plasmatocytes (Peroxydase) qui ne sont pas morphologiquement des plasmatocytes (têtes de flèches E-L). Ces cellules ne sont jamais présentes dans les animaux contrôles. Barre d'échelle : 20 µm.

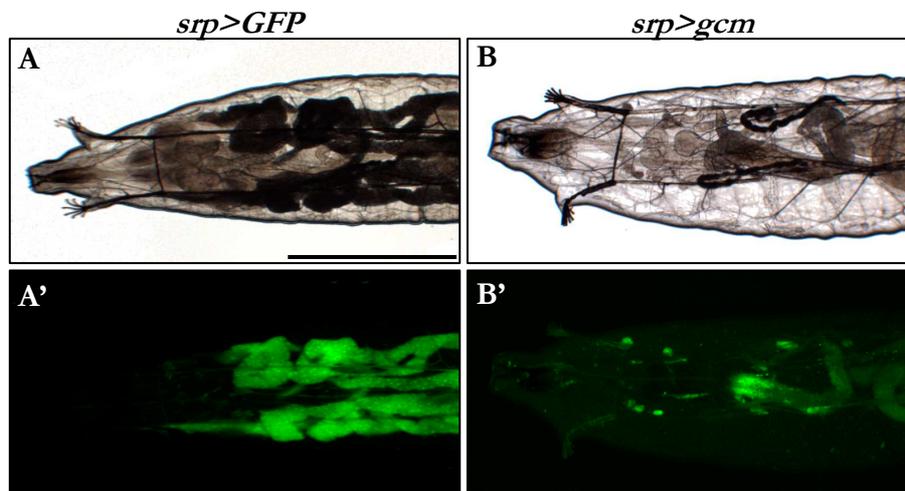


Figure 49. Les animaux exprimant ectopiquement *gcm* n'ont plus de corps gras. Larves L3 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*, A,A'), *serpent-Gal4,tub-Gal80^{ts},UAS-gcm,UAS-encGFP* (*srp>gcm*, B,B'), Les expériences de gain de fonction pour *gcm* ont été réalisées en plaçant les larves L1 à 29°C jusqu'en L3. (A,B) Photographie en macroscopie inversée à fond clair. (A',B') Photographie des larves A,B en macroscopie à fluorescence. Les larves *srp>GFP* ont un corps gras opaque à la lumière (A) et qui est visible en GFP, la lignée pilote *serpent-Gal4* dirigeant l'expression de la GFP dans le corps gras. Les larves *srp>gcm* sont quant à elles translucides, il n'y a plus de corps gras (B), ce qui est également visible par l'absence de GFP en (B'). Le peu de GFP visible n'est pas spécifique du corps gras. Barre d'échelle : 1 mm.

De manière surprenante, dans l'hémolymphe des animaux *gcm* ou *gcm2* GOF, il peut être noté la présence hémocytes Peroxidasin positifs (marqueur des plasmacytes) qui ne montrent pas les caractéristiques morphologiques des plasmacytes ni d'aucun type d'hémocyte décrit à ce jour. Il s'agit peut être de cellules à cristaux adoptant les caractères plasmacytaires sous l'action de *gcm* ou *gcm2* (**Figure 48**), cependant la proportion de ces cellules est plus importante que la proportion de cellules à cristaux en circulation en conditions sauvages. Un immunomarquage à l'aide d'un marqueur de cellule à cristaux pourra valider cette hypothèse. Dans cette optique je me suis procurée un anticorps dirigé contre la protéine Lozenge, mais celui-ci ne fonctionne pas sur les préparations d'hémocytes en circulation.

Finalement, en fin L3, les larves *gcm* ou *gcm2* GOF ne présentent jamais de tumeurs mélaniques. Par contre, fait étonnant, les animaux présentent une absence totale ou quasi-totale de corps gras (**Figure 49**), ainsi qu'une disparition de la glande lymphatique. L'utilisation de marqueurs neuraux ou de tendons permettra de savoir si le corps gras a été transformé en un autre type cellulaire ou s'il a été éliminé.

E. Approche génétique pour la recherche des tissus nécessitant la fonction de *gcm-gcm2*

Nous avons vu précédemment que la perte de fonction de *gcm-gcm2* induite en L1 à l'aide de la lignée pilote *serpent-Gal4* aboutissait à la formation de tumeurs mélaniques en L3. Cette lignée pilote étant exprimée dans les différents territoires hématopoïétiques, il ne nous est pas possible de savoir où la fonction de *gcm-gcm2* est requise. J'ai donc réalisé des expériences de perte de fonction *gcm-gcm2* avec différentes lignées pilotes afin de cibler spécifiquement certains de ces territoires (**Tableau 4**). Pour l'ensemble des lignées utilisées, les expériences *gcm-gcm2* LOF ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites en début du paragraphe.

← Tissues d'expression →

Lignée pilote	Glande lymphatique	Détails	Hémocytes			Corps gras	Autres tissus	Phénotypes en perte de fonction pour <i>gcm-gcm2</i>
			Pro-hémocytes	Cellules à cristaux	Plasmotocytes			
<i>serpent</i>	+	ZC, ZM, CSP	+	+	+	+	-	Tumeurs mélaniques
<i>gcm</i>	?	-	-	-	-	-	Système nerveux, cellules pérित्रachéales	Mort en L1-L2
<i>peroxydasine</i>	+	ZC	?	-	+	-	-	-
<i>lozenge</i>	+	ZC	+	+	-	-	-	-
<i>collagen</i>	-	-	?	+	+	+	ZC en L3	Mort en L2, tumeurs mélaniques si <i>gcm^{DN}</i> induit en L2
<i>serrate</i>	+	CSP	-	-	-	-	Cellules pérित्रachéales, intestin, système nerveux	Mort en L2
<i>hemolectin</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>domeless</i>	+	ZM	-	-	-	-	Glandes salivaires, intestin, trachées	-
<i>Lsp2</i>	-	-	-	-	-	-	Corps gras en L3	-
<i>hemese</i>	+ (très faible)	ZC, ZM, CSP	+	+	+	-	Glandes salivaires, intestin	-

ZC : Zone Corticale

ZM : Zone Médullaire

CSP : Centre de Signalisation Postérieur

Tableau 4. Tissus nécessitant la fonction de *gcm-gcm2*. Profil d'expression en L1 des différentes lignées pilotes utilisées pour effectuer des pertes de fonctions conditionnelles de *gcm-gcm2*, du stade L1 à L3, à l'aide de la lignée rapporteur *tub-Gal80^{ts};UAS-gcm^{DN}*. Les phénotypes observés sont indiqués dans la dernière colonne.

La première lignée pilote utilisée fut la lignée *gcm-Gal4*. En effet, il est logique d'exprimer la construction *gcm^{DN}* tout d'abord à l'aide de cette lignée pilote qui possède un « enhancer trap » *Gal4* dans le promoteur de *gcm*. L'induction de la perte de fonction de *gcm-gcm2* entraîne la mort précoce des animaux. En effet, cette lignée pilote reflète le domaine d'expression de *gcm*, c'est-à-dire qu'elle dirige l'expression de *Gal4* dans des lignages gliaux et neurogéniques ((Soustelle et Giangrande, 2007b ; Soustelle et al., 2007) et résultats non montrés). La perte de fonction dans ces tissus entraîne donc la mort des larves. Si la perte de fonction *gcm-gcm2* est induite plus tardivement (fin L2/début L3) les animaux ne présentent pas de tumeur mélanique en fin L3 (Tableau 4).

La lignée *collagen-Gal4* exprime le gène *Gal4* dès L1 dans les plasmotocytes, les cellules à cristaux et le corps gras. Lorsque l'induction de *gcm^{DN}* est réalisée à partir de L1, les larves meurent en L2. Par contre, lorsque l'induction de *gcm^{DN}* débute en L2, quelques larves (2-3 %) présentent des tumeurs en L3.

La lignée *serrate-Gal4* exprime le gène *Gal4* dès L1 dans le centre de signalisation postérieur (CSP) de la glande lymphatique mais aussi au niveau du système nerveux. L'induction du *gcm^{DN}* à partir de L1 entraîne la mort prématurée en L2, probablement dû au rôle de *gcm-gcm2* dans le système nerveux. L'induction de *gcm^{DN}* en début L3 n'induit pas de phénotype et les individus sont viables.

Parmi les autres lignées utilisées, *peroxidasin-Gal4* (expression dans la ZC et dans les plasmotocytes), *lozenge-Gal4* (expression dans les prohémyocytes et dans les cellules à cristaux), *hemlectin-Gal4* (expression dans les prohémyocytes et dans les plasmotocytes), *domeless-Gal4* (expression dans la zone médullaire de la glande lymphatique), *hemese-Gal4* (expression dans tous les hémyocytes et faiblement dans la glande lymphatique) expriment le gène *Gal4* dès L1 dans différents territoires hématopoïétiques excepté le corps gras et le CSP. Aucun phénotype n'a été observé avec ces lignées et les animaux sont viables jusqu'au stade adulte dans tous les cas. La

lignée *Lsp2* qui exprime le gène *Gal4* dans le corps gras mais uniquement à partir de L3 n'induit également pas de phénotype et les animaux sont viables jusqu'au stade adulte.

L'utilisation de ces lignées pilotes permet donc d'éliminer une éventuelle fonction de *gcm-gcm2* dans la zone corticale et dans la zone médullaire de la glande lymphatique, ainsi que dans les hémocytes. Pour ce qui est du centre de signalisation postérieur (CSP), les lignées pilotes qui induisent une perte de fonction pour *gcm-gcm2* dans ce territoire sont également exprimées dans d'autres tissus. Ceci explique la mort prématurée des larves, ce qui ne permet pas une analyse en L3. Pour finir, les trois lignées pilotes dirigeant *gcm^{DN}* dans le corps gras sont (i) *serpent-Gal4* qui donne un phénotype 100 % pénétrant, (ii) *collagen-Gal4* où le phénotype est variable (voir ci-dessus) et (iii) *Lsp2*, une lignée pilote ne permettant qu'une perte de fonction pour *gcm-gcm2* en L3, qui ne donne aucun phénotype. La fonction de *gcm-gcm2* peut donc être requise dans le CSP ou dans le corps gras, et ceci à un stade précoce du développement larvaire (L1-L2).

F. Domaine d'expression de *gcm* et de *gcm2*

1. Détermination du profil d'expression de *gcm* dans les tissus hématopoïétiques aux stades post-embryonnaires

1.1. Les lignées piège à enhancer

Dans le but de déterminer le domaine d'expression de *gcm* aux stades où la perte de fonction de *gcm-gcm2* entraîne des tumeurs mélaniques en fin L3, des larves *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP*, en L1-L2, ont été analysées en macroscopie à fluorescence. Le microscope permet d'observer de grands échantillons sans les détruire, avec de grands champs de vision et distances de travail, le tout avec une bonne résolution. Cette approche a tout d'abord été utilisée car elle est

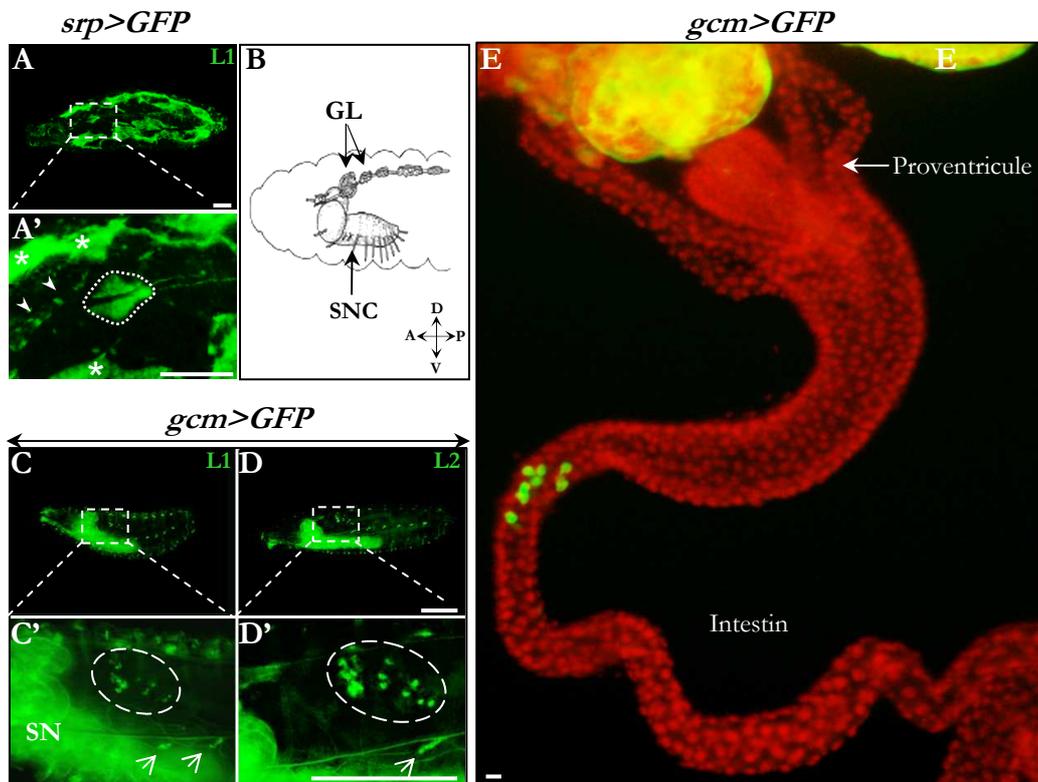


Figure 50. Profil d'expression de *gcm* et de *serpent*. (A,A';C-E) Larves entières analysées en microscopie à fluorescence *serpent-Gal4,UAS-encGFP* (*srp>GFP*, A,A') et *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP* (*gcm>GFP*, C-E). A',C' et D' montrent respectivement un agrandissement de la région encadrée en A,C et D. (B) Schéma montrant l'organisation du système nerveux central (SNC) et de la glande lymphatique (GL) dans une larve L1. La disposition des axes antéro-postérieur (A-P) et dorso-ventral (D-V) est indiquée. (E) Coimmunomarcage GFP (vert) et DAPI (rouge) sur larve L1 *gcm>GFP*. (A,A') Les larves L1 *srp>GFP* expriment la GFP dans la glande lymphatique (pointillés en A'), dans le corps gras (astérisques en A') et dans les hémocytes (têtes de flèches en A'). (C-E) Les larves L1 *gcm>GFP* (C,C') et L2 (D,D') expriment la GFP dans le système nerveux (SN en C'), les cellules péritrachéales (flèches en C',D'), mais également dans un groupe de cellules localisées vers l'emplacement de la glande lymphatique (ligne interrompue C',D'). Ces cellules correspondent à des cellules intestinales de la larve (E). Barres d'échelle en A, A', D et D' : 50 μm , en E : 5 μm .

non invasive et permet de reconnaître les tissus selon leur localisation et leur forme/aspect. Le profil d'expression de la GFP a été comparé à celui de larves *serpent-Gal4,UAS-encGFP* aux mêmes stades de développement (**Figure 50**). Les larves *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP* expriment la GFP dans le système nerveux, dans les cellules pérित्रachéales, ainsi que dans un groupe de cellules localisées au même endroit géographique que la glande lymphatique (**Figure 50C',D'**). Afin de vérifier si ces cellules correspondent bien à la glande lymphatique, les larves ont été disséquées et il s'avère que la GFP est exprimée dans certaines cellules intestinales (**Figure 50E**). De même, aucune expression n'est observée au niveau du corps gras.

L'analyse de trois autres lignées piège à enhancer *Gal4* dans *gcm* : *gcm^{NP4229}*, *gcm^{NP4822}* et *gcm^{KG01117}*, croisées avec une lignée rapporteur GFP, ne montrent également pas d'expression de la GFP dans la glande lymphatique, ni dans le corps gras (résultats non montrés).

L'expression de la GFP pouvant être faible et non visible en macroscopie, il n'est pas possible d'être totalement sûr que *gcm* ne soit pas exprimé dans la glande lymphatique. J'ai donc réalisé des expériences de co-immunomarquages anti-GFP et anti-Odd Skipped, ou anti-Mes2 (deux marqueurs de la glande lymphatique) sur des larves *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP* en L1. De même, des co-immunomarquages anti-β-Gal et anti-Odd Skipped ou anti-Mes2 ont également été réalisés en L1 sur une autre lignée piège à enhancer : *gcm^{r^{A87}}*, qui exprime le gène de la β-galactosidase (β-gal) selon le profil d'expression de *gcm*. Cependant, aucune colocalisation entre les marqueurs de la glande lymphatique et la GFP ou la β-Gal n'a été observée (résultats non montrés). De plus, il a été montré que la lignée *gcm-Gal4,UAS-lacZ* n'exprime pas la β-gal dans la glande lymphatique en L3 (Bataille, 2006). Ces résultats laissent ainsi plusieurs possibilités :

- les lignées « enhancer-trap » ne reflètent pas complètement le profil de *gcm* en L1,
- *gcm2* mais pas *gcm* est exprimé et requis,
- ni *gcm* ni *gcm2* ne sont exprimés dans la glande lymphatique.

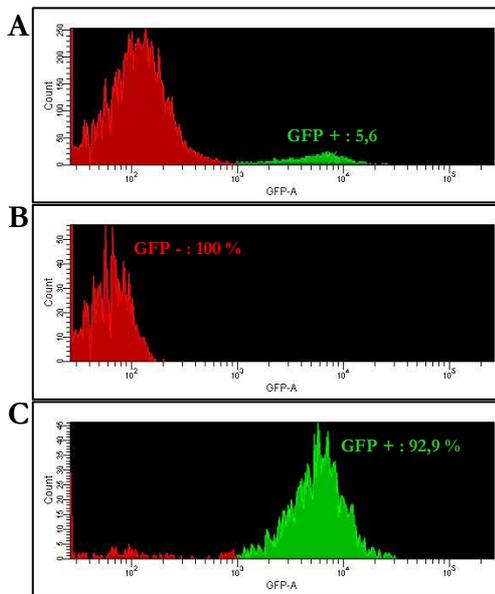


Figure 51. Tri de cellules par cytométrie en flux à partir de larves *serpent-Gal4,UAS-encGFP*. (A) Les cellules issues de larves L1 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* sont triées afin de séparer celles n'exprimant pas la GFP (B) des celles GFP positives (C). L'axe des ordonnées correspond au nombre de cellules comptées et l'axe des abscisses correspond à une échelle logarithmique de l'intensité de la fluorescence des cellules. La pureté de chaque population est indiquée en pourcentage sur le graphique.

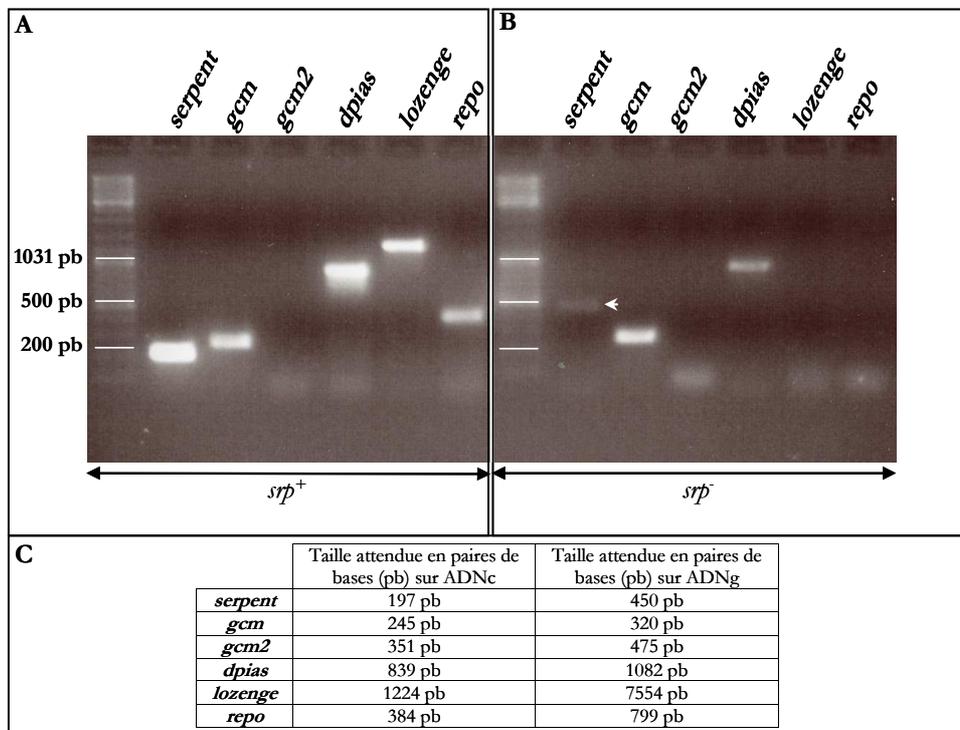


Figure 52. Expérience de RT-PCR sur cellules triées par cytométrie en flux à partir de larves L1 *serpent-Gal4,UAS-encGFP*. La RT-PCR a été réalisée à partir de cellules exprimant *serpent* (A, *sp⁺*) ou non (B, *sp⁻*). Les différents couples d'amorces correspondant aux gènes *serpent*, *gcm*, *gcm2*, *dpias*, *lozenge* et *repo* ont été choisis de part et d'autre d'un intron afin de visualiser une différence de taille dans l'amplification par PCR selon si celle-ci a lieu à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) ou de l'ADN génomique (ADNg) et ont été contrôlés en réalisant une PCR sur une banque d'ADNc (non montré). Le tableau en (C) donne les tailles attendues. (A) Les cellules GFP positives expriment *serpent*, *gcm*, *dpias*, *lozenge* et *repo* (A), tandis que les cellules non GFP n'expriment que *gcm* et *dpias*. *gcm2* n'est pas détecté dans les deux populations de cellules. La tête de flèche en B indique une amplification de la séquence d'ADN génomique de *serpent*.

1.2. Approche par RT-PCR sur cellules *serpent* positives

Etant donné la difficulté à réaliser des immunomarquages sur des larves L1, j'ai entrepris de réaliser des expériences de RT-PCR sur des cellules exprimant *serpent* (spr^+). Dans ce but, des cellules provenant de larves L1 *serpent-Gal4,UAS-encGFP* ont été dissociées et triées par cytométrie en flux (**Figure 51**). Les cellules spr^+ ont été séparées des cellules n'exprimant pas *serpent* (spr^-) puis des expériences de RT-PCR ont été réalisées afin de mettre en évidence l'expression des gènes *serpent* (contrôle), *gcm*, *gcm2*, *dpias*, *lozenge* (exprimé dans les précurseurs des cellules à cristaux et dans les cellules à cristaux matures) et *repo* (marqueur des cellules gliales) (**Figure 52**). Ces expériences (tri de cellules suivi de la RT-PCR) ont été réalisées plusieurs fois et ont donné toujours le même résultat.

Comme attendu, les cellules spr^+ expriment *serpent* et *lozenge*. En effet, la lignée pilote *serpent-Gal4* reflète le domaine d'expression de *spr* et les cellules exprimant *lz* coexpriment *spr* (Bataille et al., 2005). De même, *dpias* est exprimé dans les cellules spr^+ , ce qui est en accord avec le fait que la voie de signalisation JAK/STAT prend siège dans la zone médullaire de la glande lymphatique (Krzemien et al., 2007) ainsi que dans le corps gras en cas de réponse immunitaire humorale (Agaisse et al., 2003). Les cellules spr^- quant à elles n'expriment ni *serpent* ni *lozenge* mais expriment *dpias*. Ceci est en accord avec l'observation que *dpias* contrôle la voie JAK/STAT, une cascade impliquée dans de nombreux processus développementaux (Luo et Dearolf, 2001). Par contre, *repo* a été détecté, avec deux couples d'amorces différents, dans les cellules spr^+ et non dans les spr^- alors que ce gène est exprimé uniquement dans les cellules gliales, cellules exclues du domaine *serpent*. Il semble donc que, malgré la qualité de la séparation des cellules, (les cellules spr^+ étant pures à plus de 92 % et les spr^- à 100 % ; **Figure 51**) on ne peut exclure une contamination des cellules spr^+ par des cellules exprimant *repo*, cependant ceci n'explique pas le fait que *repo* ne soit pas détecté dans les spr^- . Un immunomarquage anti-Repo sur les cellules spr^+ et spr^- permettra de vérifier si Repo est bien présent dans les cellules spr^+ et non dans les spr^- .

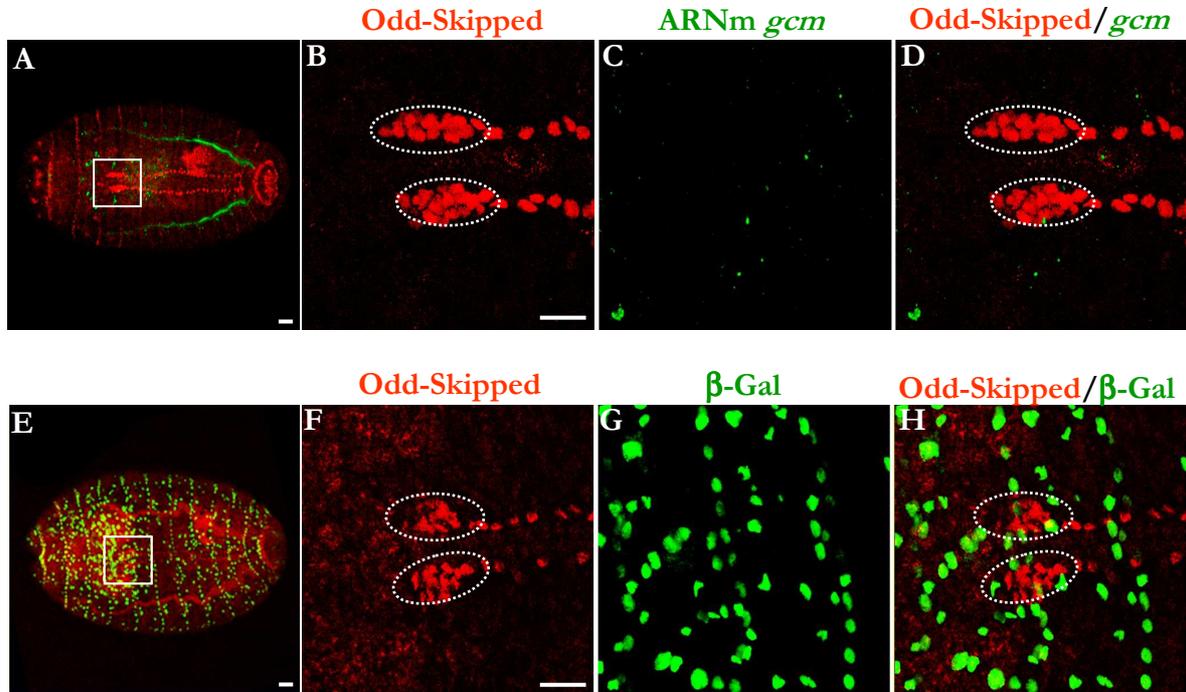


Figure 53. *gcm* n'est pas exprimé dans la glande de la lymphe durant l'embryogenèse. (A-D) Immunomarquage Odd-Skipped (B) et hybridation *in situ gcm* (C) sur des embryons sauvages au stade 16. (A) montre une projection partielle de l'embryon. La zone encadrée correspond au grossissement en (B-D). (D) montre simultanément les deux marquages. (E-H) Co-immunomarquage Odd-Skipped (F) et β -Gal (G) sur des embryons *gcm⁴⁸⁷* au stade 16. (E) montre une projection partielle de l'embryon. La zone encadrée correspond au grossissement en (F-H). (H) montre simultanément les deux marquages. Aucune expression de *gcm* ou de β -Gal n'est détectée dans la glande lymphatique (entourée de pointillés). Le fait que des cellules en dehors de la glande lymphatique expriment *gcm* ou la β -Gal indique que le double marquage a marché. On peut noter en H la présence d'une fausse colocalisation due à la projection des différents plans. Barres d'échelle 25 μ m.

Quant aux gènes d'intérêts *gcm* et *gcm2*, on peut voir que *gcm* est exprimé dans les cellules *srp*⁺, ce qui est en accord avec le phénotype *gcm-gcm2* LOF, mais on ne peut pas exclure une contamination par des cellules gliales du pool *srp*⁻ étant donné les résultats obtenus pour *repo*. *gcm2* n'est lui jamais détecté dans les deux populations de cellules, et ce avec 8 couples d'amorces différents ce qui peut s'expliquer par un niveau d'expression de ce gène très faible.

2. *gcm* n'est pas exprimé dans la glande lymphatique embryonnaire

De nombreux gènes exprimés dans la glande lymphatique au cours de la vie larvaire le sont également en fin d'embryogenèse. J'ai donc vérifié si *gcm* est exprimé dans la glande lymphatique embryonnaire, en réalisant un double marquage par immunohistochimie avec l'anticorps anti-Odd-Skipped, qui permet de visualiser la glande lymphatique, et hybridation *in situ* *gcm* sur des embryons sauvages (**Figure 53A**). Aucune colocalisation entre l'ARNm de *gcm* et Odd-Skipped n'est observée dans la glande lymphatique, et ceci à différents stades de développement.

Dans le but de confirmer ce résultat, j'ai également réalisé des co-immunomarquages Odd-Skipped et β -gal sur des embryons *gcm*^{r⁴⁸⁷} (**Figure 53B**). Cette expérience a permis de confirmer que *gcm* n'est pas exprimé dans la glande lymphatique embryonnaire.

Etant donné que l'expression de *gcm* n'a pu être mise en évidence dans la glande lymphatique, l'étude du profil d'expression de *gcm2* n'a pas été vérifiée. En effet, il a précédemment été montré que *gcm2* est exprimé selon un profil d'expression similaire à celui de *gcm*, mais que son niveau d'expression est nettement plus faible ([Kammerer et Giangrande, 2001](#) ; [Alfonso et Jones, 2002](#)).

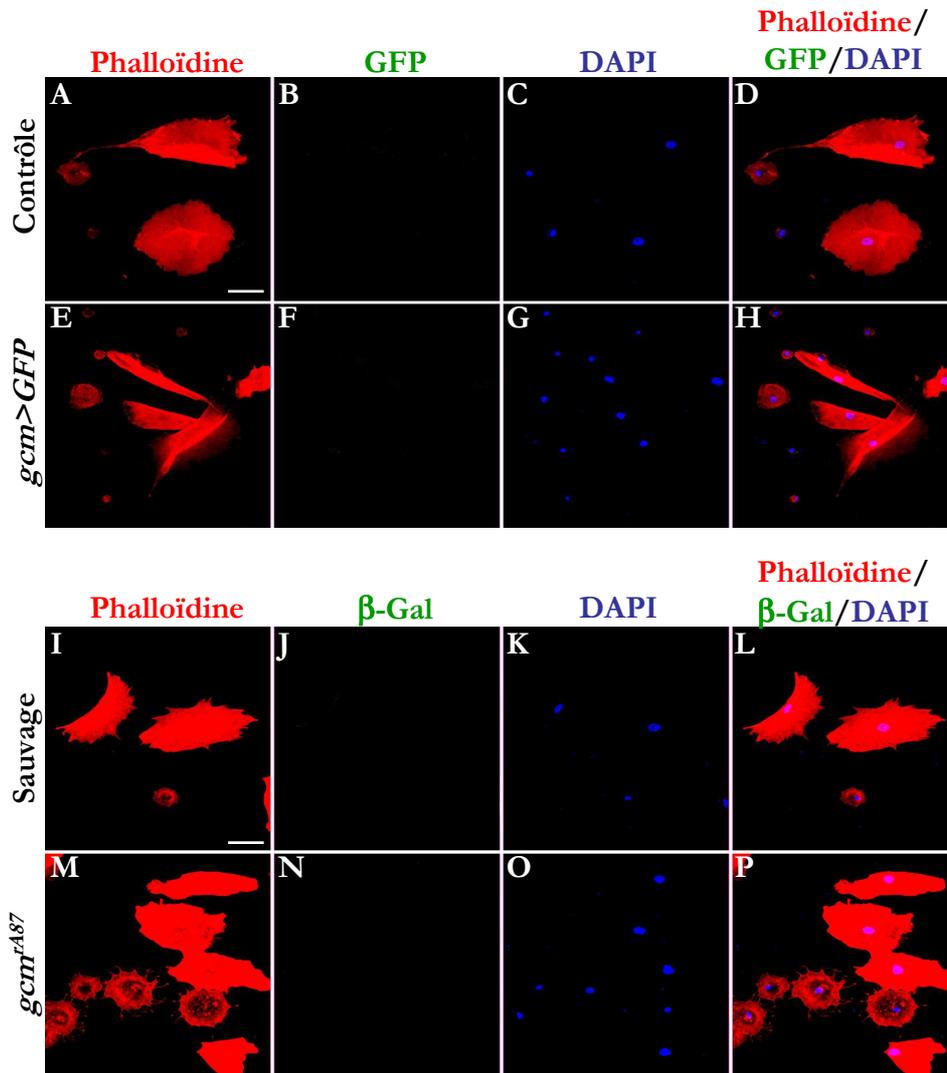


Figure 54. *gcm* n'est pas exprimé dans les hémocytes après parasitage par *Leptopilina bouvardi*. (A-H) Co-immunomarquage Phalloïdine (rouge), GFP (vert) et DAPI (bleu) sur hémocytes de larves L3 *UAS-mCD8 GFP* (Contrôle en A-D) et *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP* (*gcm>GFP* en E-H) parasitées en L2 par *Leptopilina bouvardi*. (I-P) Co-immunomarquage Phalloïdine (rouge), β-Gal (vert) et DAPI (bleu) sur hémocytes de larves L3 sauvages (I-L) et *gcm^{r487}* (I-P) parasitées en L2 par *Leptopilina bouvardi*. (D,H,L,P) montre simultanément les trois marquages. Aucune induction de l'expression de la GFP ou de la β-gal n'est observée. Barres d'échelle en A,I : 25 μm.

G. Analyse des lignées *gcm-Gal4*, *UAS-encGFP* et *gcm^{rA87}* parasitées par *Leptopilina bouvardi*

Etant donné mes difficultés à mettre en évidence le domaine d'expression de *gcm*, j'ai voulu vérifier si l'expression de *gcm* est induite en cas de parasitage par la guêpe *Leptopilina bouvardi*. Des larves *gcm-Gal4,UAS-mCD8 GFP* ou *gcm^{rA87}*, permettant de suivre l'expression de *gcm*, ont donc été parasitées en L2 puis analysées après 48h. Des immunomarquages anti-GFP ou anti- β -gal ont été réalisés sur les hémocytes circulants (**Figure 54**) ainsi que sur des dissections des larves parasitées (résultats non montrés). Cependant, aucune induction de l'expression de *gcm* n'a pu être mise en évidence dans les animaux parasités.

Cette étude, qui est actuellement en cours, a permis de mettre en évidence un rôle pour *gcm* au cours de l'hématopoïèse larvaire. Tout d'abord il a été mis en évidence que *dpias* interagit avec Gcm chez la levure, cette interaction devra être confirmée par des expériences de GST pull down ou par des expériences de coimmunoprécipitation. Dans cette optique, une protéine *dpias* étiquetée avec HA est en construction. La perte de fonction de *gcm-gcm2*, tout comme celle de *dpias*, induit des tumeurs mélaniques en fin de vie larvaire, ce qui sous-entend que ces deux protéines interviennent dans des processus semblables au cours de la vie larvaire. Afin de mettre en évidence les relations d'épistasie entre *gcm* et *dpias*, un recombinant entre un allèle mutant pour *gcm* et un allèle mutant pour *dpias* est en cours de réalisation. Cette lignée, permettra de se mettre en conditions transhétérozygote mutant pour *dpias* et hétérozygote pour *gcm*. Les lignées permettant de réaliser des clones mutants pour *gcm-gcm2* sont également en cours de construction. Ce phénotype de tumeurs mélanique induit par la perte de fonction de *gcm-gcm2* requiert *hop*, ce

qui sous-entend que *gcm* est en amont de la voie de signalisation JAK/STAT. Il serait également intéressant de réaliser des gains de fonction conditionnels pour cette voie de signalisation afin de déterminer dans quel tissu l'activation de cette voie aboutit à la formation de lamellocytes. Les expériences de gain de fonction pour *gcm* ou *gcm2* induit une perte des cellules à cristaux matures, comme observé précédemment (Lebestky et al., 2000). Ces animaux ne possèdent plus de corps gras, ce qui peut résulter d'une transformation de ces cellules en un autre type cellulaire ou d'une élimination de celles-ci par l'organisme. Il serait intéressant de parasiter ces animaux exprimant ectopiquement *gcm* ou *gcm2* afin de voir s'ils sont toujours capables d'induire la différenciation des lamellocytes.

Les gènes *gcm* et *gcm2* ont été identifiés chez la drosophile pour leur rôle de déterminants gliaux au cours de l'embryogenèse, d'où leur nom, *glial cell deficient*/*glial cells missing* (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996). Ces deux gènes sont également connus pour leur rôle de pivot entre le destin plasmocytaire et cellules à cristaux durant l'hématopoïèse embryonnaire (Bernardoni et al., 1997 ; Lebestky et al., 2000 ; Alfonso et Jones, 2002 ; Bataille et al., 2005).

I. La différenciation terminale des cellules tendon embryonnaire nécessite le complexe *gcm-gcm2*

Durant la première partie de ma thèse, nous avons tout d'abord montré que *gcm* et *gcm2* sont coexprimés dans une sous population de cellules tendon embryonnaires, celles en bord de segment attachant les muscles longitudinaux. Ces cellules tendon sont donc différentes des cellules tendon intrasegmentaires attachant les muscles transversaux latéraux et les gènes *gcm-gcm2* constituent donc un nouveau marqueur de ces cellules. De même, les gènes *gcm-gcm2* ne sont pas exprimés dans les cellules tendon de l'adulte, ce qui signifie que celles-ci sont différentes de celles présentes chez l'embryon.

Nous avons montré qu'en l'absence de *gcm-gcm2*, les muscles présentent des défauts d'organisation car les muscles et les cellules tendon sont incapables de former un site d'attachement fonctionnel ce qui est mis en évidence par le fait que les jonctions hémiaadhérentes sont anormales. Ce défaut de différenciation terminale des cellules tendon conduit à des défauts de locomotion chez la larve.

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la cascade *gcm*, nous avons recherché des mutants présentant des phénotypes semblables à ceux observés en perte de fonction pour *gcm-gcm2* au niveau des jonctions hémiaadhérentes entre les muscles et les cellules tendon.

Chez la souris, comme chez la drosophile, les jonctions myotendineuses présentent des interdigitations qui servent à augmenter la superficie de l'attachement entre la fibre musculaire et le tissu connectif du tendon. Une réduction de ces interdigitations a été mise en évidence chez les souris doublement déficientes pour la *dystrophin* et *utrophin* (Deconinck et al., 1997). Chez la drosophile il existe un homologue à ce gène, également nommé *dystrophin*. Ce gène code pour plusieurs isoformes qui sont exprimées de façon prédominante dans le système nerveux, les muscles et les cellules tendon (Neuman et al., 2001 ; Dekkers et al., 2004 ; Neuman et al., 2005). Lors de ma thèse j'ai mis en évidence que *gcm* est suffisant pour induire l'expression du gène *dystrophin* dans les cellules tendon. En effet, l'expression ectopique de *gcm* dans l'épiderme induit l'expression ectopique de *dystrophin*. Très récemment, il a été mis en évidence que la perte de fonction, depuis l'embryogenèse, de l'isoforme exprimée dans le muscle, à l'aide d'un ARN interférent, induit une dégénération musculaire progressive chez la larve et chez l'adulte mais n'induit pas de phénotype au niveau de l'attachement musculaire (van der Plas et al., 2007). Il serait donc très intéressant d'explorer plus en détails le rôle de l'isoforme spécifique aux cellules tendon et plus particulièrement au niveau des jonctions hémiadhérentes de la drosophile. Afin d'éliminer l'isoforme spécifique des cellules tendon, il serait intéressant de construire un ARN interférent spécifique à cet isoforme. Cet outil permettrait d'identifier le rôle de cette isoforme dans la formation des jonctions hémiadhérentes entre les muscles et les cellules tendon. De même, l'utilisation d'un anticorps anti-Dystrophin permettrait de vérifier si *gcm* est nécessaire à l'expression de *dystrophin* dans les cellules tendon, car le niveau de résolution de mes expériences d'hybridation *in situ* pour l'ARNm *dystrophin* ne me permettent pas de conclure quant à l'expression ou non de ce gène en contexte perte de fonction pour *gcm-gcm2*.

Très récemment, il a été mis en évidence un nouveau composé de la matrice extracellulaire (MEC), Thrombospondin, qui fait partie d'une famille de protéines de la MEC qui dirigent des interactions cellule/cellule et des interactions matrice/cellule en se liant à des récepteurs de la membrane plasmique, des protéines de la MEC et des cytokines (Lawler, 2000 ;

Adams, 2001). Thrombospondin est produit spécifiquement par les cellules tendon en bord de segment, et est essentiel pour la formation des jonctions cellules tendon/muscle dépendantes des intégrines (Chanana et al., 2007 ; Subramanian et al., 2007). Le gène *thrombospondin* est exprimé tout au long du développement embryonnaire des cellules tendon (Chanana et al., 2007). Son expression précoce est sous contrôle des informations de position alors que son expression dans les cellules tendon matures est induite par *stripe* (Chanana et al., 2007). De façon très intéressante, les embryons mutants pour le gène *thrombospondin* ne montrent pas de phénotype musculaires jusqu'au stade 16, mais dès que les premières contractions musculaires ont lieu, les muscles se détachent de leurs cellules tendon (Chanana et al., 2007) et ont ensuite tendance à s'attacher à leur muscle voisin (Subramanian et al., 2007). Ces phénotypes ressemblent à ceux observés chez les embryons *gcm-gcm2*. Il serait donc très intéressant de vérifier si *thrombospondin* est également une cible du complexe *gcm-gcm2* ce qui permettrait de mieux comprendre la contribution des voies de signalisation de *stripe* et du complexe *gcm-gcm2* dans la différenciation terminale des cellules tendon.

La mise en place d'un attachement solide entre un muscle et sa cellule tendon est l'étape la plus critique dans le développement des sites d'attachement musculaires. Nous avons montré qu'un défaut à cette étape peut entraîner des défauts d'attachement, mais il est également possible d'observer un détachement musculaire à la première tension, comme chez les embryons mutants pour *myospheroid* qui ne possèdent plus de sous unité intégrine β PS (MacKrell et al., 1988 ; Leptin et al., 1989), ou encore une élongation de la cellule tendon. Par exemple, un gène cible de *stripe*, *shortstop*, code pour une protéine de la famille des Plakins qui forme un complexe protéique avec les protéines EB1/ACP1 qui sont associées à la fin « + » des microtubules en extension (Subramanian et al., 2003). Il a été mis en évidence qu'en perte de fonction pour *shortstop*, EB1/ACP1 se dissocie de la jonction cellule tendon/muscle ce qui entraîne une diminution de la résistance de la cellule tendon au stress mécanique, qui a pour effet d'allonger la cellule tendon (Subramanian et al., 2003). Cependant, chez les embryons *shortstop*, l'association entre la cellule

tendon et le muscle n'est pas affectée car les muscles sont toujours attachés ce qui suggère que d'autres voies moléculaires participent à l'attachement. Les deux voies de signalisation *stripe/gcm* semblent donc participer à différents aspects de la différenciation terminale des cellules tendon et de l'attachement aux muscles.

Chez les embryons *gcm-gcm2*, les marqueurs spécifiques des cellules tendon, dont *stripe*, sont toujours exprimés. L'identification de *Ent2* montre que le complexe *gcm-gcm2* contrôle une nouvelle cascade moléculaire requise dans la différenciation terminale des cellules tendon et dans les interactions muscles/cellules tendon. Bien que *stripe* a été mis en évidence comme le déterminant du destin cellule tendon (Lee et al., 1995 ; Frommer et al., 1996), son expression persiste jusqu'à la fin de l'embryogenèse, ce qui suggère un rôle additionnel plus tardif. Ceci est confirmé par l'observation que la perte de fonction précoce de *stripe*, à l'aide d'une approche dominant négatif, induit un phénotype de détachement des muscles, alors que la perte de fonction à un stade ultérieur du développement induit le même phénotype que chez les embryons *gcm-gcm2* au niveaux des muscles longitudinaux ventraux qui dépassent leur cellule tendon cible (Vorbruggen et Jackle, 1997). *gcm-gcm2* et *stripe* sont donc nécessaires pour la différenciation terminale des cellules tendon et agissent probablement via des cibles communes, comme *alien*. Il serait donc également intéressant de vérifier si le gène *dystrophin* constitue également une cible de *stripe*. Les voies de signalisation *stripe* et *gcm* semblent réguler des aspects différents de l'attachement des muscles aux cellules tendon, ceci probablement via leurs gènes cibles différents (i.e. *Ent2* pour *gcm*, *shortstop* pour *stripe*), et participent également à des aspects semblables de la différenciation terminale des cellules tendon probablement via des gènes cibles communs. Il peut donc être supposé qu'en fin d'embryogenèse ces deux voies de signalisation convergent à nouveau, via *dystrophin* et *thrombospondin*.

Cette première étude a donc permis de mettre en évidence un nouveau rôle du complexe *gcm* au cours de l'embryogenèse. Pour la première fois, ce complexe n'a pas un rôle de choix de destin cellulaire mais est impliqué dans la différenciation terminale d'un tissu. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'expression de *gcm-gcm2* est transitoire dans les précurseurs du système nerveux et des hémocytes alors que leurs transcrits sont présents dans les cellules tendon jusqu'à la fin de l'embryogenèse.

La matrice extracellulaire présente au niveau des jonctions hémiadhérentes cellules tendon/muscles chez la drosophile est très proche de celle présente au niveau des jonctions myotendineuses des vertébrés (Benjamin et Ralphs, 1997 ; Brown, 2000). Lors de prochaines études chez les vertébrés il serait intéressant de regarder si les orthologues de *gcm* sont exprimés au niveau du cartilage.

II. L'interaction entre le déterminant glial Gcm et Hucklebein spécifie un sous type glial

Un système nerveux fonctionnel nécessite différents types de cellules gliales ayant des fonctions particulières (Ito et al., 1995 ; Bossing et al., 1996b ; Schmidt et al., 1997 ; Rowitch, 2004 ; Soustelle et Giangrande, 2004). Chez la drosophile, le déterminant glial *gcm* est connu depuis longtemps mais les mécanismes moléculaires permettant la spécification des sous types gliaux chez la drosophile étaient jusqu'au début de ma thèse totalement inconnus. Pour les neurones, la diversité cellulaire est générée par la combinaison de facteurs de type bHLH distincts qui vont induire l'expression de gènes cibles dans une cellule (Skeath, 1999 ; Bertrand et al., 2002). Dans le cas de la glie, la question se posait de savoir si le déterminant glial participe ou non à la spécification des sous types de glie ou si des voies de signalisations parallèles étaient impliquées.

Lors de ma thèse, j'ai participé à l'étude qui a mis en évidence un mécanisme d'autorégulation de Gcm contrôlé par Hucklebein (Hkb), conduisant à la spécification du sous-type gliale subperineurale (SPG) dans le lignage du neuroglioblaste 1-1 Abdominal (NGB1-1A). Dans ce lignage, la protéine nucléaire Hkb interagit directement avec Gcm et augmente l'affinité de Gcm pour ses sites de liaison à l'ADN, mais n'active pas la transcription bien qu'il se fixe à l'ADN. L'interaction Gcm-Hkb permet une maintenance de l'expression de *gcm* à de hauts niveaux ce qui induit la spécification des cellules gliales en type SPG.

Lors de la recherche des cibles de Gcm, il a été mis en évidence des gènes exprimés dans des sous-types gliaux spécifiques (Freeman et al., 2003 ; Altenhein et al., 2006). L'expression de ces gènes nécessite *gcm* alors que *gcm* seul n'est pas suffisant pour induire leur expression (Freeman et al., 2003 ; Altenhein et al., 2006), il existe donc certainement d'autres cofacteurs lignages spécifiques. A la vue de tous ces résultats, il peut être supposé que la spécification des différents sous-types de glie au cours de l'embryogenèse agit via *gcm* et des cofacteurs lignages spécifiques, le déterminant glial étant au carrefour de ce processus. Il serait intéressant, parmi les gènes cibles de Gcm identifiés au cours des cribles puces à ADN, de vérifier si certains sont spécifiques du lignage NGB1-1A.

III. Neuronal cells missing : un rôle conservé au cours de l'évolution

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le rôle des gènes *gcm* aux stades post-embryonnaires était peu connu. Cependant nous savions que des cellules gliales étaient générées *de novo* aux stades post-embryonnaires (Pereanu et al., 2005) et que *gcm* présente un rôle gliogénique conservé au niveau du SNP adulte (Van De Bor et al., 2000). Il était donc supposé que *gcm* induit également le destin glial aux stades post-embryonnaires.

Nous avons en effet montré que la perte de fonction de *gcm-gcm2* induite après l'embryogenèse induit une perte de glie dans les lobes optiques et dans la corde ventrale (Yoshida

et al., 2005 ; Soustelle et Giangrande, 2007b ; Soustelle et al., 2007), comme il a également été montré par l'équipe du Dr Salecker (Chotard et al., 2005). Durant le développement post-embryonnaire, il a été mis en évidence que *gcm* et *gcm2* agissent de façon redondante pour induire de la différenciation gliale dans le système visuel (Chotard et al., 2005), ce qui est en accord avec le fait que ces deux gènes sont exprimés à un niveau comparable dans le SNC de la larve (Chotard et al., 2005 ; Soustelle et al., 2007). Le niveau d'expression de *gcm2* équivalent à celui de *gcm* et le fait que *gcm* et *gcm2* sont nécessaires lors du développement post-embryonnaire, constituent ainsi une différence avec la gliogenèse embryonnaire où seul *gcm* est requis.

De façon très surprenante, ces études ont permis de mettre en évidence un rôle pour ces gènes dans la différenciation de populations neuronales spécifiques (Chotard et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Soustelle et al., 2007). En effet, *gcm* et *gcm2* sont exprimés dans les précurseurs neuronaux de la lamina (Chotard et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Soustelle et al., 2007) ainsi que dans quatre groupes d'interneurones nouvellement identifiés dans le cerveau (Soustelle et al., 2007). Il a été mis en évidence qu'en l'absence de *gcm* et de *gcm2*, les précurseurs neuronaux de la lamina (LPCs) n'arrivent pas à se diviser correctement et la différenciation neuronale est bloquée (Chotard et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Soustelle et al., 2007). De même, les groupes d'interneurones dans le cerveau ne se différencient pas en l'absence de l'activité de Gcm (Soustelle et al., 2007). De façon intéressante, ces neurones qui dépendent de Gcm proviennent de précurseurs neuronaux purs ce qui indique que le rôle de choix de destin cellulaire n'est pas impliqué dans ce processus. Par ailleurs, l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* dans les disques imaginaux est suffisante pour induire la formation de neurones ectopiques (Soustelle et al., 2007), confirmant ce potentiel neurogénique. L'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* dans les lobes optiques ou dans la corde ventrale induit uniquement de la glie ectopique. Cependant, un marqueur spécifique des neurones exprimant *gcm* n'ayant pas encore été mis en évidence, nous ne disposons que du marqueur pan-neuronal Elav qui marque tous les neurones.

Il est donc possible que l'expression ectopique de *gcm* ou de *gcm2* induit des neurones ectopiques mais en faible quantité et que ceux-ci n'aient pas pu être mis en évidence.

La plupart des gènes impliqués dans le développement chez la drosophile sont conservés au cours de l'évolution, il en est de même pour les gènes *gcm* (voir INTRODUCTION – IV). Jusqu'à présent, un potentiel rôle gliogénique des orthologues de *gcm-gcm2* est toujours controversé (Hashemolhosseini et Wegner, 2004). Cependant, l'identification de ce nouveau rôle neurogénique chez la drosophile nous a poussé à revisiter le rôle des gènes *gcm* chez les vertébrés. L'étude des orthologues *c-GCM* chez le poulet a permis de mettre en évidence un rôle purement neurogénique pour *c-GCM1* au cours du développement embryonnaire de la moelle épinière (Soustelle et al., 2007).

Par ailleurs, un rôle gliogénique pour *c-GCM1* ne peut pas être exclu après l'embryogenèse. En effet, chez les vertébrés la gliogenèse persiste longtemps après qu'ait eu lieu la neurogenèse. De plus, il a été mis en évidence chez la souris que la génération des astrocytes peut persister durant toute la vie (Altman, 1966 ; Sturrock, 1982).

Ces résultats surprenants entraînent de nouvelles questions sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la différenciation gliale. En effet, *c-GCM1* n'est pas impliqué dans un choix de destin cellulaire entre neurone et glie, de la même façon que les gènes *gcm* dans le SNC post-embryonnaire où il n'existe pas de précurseur glial-neuronal (Soustelle et Giangrande, 2007a). De façon intéressante, contrairement aux gènes *gcm* et *gcm2* chez la drosophile qui agissent de façon redondante pour induire de la neurogenèse aux stades post-embryonnaires, les gènes *c-GCM1* et *c-GCM2* ne sont pas coexprimés dans la moelle épinière ce qui exclut un rôle redondant de ces gènes dans ce tissu.

Les résultats d'expériences réalisées *in vitro* peuvent nous aider dans la compréhension du rôle des gènes *gcm* durant l'évolution. Nous avons, en effet, mis en évidence que la transfection de cellules HeLa avec des vecteurs d'expression contenant les gènes *gcm*, *c-GCM1*, *m-GCM1* et *m-GCM2* induit dans la même cellule des marqueurs gliaux (GFAP) et neuronaux (Tuj1). Ces

résultats indiquent que le potentiel neurogénique et gliogénique des gènes *gcm* sont conservés entre les différentes espèces, et que ce potentiel dépend du contexte cellulaire, c'est-à-dire probablement de la présence ou non de cofacteurs spécifiques.

Bien que de nombreux arguments sont en faveur d'un rôle gliogénique des gènes *gcm* chez les vertébrés (voir INTRODUCTION – IV), et à la vue de ce nouveau rôle neurogénique, il serait intéressant de déterminer à nouveau et de façon plus critique le profil d'expression de ces gènes dans le système nerveux des vertébrés et de surcroît vérifier la présence ou non de phénotypes neurogéniques chez les animaux mutants pertes de fonction pour *GCM1* et *GCM2*.

IV. Régulation de l'activité de Gcm via des cofacteurs

Les études réalisées sur les gènes *gcm* suggèrent l'existence de cofacteurs cellulaires spécifiques. Tout d'abord, lors de l'étude réalisée dans le laboratoire par le Dr Miller (Miller et al., 1998), qui a démontré l'existence d'une autorégulation positive de Gcm lors de la gliogenèse, il a été mis en évidence que l'autorégulation de *gcm* nécessite la présence de cofacteurs « positifs » ou l'absence de cofacteurs « négatifs », tissus spécifiques. Ceci a été démontré à l'aide de la lignée *gcm^{rA87}* où le gène *lacZ*, codant pour la β -galactosidase (β -gal), est sous contrôle des séquences régulatrices de *gcm* (Hosoya et al., 1995 ; Jones et al., 1995 ; Vincent et al., 1996). Il a été mis en évidence que l'expression ectopique de *gcm*, en contexte *gcm^{rA87}*, induit l'expression ectopique de la β -gal lorsque celle-ci a lieu dans la région neurogénique. Dans ce cas, il peut être observé une colocalisation entre le marqueur glial Repo et la β -gal ce qui indique que l'autorégulation de *gcm* a lieu également dans les cellules gliales ectopiques. Quant à elle, l'expression ectopique de *gcm* dans le mésoderme induit également des cellules gliales ectopiques, cependant, l'autorégulation de *gcm* n'a pas lieu du tout. En effet, très peu de cellules exprimant ectopiquement *gcm* présentent une colocalisation entre Repo et la β -gal.

De la même façon, les études précédentes ont montré que Gcm a plusieurs potentiels mais jamais dans la même cellule. En effet, Gcm est capable d'induire la différenciation de cellules gliales ou de plasmotocytes durant l'embryogenèse (voir INTRODUCTION – II et III). De même, lors de notre étude sur le rôle du complexe *gcm-gcm2* dans les cellules tendon, nous avons mis en évidence que l'expression ectopique de *gcm* peut induire l'expression de marqueurs gliaux ou de cellules tendon mais de façon exclusive (Soustelle et al., 2004). Un phénomène identique peut être observé lorsque *gcm* ou *gcm2* sont exprimés de façon ectopique à des stades post-embryonnaires où ils induisent de la glie et des neurones ectopiques. De plus, il a été mis en évidence l'existence de gènes cibles *gcm-gcm2* spécifiques à un type cellulaire particulier, par exemple, le gène *akap200* qui est une cible directe de *gcm* est exprimé dans les cellules gliales et dans les hémocytes (Freeman et al., 2003), alors que *repo* est un gène cible de *gcm* spécifique à la glie. Tous ces résultats suggèrent la présence de cofacteurs spécifiques qui vont dicter un rôle particulier à Gcm, comme par exemple le tandem Hkb-Gcm qui permet la spécification d'un sous-type glial particulier (De Iaco et al., 2006).

De manière analogue, chez les vertébrés, il a été montré que m-GCM1 interagit avec le facteur de transcription à homéodomaine Pitx2 (Schubert et al., 2004). Cette interaction a lieu via le domaine de liaison à l'ADN de m-GCM1, domaine très fortement conservé dans la famille Gcm. Il a été mis en évidence que l'interaction m-GCM1-Pitx2 favorise la fixation de chaque facteur de transcription à leur domaine de liaison à l'ADN respectifs (Schubert et al., 2004). Ce mécanisme, met le point sur un autre mode d'action de la spécificité engendrée par l'interaction de Gcm avec un cofacteur cellule spécifique. Un homologue de Pitx2 a été mis en évidence chez la drosophile, Ptx1 (Vorbruggen et al., 1997). De façon intéressante, l'expression de Ptx1 a été mise en évidence dans les neurones durant l'embryogenèse (Vorbruggen et al., 1997). Son identification récente lors d'un crible perte de fonction, à l'aide d'ARN interférents, réalisé dans le but d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans la morphogenèse des dendrites des neurones sensoriels (Parrish et al., 2006), laisse supposer qu'il est également exprimé dans les

neurones aux stades post-embryonnaires. A la vue du nouveau rôle neurogénique de *gcm* chez la drosophile, il pourrait être intéressant de regarder si une interaction entre Ptx1 et Gcm a lieu et si ces deux protéines sont exprimées dans les mêmes neurones, quel est le rôle physiologique d'une telle interaction.

De façon intéressante, une étude récente vient de mettre en évidence chez la souris que le développement de la glande parathyroïde, qui dépend de *m-GCM2*, présente des ressemblances avec les précurseurs gliaux des vertébrés (Kameda, 2007). En effet, lors de son développement, la glande parathyroïde exprime les marqueurs gliaux S100 (astrocytes) et p75NTR (récepteur à la neurotrophine ; microglie/macrophage). D'autres marqueurs gliaux, comme GFAP, Sox10 (précurseurs des oligodendrocytes), Vimentin (glie radiale) et Nestin (précurseurs gliaux et neuronaux), ainsi que les marqueurs des précurseurs neuronaux comme Neurofilament 160 et Tuj1 ne sont par contre jamais exprimés dans la glande parathyroïde suggérant la présence d'un cofacteur commun entre la glie et la parathyroïde au cours de développement.

Toutes ces observations m'ont poussé à réaliser un crible double hybride afin d'identifier les potentiels cofacteurs de Gcm. La technique du double hybride est idéale pour cribler des banques d'expression dans le but d'identifier de nouvelles interactions protéine/protéine. De plus, son avantage majeur réside dans le fait que lorsque l'appât interagit avec une proie inconnue, l'identification de celle-ci via son ADNc est très rapide. Lors de ce crible double hybride chez la levure, différents types de cofacteurs très intéressants ont été identifiés. La compréhension du mode d'action de Gcm par l'étude de ses cofacteurs représente un potentiel très important. Par exemple, l'étude des transporteurs Karyopherin- α 1 et Pendulin, ainsi que de la protéine Uba2 qui est impliquée dans les processus de sumoylation, permettra de mieux appréhender la régulation de la fonction de Gcm.

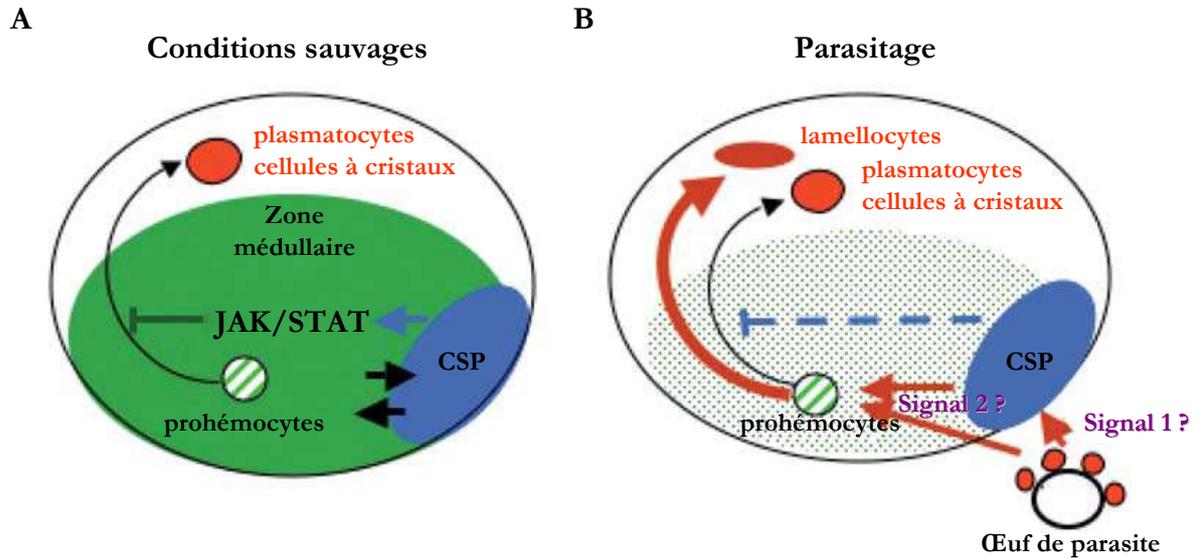
Il pourrait être intéressant de réaliser un crible à l'aide de la technique « Tandem Affinity Purification » qui permet la purification de complexes protéiques sous leur forme native (Puig et

al., 2001). Cette méthode repose sur l'utilisation d'une étiquette constituée des deux domaines d'affinité CBP et Protéine A séparés par un site de clivage par la protéase TEV. La protéine recombinante est produite proche de son niveau naturel dans l'organisme d'intérêt. On obtient ainsi après purification un complexe qui correspond à l'état physiologique dans l'organisme étudié. Le complexe peut être analysé par spectrométrie de masse afin de déterminer ses différents constituants ou bien être utilisé pour des études fonctionnelles.

L'utilisation de cofacteurs cellulaires spécifiques afin de contrôler dans l'espace et dans le temps ou de moduler l'activité d'un facteur de transcription maître est un mécanisme conservé au cours de l'évolution. Par exemple, les membres de la famille de Mef2 (Myoocyte enhançer factor 2) qui sont des facteurs de transcription à domaine MADS ne peuvent pas induire la myogenèse dans les fibroblastes (Molkentin et al., 1995). Cependant, lorsqu'ils sont coexprimés avec les protéines myogéniques bHLH ils peuvent induire la myogenèse ce qui n'est jamais observé avec les protéines myogéniques bHLH seules. Cette coopération requiert une interaction directe entre le domaine de liaison à l'ADN de Mef2 et les facteurs myogéniques bHLH. Cependant, seul le DBD d'une protéine est nécessaire et seul le domaine de transactivation de l'autre protéine est requis. Cette interaction permet au facteur d'activer la transcription à travers ses séquences cibles spécifiques, et représente un mécanisme indirect d'activation de l'expression de gènes à travers des interactions protéines/protéines de facteurs de transcription de catégories différentes (Molkentin et al., 1995).

V. Rôle de Gcm au cours de l'hématopoïèse post-embryonnaire

Durant la dernière partie de ma thèse, j'ai abordé le rôle de Gcm dans l'hématopoïèse post-embryonnaire. Lors de cette étude, qui est toujours en cours, j'ai tout d'abord mis en évidence que la perte de fonction de *gcm-gcm2* dans les territoires hématopoïétiques, c'est-à-dire la



Adapté de Krzemiński et al. 2007

Figure 55. Modèle l'hématopoïèse larvaire. (A) En L3, en conditions sauvages, le centre de signalisation postérieur (CSP) agit de façon non autonome cellulaire pour maintenir la voie de signalisation JAK/STAT dans la zone médullaire. L'activité de la voie de signalisation JAK/STAT est requise pour empêcher la différenciation prématurée des prohémocytes (précurseurs multipotents) en plasmatocytes et en cellules à cristaux. (B) En cas de parasitage, un signal émis par les plasmatocytes circulants et perçu soit via le CSP (signal 1) ou directement par les prohémocytes (signal 2), et il peut être observé la différenciation de lamellocytes.

glande lymphatique, les hémocytes circulants et sessiles, ainsi que le corps gras, induit la formation de tumeurs mélaniques, de la même façon que la perte de fonction de *dpias*. Ces tumeurs mélaniques correspondent à des agrégats d'hémocytes, et elles sont plus particulièrement dues à la présence d'une quantité massive de lamellocytes dans l'hémolymphe. Les lamellocytes, qui sont normalement induits suite à un parasitisme, peuvent être retrouvés chez les larves dont l'homéostasie hémocytaire est altérée (voir INTRODUCTION – IV). Il a été récemment décrit que le centre de signalisation postérieur (CSP) de la glande lymphatique est essentiel à cette homéostasie dans la larve saine (Krzemien et al., 2007 ; Mandal et al., 2007). Pour ceci, une communication entre le CSP et les précurseurs hémocytaires de la glande lymphatique est cruciale et nécessite différents aspects. En effet, il a été mis en évidence que l'expression de *collier* dans le CSP est nécessaire au contrôle de la balance entre le « pool » de précurseurs multipotents et le « pool » d'hémocytes différenciés. Le mécanisme de ce contrôle passe par l'activation de la voie de signalisation hop/Stat92E (JAK/STAT) dans les prohémocytes de la zone médullaire, qui bloque leur différenciation prématurée (**Figure 55**) (Krzemien et al., 2007). Ces cellules conservent ainsi leur caractère multipotent qui est nécessaire à leur différenciation en lamellocytes en réponse au parasitisme. Il est supposé qu'en cas de parasitisme la voie JAK/STAT ne signale plus dans la ZM ce qui permet la différenciation des hémocytes, dont les lamellocytes (**Figure 55**), cependant aucune évidence ne confirme cette hypothèse.

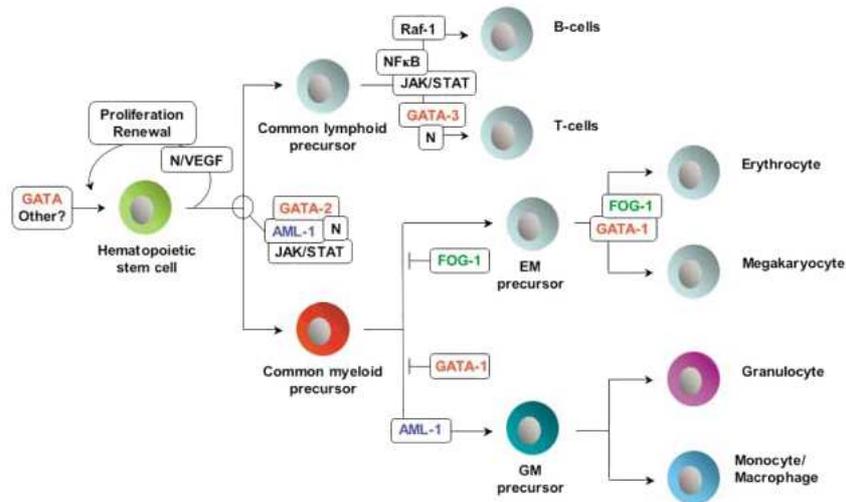
dpias est un régulateur négatif de la voie JAK/STAT, en perte de fonction *dpias* l'activité de cette voie de signalisation est augmentée et il peut être observé la formation de tumeurs mélaniques. Le même phénotype est également observé chez les mutants *hop^{Tum-1}* où la voie JAK/STAT est hyperactive (Harrison et al., 1995 ; Luo et al., 1995), ou lorsque *hop* est exprimé de façon ectopique dans la glande lymphatique (Harrison et al., 1995). Il a été mis en évidence que ce phénotype de tumeurs mélaniques présent dans les larves *hop^{Tum-1}* peut être sauvé par l'expression ectopique de *dpias* durant la vie larvaire (Betz et al., 2001). Ces résultats soutiennent donc que l'activité de la voie JAK/STAT induit la différenciation de lamellocytes et

donc la formation de tumeurs mélaniques. Hors, son activité dans la glande lymphatique est nécessaire pour éviter la différenciation prématurée des prohémyocytes (voir paragraphe précédent). L'activité de cette voie est donc nécessaire pour bloquer la différenciation des prohémyocytes ainsi que pour la promouvoir. Il peut être donc suggéré que selon le niveau d'activité de la voie de signalisation JAK/STAT, il y aura ou non différenciation de lamellocytes et c'est dans la modulation de cette voie de signalisation qu'intervient *dpias*.

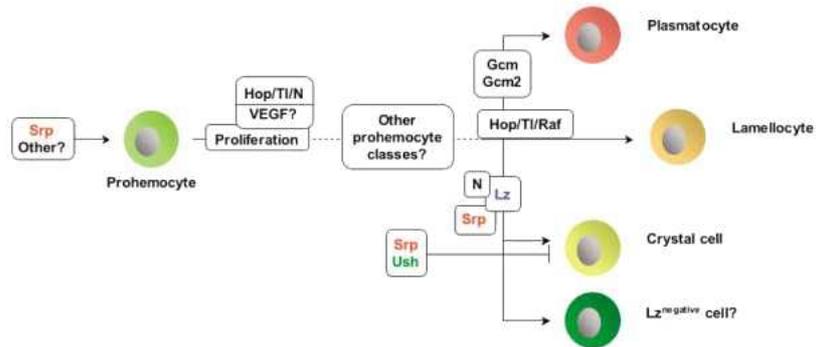
Les expériences perte de fonction pour *gcm-gcm2* indiquent que la formation de tumeurs mélaniques a lieu lorsque l'activité de *gcm-gcm2* est perdue dans le corps gras. De plus, les expériences d'épistasie placent *gcm-gcm2* en aval de *hop*. Il peut donc être émise l'hypothèse qu'en conditions sauvages, la voie JAK/STAT est active dans la glande lymphatique mais pas dans le corps gras où réside le tandem Gcm-*dpias*. En conditions perte de fonction pour *gcm-gcm2* et/ou *dpias*, la voie de signalisation JAK/STAT est alors activée dans le corps gras. Il a été mis en évidence que, lors de la réponse immunitaire humorale, les hémyocytes ont un rôle de sentinelle et signalent la présence de l'agent pathogène au corps gras qui va ensuite libérer des peptides antimicrobiens (Agaisse et al., 2003). Il peut donc être supposé que les hémyocytes signalent également au corps gras la présence d'un œuf de parasite, qui va à son tour signaler à la glande lymphatique. L'absence de *gcm-gcm2* dans le corps gras peut donc entraîner cette signalisation ce qui va aboutir à la formation de lamellocytes et donc de tumeurs mélaniques.

Lors de cette étude je n'ai pas réussi à mettre en évidence l'expression de *gcm* dans la glande lymphatique ni dans le corps gras. Il est toutefois possible que *gcm* soit exprimé au tout début de la vie larvaire et que la protéine persiste aux stades ultérieurs du développement. Cependant, étant donné qu'il est quasiment impossible de réaliser des expériences d'hybridation *in situ* pour visualiser l'ARNm de *gcm* en L1 nous ne pouvons pas vérifier cette hypothèse à l'heure actuelle. De plus, nous n'avons pas à notre disposition d'anticorps anti-Gcm fonctionnant en immunohistochimie ni en western blot.

A



B



D'après Evans et al. 2003

Figure 56. Diagramme comparatif des lignages hématopoïétiques des mammifères et de la drosophile. Une partie des protéines conservées et les voies de signalisation régulant l'hématopoïèse définitive chez la souris (A) est comparée avec les types cellulaires, protéines et voies de signalisations similaires chez la drosophile (B). Les protéines conservées sont signalées par le même code couleur.

gcm semble donc avoir également un rôle original au cours de l'hématopoïèse larvaire, cependant la poursuite de cette étude est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

De façon intéressante, il a été mis en évidence chez le poisson zèbre que *Gcmb* est exprimé dans les macrophages (Hanaoka et al., 2004). Cependant, la perte de fonction de *Gcmb* ou son expression ectopique dans ce lignage n'altère pas le nombre de macrophages (Hanaoka et al., 2004). Ceci peut sous entendre l'existence d'un homologue à *Gcmb* chez le poisson zèbre, cependant celui-ci reste à être mis en évidence, ou, *Gcmb* n'a pas un rôle de destin cellulaire dans ce lignage mais est impliqué dans un autre processus.

L'expression d'un orthologue de *Gcm* n'a pas été mise en évidence dans les monocytes/macrophages des mammifères bien que la plupart des facteurs impliqués dans l'hématopoïèse de la drosophile soient conservés dans ce même processus chez les mammifères (Figure 56) (Evans et al., 2003). Par exemple, le facteur de transcription Lozengue présente une forte homologie avec le facteur AML-1/Runx1 humain (71 % d'homologie entre domaines Runt) (Daga et al., 1996), qui est l'une des cibles les plus fréquentes de translocation chromosomique aboutissant à une leucémie myéloïde aiguë (Lutterbach et Hiebert, 2000 ; Speck et Gilliland, 2002). Il serait intéressant de vérifier si les orthologues de *Gcm* chez les mammifères sont également présents dans le lignage des macrophages.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, plusieurs rôles originaux pour les facteurs de transcription *Gcm* ont été mis en évidence. Tout d'abord, nous avons montré pour la première fois que ces facteurs de transcription n'ont pas seulement un rôle de choix de destin cellulaire mais aussi un rôle dans

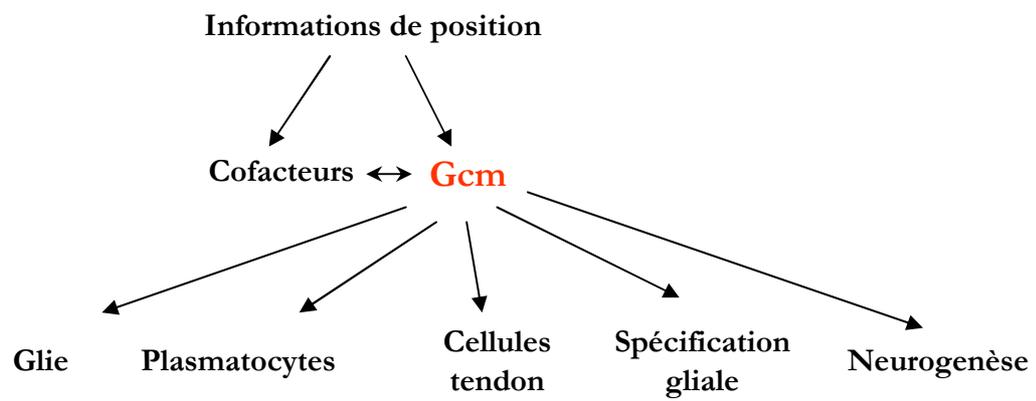


Figure 57. Gcm a un rôle clé au cours du développement.

Voir le texte pour les détails.

la différenciation terminale d'un tissu (i.e. les cellules tendon de l'embryon). Puis, nous avons mis en évidence que ces facteurs, connus depuis si longtemps pour être les déterminants gliaux chez l'embryon de drosophile, sont également des déterminants neuronaux aux stades post-embryonnaires ainsi que chez les vertébrés. Ces rôles originaux résultants de la présence ou non de cofacteurs spécifiques, j'ai réalisé un crible double hybride afin d'identifier les cofacteurs de Gcm ce qui m'a permis de mettre le point sur un troisième rôle insoupçonné de Gcm dans l'hématopoïèse larvaire.

Il semble donc que Gcm ait un rôle de pivot au cours du développement (**Figure 57**). Gcm et ses cofacteurs sont en aval des gènes de régulation qui donnent les informations de position et qui définissent le territoire neural. Puis Gcm, selon le contexte cellulaire, induit les différentes voies qui sont en amont.

- Adams, J. C.** (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 25-51.
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N.** (2003). Signaling role of hemocytes in Drosophila JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* **5**, 441-50.
- Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A. M. and Hotta, Y.** (1996). The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in Drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14912-6.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y.** (1998). Alteration of cell fate by ectopic expression of Drosophila glial cells missing in non-neural cells. *Dev Genes Evol* **208**, 578-85.
- Alfonso, T. B. and Jones, B. W.** (2002). gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in Drosophila. *Dev Biol* **248**, 369-83.
- Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D. and Technau, G. M.** (2006). Expression profiling of glial genes during Drosophila embryogenesis. *Dev Biol* **296**, 545-60.
- Altman, J.** (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* **16**, 263-278.
- Altshuler, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Frohman, M. A.** (1996). Gcm1, a mammalian homolog of Drosophila glial cells missing. *FEBS Lett* **393**, 201-4.
- Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S. J., Lazzarini, R. A. and Cross, J. C.** (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet* **25**, 311-4.
- Arbouzova, N. I. and Zeidler, M. P.** (2006). JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* **133**, 2605-16.
- Armand, P., Knapp, A. C., Hirsch, A. J., Wieschaus, E. F. and Cole, M. D.** (1994). A novel basic helix-loop-helix protein is expressed in muscle attachment sites of the Drosophila epidermis. *Mol Cell Biol* **14**, 4145-54.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I. and Dearolf, C. R.** (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in Drosophila hemocytes. *Genetics* **163**, 203-15.
- Ashida, M. and Brey, P.** (1995). Role of the integument in insect defence: prophenoloxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10698-10702.
- Badenhorst, P.** (2001). Tramtrack controls glial number and identity in the Drosophila embryonic CNS. *Development* **128**, 4093-101.
- Basyuk, E., Cross, J. C., Corbin, J., Nakayama, H., Hunter, P., Nait-Oumesmar, B. and Lazzarini, R. A.** (1999). Murine Gcm1 gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells. *Dev Dyn* **214**, 303-11.

- Bataille, L.** (2006). Mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire chez la drosophile: Thèse.
- Bataille, L., Auge, B., Ferjoux, G., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* **132**, 4635-44.
- Bate, M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791-804.
- Bate, M.** (1993). The mesoderme and its derivatives. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bates and A. Martinez-Arias), pp. 1013-1090. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L. and Volk, T.** (1997). Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* **124**, 2615-22.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R.** (1997). Tendons and ligaments--an overview. *Histol Histopathol* **12**, 1135-44.
- Berger, C., Urban, J. and Technau, G. M.** (2001). Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the temporal sequence of neuroblast specification. *Development* **128**, 3243-51.
- Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J. L. and Giangrande, A.** (1999). Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. *Dev Biol* **216**, 265-75.
- Bernardoni, R., Miller, A. A. and Giangrande, A.** (1998). Glial differentiation does not require a neural ground state. *Development* **125**, 3189-200.
- Bernardoni, R., Vivancos, V. and Giangrande, A.** (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev Biol* **191**, 118-30.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W. and Darnell, J. E., Jr.** (2001). A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9563-8.
- Beuchle, D., Schwarz, H., Langegger, M., Koch, I. and Aberle, H.** (2007). *Drosophila* MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure. *Mech Dev* **124**, 390-406.
- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472-85.
- 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.

- Bogaert, T., Brown, N. and Wilcox, M.** (1987). The Drosophila PS2 antigen is an invertebrate integrin that, like the fibronectin receptor, becomes localized to muscle attachments. *Cell* **51**, 929-40.
- Bolos, V., Grego-Bessa, J. and de la Pompa, J. L.** (2007). Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* **28**, 339-63.
- Bossing, T., Technau, G. M. and Doe, C. Q.** (1996a). huckebein is required for glial development and axon pathfinding in the neuroblast 1-1 and neuroblast 2-2 lineages in the Drosophila central nervous system. *Mech Dev* **55**, 53-64.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996b). The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.
- Braun, A., Lemaitre, B., Lanot, R., Zachary, D. and Meister, M.** (1997). Drosophila immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap. *Genetics* **147**, 623-34.
- Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1997). Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in Drosophila neuroblasts. *Curr Biol* **7**, 827-35.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. and Doe, C. Q.** (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the Drosophila central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Brown, J. L., Fritsch, C., Mueller, J. and Kassis, J. A.** (2003). The Drosophila pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* **130**, 285-94.
- Brown, N. H.** (2000). Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol* **19**, 191-201.
- Bruckner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C. M., Rorth, P. and Perrimon, N.** (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in Drosophila. *Dev Cell* **7**, 73-84.
- Bunch, T. A., Graner, M. W., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Schneider, K. D., Kerschen, A., Choy, L. P., Burgess, B. W. and Brower, D. L.** (1998). The PS2 integrin ligand tiggirin is required for proper muscle function in Drosophila. *Development* **125**, 1679-89.
- Burkin, D. J., Wallace, G. Q., Nicol, K. J., Kaufman, D. J. and Kaufman, S. J.** (2001). Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J Cell Biol* **152**, 1207-18.
- Burrige, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M.** (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-518.
- Buttgereit, D.** (1993). Redundant enhancer elements guide beta 1 tubulin gene expression in apodemes during Drosophila embryogenesis. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**, 721-7.

- Buttgereit, D.** (1996). Transcription of the beta 1 tubulin (beta Tub56D) gene in apodemes is strictly dependent on muscle insertion during embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Eur J Cell Biol* **71**, 183-91.
- Buttgereit, D., Leiss, D., Michiels, F. and Renkawitz-Pohl, R.** (1991). During *Drosophila* embryogenesis the beta 1 tubulin gene is specifically expressed in the nervous system and the apodemes. *Mech Dev* **33**, 107-18.
- Buzanska, L., Spassky, N., Belin, M. F., Giangrande, A., Guillemot, F., Klambt, C., Labouesse, M., Thomas, J. L., Domanska-Janik, K. and Zalc, B.** (2001). Human medulloblastoma cell line DEV is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem cells. *J Neurosci Res* **65**, 17-23.
- Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C. Q. and Tomlinson, A.** (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development* **120**, 2957-66.
- Campos-Ortega, J. A.** (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* **24**, 1305-27.
- Campos-Ortega, J. A.** (1995). Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol* **10**, 75-89.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin/Heidelberg/New-York/Tokyo: Springer-Verlag.
- Cantor, A. B. and Orkin, S. H.** (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 117-28.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R. and Vorbruggen, G.** (2007). alpha(PS2) integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mech Dev* **124**, 463-75.
- Cherry, S. and Silverman, N.** (2006). Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat Immunol* **7**, 911-7.
- Chiquet, M., Matthisson, M., Koch, M., Tannheimer, M. and Chiquet-Ehrismann, R.** (1996). Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol* **74**, 737-44.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F. and Krasnow, M. A.** (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* **108**, 865-76.
- Chockalingam, P. S., Cholera, R., Oak, S. A., Zheng, Y., Jarrett, H. W. and Thomason, D. B.** (2002). Dystrophin-glycoprotein complex and Ras and Rho GTPase signaling are altered in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C500-11.
- Choi, K. W. and Benzer, S.** (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **12**, 423-31.

- Chotard, C., Leung, W. and Salecker, I.** (2005). glial cells missing and gcm2 cell autonomously regulate both glial and neuronal development in the visual system of *Drosophila*. *Neuron* **48**, 237-51.
- Chotard, C. and Salecker, I.** (2004). Neurons and glia: team players in axon guidance. *Trends Neurosci* **27**, 655-61.
- Chotard, C. and Salecker, I.** (2007). Glial cell development and function in the *Drosophila* Visual system. *Neuron Glia Biology* **In press**.
- Clandinin, T. and Zipursky, S.** (2002). Making Connections in the Fly Visual System. *Neuron* **35**, 827-841.
- Cohen, S. X., Moulin, M., Hashemolhosseini, S., Kilian, K., Wegner, M. and Muller, C. W.** (2003). Structure of the GCM domain-DNA complex: a DNA-binding domain with a novel fold and mode of target site recognition. *Embo J* **22**, 1835-45.
- Cohen, S. X., Moulin, M., Schilling, O., Meyer-Klaucke, W., Schreiber, J., Wegner, M. and Muller, C. W.** (2002). The GCM domain is a Zn-coordinating DNA-binding domain. *FEBS Lett* **528**, 95-100.
- Crozatier, M. and Meister, M.** (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cellular Microbiology* **9**, 1117-1126.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M.** (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol* **2**, E196.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibsouda, S. and Vincent, A.** (1996). Collier, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol* **6**, 707-18.
- Daga, A., Karlovich, C. A., Dumstrei, K. and Banerjee, U.** (1996). Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* **10**, 1194-1205.
- Datta, S.** (1995). Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development* **121**, 1173-82.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. and Brey, P. T.** (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 581-92.
- De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C. and Giangrande, A.** (2006). Hucklebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. *Embo J* **25**, 244-54.
- de la Pompa, J. L., Garcia, J. R. and Ferrus, A.** (1989). Genetic analysis of muscle development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **131**, 439-54.
- Dearborn, R., Jr. and Kunes, S.** (2004). An axon scaffold induced by retinal axons directs glia to destinations in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **131**, 2291-303.

- Deconinck, A. E., Rafael, J. A., Skinner, J. A., Brown, S. C., Potter, A. C., Metzinger, L., Watt, D. J., Dickson, J. G., Tinsley, J. M. and Davies, K. E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717-27.
- Dekkers, L. C., van der Plas, M. C., van Loenen, P. B., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J., Fradkin, L. G. and Noordermeer, J. N. (2004). Embryonic expression patterns of the Drosophila dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs. *Gene Expr Patterns* **4**, 153-9.
- Dimarcq, J. L., Imler, J. L., Lanot, R., Ezekowitz, R. A., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A. and Lagueux, M. (1997). Treatment of l(2)mbn Drosophila tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 877-86.
- Ding, C., Buckingham, B. and Levine, M. A. (2001). Familial isolated hypoparathyroidism caused by a mutation in the gene for the transcription factor GCMB. *J Clin Invest* **108**, 1215-20.
- Doe, C. Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the Drosophila central nervous system. *Development* **116**, 855-63.
- Donaghue, C., Bates, H. and Cotterill, S. (2001). Identification and characterisation of the Drosophila homologue of the yeast Uba2 gene. *Biochim Biophys Acta* **1518**, 210-4.
- Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Benit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V. and Heidmann, T. (2005). Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 725-30.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis. *Curr Biol* **12**, 1923-7.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U. and Reichert, H. (2002). Gliogenesis in Drosophila: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system. *Development* **129**, 3295-309.
- Escudero, L. M., Caminero, E., Schulze, K. L., Bellen, H. J. and Modolell, J. (2005). Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural achaete/scute genes of Drosophila. *Development* **132**, 1211-22.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in Drosophila and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**, 673-90.
- Ferjoux, G., Auge, B., Boyer, K., Haenlin, M. and Waltzer, L. (2007). A GATA/RUNX cis-regulatory module couples Drosophila blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Dev Biol* **305**, 726-34.
- Fessler, L. I., Nelson, R. E. and Fessler, J. H. (1994). Drosophila extracellular matrix. *Methods Enzymol* **245**, 271-94.
- Fichelson, P. and Ghosh, M. (2003). The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of Drosophila. *Development* **130**, 123-33.

- Fields, S. and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.
- Fogerty, F. J., Fessler, L. I., Bunch, T. A., Yaron, Y., Parker, C. G., Nelson, R. E., Brower, D. L., Gullberg, D. and Fessler, J. H.** (1994). Tigrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins. *Development* **120**, 1747-58.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H. and Schulz, R. A.** (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7342-7.
- Fossett, N., Zhang, Q., Gajewski, K., Choi, C. Y., Kim, Y. and Schulz, R. A.** (2000). The multitype zinc-finger protein U-shaped functions in heart cell specification in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7348-53.
- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. and Ezekowitz, R. A.** (1996). Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-43.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. and White, K.** (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. *Science* **284**, 1991-4.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. and Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567-80.
- Frommer, G., Vorbruggen, G., Pasca, G., Jackle, H. and Volk, T.** (1996). Epidermal egr-like zinc finger protein of Drosophila participates in myotube guidance. *Embo J* **15**, 1642-9.
- Gho, M., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F.** (1999). Revisiting the Drosophila microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-84.
- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. and Klambt, C.** (1997). Glial development in the Drosophila CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* **124**, 2307-16.
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. and Adam, S. A.** (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14.
- Gotwals, P. J., Fessler, L. I., Wehrli, M. and Hynes, R. O.** (1994). Drosophila PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11447-51.
- Graham, A. and Smith, A.** (2001). Patterning the pharyngeal arches. *Bioessays* **23**, 54-61.

- Gunther, T., Chen, Z. F., Kim, J., Priemel, M., Rueger, J. M., Amling, M., Moseley, J. M., Martin, T. J., Anderson, D. J. and Karsenty, G.** (2000). Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* **406**, 199-203.
- Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C. W. and Grosschedl, R.** (1993). Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* **7**, 760-73.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-32.
- Han, Z. and Olson, E. N.** (2005). Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* **132**, 3525-36.
- Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T. and Okamoto, H.** (2004). Zebrafish *gcmB* is required for pharyngeal cartilage formation. *Mech Dev* **121**, 1235-47.
- Hari, K. L., Cook, K. R. and Karpen, G. H.** (2001). The *Drosophila* *Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev* **15**, 1334-48.
- Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M. and Perrimon, N.** (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *Embo J* **14**, 2857-65.
- Hartenstein, V., Tepass, U. and Gruszynski-Defeo, E.** (1994). Embryonic development of the stomatogastric nervous system in *Drosophila*. *J Comp Neurol* **350**, 367-81.
- Hashemolhosseini, S., Hadjihannas, M., Stolt, C. C., Haas, C. S., Amann, K. and Wegner, M.** (2002). Restricted expression of mouse *GCMa/Gcm1* in kidney and thymus. *Mech Dev* **118**, 175-8.
- Hashemolhosseini, S., Schmidt, K., Kilian, K., Rodriguez, E. and Wegner, M.** (2004). Conservation and variation of structure and function in a newly identified GCM homolog from chicken. *J Mol Biol* **336**, 441-51.
- Hashemolhosseini, S. and Wegner, M.** (2004). Impacts of a new transcription factor family: mammalian GCM proteins in health and disease. *J Cell Biol* **166**, 765-8.
- Heino, T. I., Karpanen, T., Wahlstrom, G., Pulkkinen, M., Eriksson, U., Alitalo, K. and Roos, C.** (2001). The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech Dev* **109**, 69-77.
- Herrmann, J., Lerman, L. O. and Lerman, A.** (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res* **100**, 1276-91.
- Hetru, C., Troxler, L. and Hoffmann, J. A.** (2003). *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S327-34.

- Hipfner, D. R. and Cohen, S. M.** (2003). The *Drosophila* sterile-20 kinase *slik* controls cell proliferation and apoptosis during imaginal disc development. *PLoS Biol* **1**, E35.
- Hipfner, D. R., Keller, N. and Cohen, S. M.** (2004). *Slik* Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev* **18**, 2243-8.
- Hogan, B. M., Hunter, M. P., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Hall, N. E., Heath, J. K., Prince, V. E. and Lieschke, G. J.** (2004). Zebrafish *gcm2* is required for gill filament budding from pharyngeal ectoderm. *Dev Biol* **276**, 508-22.
- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. *Development* **127**, 2515-22.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R.** (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**, 4955-62.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y.** (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025-36.
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X. and Perrimon, N.** (2002). The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* **3**, 765-78.
- 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.
- Huang, Z. and Kunes, S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**, 411-22.
- Huang, Z. and Kunes, S.** (1998). Signals transmitted along retinal axons in *Drosophila*: Hedgehog signal reception and the cell circuitry of lamina cartridge assembly. *Development* **125**, 3753-64.
- Hummel, T., Menne, T., Scholz, H., Granderath, S., Giesen, K. and Klambt, C.** (1997). CNS midline development in *Drosophila*. *Perspect Dev Neurobiol* **4**, 357-68.
- Ilsley, J. L., Sudol, M. and Winder, S. J.** (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal* **13**, 625-32.
- Ito, K., Urban, J. and Technau, G.** (1995). Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Dev Genes Evol* **204**, 284-307.
- Iwasaki, Y., Hosoya, T., Takebayashi, H., Ogawa, Y., Hotta, Y. and Ikenaka, K.** (2003). The potential to induce glial differentiation is conserved between *Drosophila* and mammalian glial cells missing genes. *Development* **130**, 6027-35.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-23.

- Jones, F. S. and Meech, R.** (1999). Knockout of REST/NRSF shows that the protein is a potent repressor of neuronally expressed genes in non-neural tissues. *Bioessays* **21**, 372-376.
- Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U.** (2005). The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**, 2521-33.
- Kameda, Y.** (2007). Expression of glial progenitor markers p75^{NTR} and S100 protein in the developing mouse parathyroid gland. *Cell Tissue Res* **327**, 15-23.
- Kammerer, M. and Giangrande, A.** (2001). Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. *Embo J* **20**, 4664-73.
- Kammerer, M., Pirola, B., Giglio, S. and Giangrande, A.** (1999). GCMB, a second human homolog of the fly glide/gcm gene. *Cytogenet Cell Genet* **84**, 43-7.
- Kanemura, Y., Hiraga, S., Arita, N., Ohnishi, T., Izumoto, S., Mori, K., Matsumura, H., Yamasaki, M., Fushiki, S. and Yoshimine, T.** (1999). Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the Drosophila glial cells missing (gcm) gene. *FEBS Lett* **442**, 151-6.
- Kim, J., Jones, B. W., Zock, C., Chen, Z., Wang, H., Goodman, C. S. and Anderson, D. J.** (1998). Isolation and characterization of mammalian homologs of the Drosophila gene glial cells missing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12364-9.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klambt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the Drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-60.
- Klambt, C.** (1993). The Drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-76.
- Klambt, C. and Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. *Glia* **2**, 205-13.
- Knerr, I., Schubert, S. W., Wich, C., Amann, K., Aigner, T., Vogler, T., Jung, R., Dotsch, J., Rascher, W. and Hashemolhosseini, S.** (2005). Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett* **579**, 3991-8.
- Krzemien, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A. and Crozatier, M.** (2007). Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. *Nature* **446**, 325-8.
- Lai, E. C. and Orgogozo, V.** (2004). A hidden program in drosophila peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity. *Dev Biol* **269**, 1-17.
- Lai-Fook, J.** (1966). The repair of wounds in the integument of insects. *J Insect Physiol*, 185-226.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M.** (2001). Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. *Dev Biol* **230**, 243-57.
- Latchman, D. S.** (1990). Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* **270**, 281-9.

- Lawler, J.** (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 634-40.
- 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.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-9.
- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U.** (2003). A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. *Genes Dev* **17**, 348-53.
- Leclerc, V. and Reichhart, J. M.** (2004). The immune response of Drosophila melanogaster. *Immunol Rev* **198**, 59-71.
- Lee, J. C., VijayRaghavan, K., Celniker, S. E. and Tanouye, M. A.** (1995). Identification of a Drosophila muscle development gene with structural homology to mammalian early growth response transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10344-8.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lee, T. and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J.** (2007). The host defense of Drosophila melanogaster. *Annu Rev Immunol* **25**, 697-743.
- Leptin, M., Bogaert, T., Lehmann, R. and Wilcox, M.** (1989). The function of PS integrins during Drosophila embryogenesis. *Cell* **56**, 401-8.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M.** (2002). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of Drosophila. *Embo J* **21**, 6330-7.
- Lin, H. and Grosschedl, R.** (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* **376**, 263-7.
- Luo, H. and Dearolf, C. R.** (2001). The JAK/STAT pathway and Drosophila development. *Bioessays* **23**, 1138-47.
- Luo, H., Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1995). An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* **14**, 1412-20.
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., D'Andrea, A. D. and Dearolf, C. R.** (1997). Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* **17**, 1562-71.

- Luo, H., Rose, P. E., Roberts, T. M. and Dearolf, C. R.** (2002). The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Mol Genet Genomics* **267**, 57-63.
- Lutterbach, B. and Hiebert, S. W.** (2000). Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* **245**, 223-235.
- MacKrell, A. J., Blumberg, B., Haynes, S. R. and Fessler, J. H.** (1988). The lethal myospheroid gene of *Drosophila* encodes a membrane protein homologous to vertebrate integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2633-7.
- Maier, H. and Hagman, J.** (2002). Roles of EBF and Pax-5 in B lineage commitment and development. *Semin Immunol* **14**, 415-22.
- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* **36**, 1019-23.
- Mandal, L., Martinez-Agosto, J. A., Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* **446**, 320-4.
- Maret, A., Bourdeau, I., Ding, C., Kadkol, S. S., Westra, W. H. and Levine, M. A.** (2004). Expression of GCMB by intrathyroid parathyroid hormone-secreting adenomas indicates their parathyroid cell origin. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 8-12.
- Markel, H., Chandler, J. and Werr, W.** (2002). Translational fusions with the engrailed repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucleic Acids Res* **30**, 4709-4719.
- Martin-Bermudo, M. D. and Brown, N. H.** (2000). The localized assembly of extracellular matrix integrin ligands requires cell-cell contact. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3715-23.
- Mason, D. A., Fleming, R. J. and Goldfarb, D. S.** (2002). *Drosophila melanogaster* importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. *Genetics* **161**, 157-70.
- Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N.** (1998). Mammalian and *Drosophila* blood: JAK of all trades? *Cell* **92**, 697-700.
- Maurange, C. and Gould, A. P.** (2005). Brainy but not too brainy: starting and stopping neuroblast divisions in *Drosophila*. *Trends Neurosci* **28**, 30-6.
- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. and von der Mark, K.** (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 318-23.
- Meinertzhagen, I. A. and Hanson, T. E.** (1993). The development of the optic lobe. In The development of *Drosophila melanogaster*. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1363 -1491. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Meister, M. and Lagueux, M.** (2003). Drosophila blood cells. *Cell Microbiol* **5**, 573-80.
- Miller, A. A., Bernardoni, R. and Giangrande, A.** (1998). Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm. *Embo J* **17**, 6316-26.
- Mohr, S. E. and Boswell, R. E.** (1999). Zimp encodes a homologue of mouse Miz1 and PIAS3 and is an essential gene in Drosophila melanogaster. *Gene* **229**, 109-16.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. and Olson, E. N.** (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF-2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**, 1125-36.
- Muratoglu, S., Garratt, B., Hyman, K., Gajewski, K., Schulz, R. A. and Fossett, N.** (2006). Regulation of Drosophila friend of GATA gene, u-shaped, during hematopoiesis: a direct role for serpent and lozenge. *Dev Biol* **296**, 561-79.
- Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X. and Chia, W.** (1995). Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the Drosophila embryo. *Genes Dev* **9**, 139-54.
- Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. and Volk, T.** (1999). The balance between two isoforms of the Drosophila RNA-binding protein how controls tendon cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 573-84.
- Nait-Oumesmar, B., Stecca, B., Fatterpekar, G., Naidich, T., Corbin, J. and Lazzarini, R. A.** (2002). Ectopic expression of Gcm1 induces congenital spinal cord abnormalities. *Development* **129**, 3957-64.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T.** (1990). The single-minded gene of Drosophila is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* **63**, 63-75.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1991). The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-67.
- Nappi, A. J. and Vass, E.** (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive Drosophila melanogaster. *J Parasitol* **84**, 1150-7.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y.** (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* **68**, 450-6.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y.** (2000). Nitric oxide involvement in Drosophila immunity. *Nitric Oxide* **4**, 423-30.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. and Fessler, J. H.** (1994). Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. *Embo J* **13**, 3438-47.
- Neuman, S., Kaban, A., Volk, T., Yaffe, D. and Nudel, U.** (2001). The dystrophin / utrophin homologues in Drosophila and in sea urchin. *Gene* **263**, 17-29.

- Neuman, S., Kovalio, M., Yaffe, D. and Nudel, U.** (2005). The Drosophila homologue of the dystrophin gene - introns containing promoters are the major contributors to the large size of the gene. *FEBS Lett* **579**, 5365-71.
- Okabe, M. and Graham, A.** (2004). The origin of the parathyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17716-9.
- Olofsson, B. and Page, D. T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic Drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-43.
- Parker, R. J. and Auld, V. J.** (2006). Roles of glia in the Drosophila nervous system. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 66-77.
- Parrish, J. Z., Kim, M. D., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2006). Genome-wide analyses identify transcription factors required for proper morphogenesis of Drosophila sensory neuron dendrites. *Genes Dev* **20**, 820-35.
- Patient, R. K. and McGhee, J. D.** (2002). The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* **12**, 416-22.
- Pereanu, W., Shy, D. and Hartenstein, V.** (2005). Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in Drosophila. *Dev Biol* **283**, 191-203.
- Perez, S. E. and Steller, H.** (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in Drosophila melanogaster. *J Neurobiol* **30**, 359-73.
- Perrimon, N. and Mahowald, A. P.** (1986). *l(1)hopscotch*, A larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in Drosophila. *Dev Biol* **118**, 28-41.
- Poeck, B., Fischer, S., Gunning, D., Zipursky, S. L. and Salecker, I.** (2001). Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of Drosophila. *Neuron* **29**, 99-113.
- Prokop, A., Martin-Bermudo, M. D., Bate, M. and Brown, N. H.** (1998). Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens and neuromuscular junctions in Drosophila embryos. *Dev Biol* **196**, 58-76.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of Drosophila melanogaster. *Development* **111**, 79-88.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-29.
- Ragone, G., Bernardoni, R. and Giangrande, A.** (2001). A Novel Mode of Asymmetric Division Identifies the Fly Neuroglioblaste 6-4T. *Dev Biol* **235**, 74-85.
- Ragone, G., Van De Bor, V., Sorrentino, S., Kammerer, M., Galy, A., Schenck, A., Bernardoni, R., Miller, A. A., Roy, N. and Giangrande, A.** (2003). Transcriptional regulation of glial cell specification. *Dev Biol* **255**, 138-50.

- Rangarajan, R., Gong, Q. and Gaul, U.** (1999). Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**, 3285-92.
- Ransick, A., Rast, J. P., Minokawa, T., Calestani, C. and Davidson, E. H.** (2002). New early zygotic regulators expressed in endomesoderm of sea urchin embryos discovered by differential array hybridization. *Dev Biol* **246**, 132-47.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-31.
- Reifegerste, R., Schreiber, J., Gulland, S., Ludemann, A. and Wegner, M.** (1999). mGCMA is a murine transcription factor that overrides cell fate decisions in *Drosophila*. *Mech Dev* **82**, 141-50.
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P. and Randsholt, N. B.** (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics* **162**, 1259-74.
- Rizki, R. M. and Rizki, T. M.** (1984a). Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6154-8.
- Rizki, T. M. and Rizki, R. M.** (1984b). The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In *Insect Ultrastructure*, vol. 2 (ed. R. C. King and H. Akai), pp. 579-604. New York: Plenum Publishing.
- Rowitch, D. H.** (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* **5**, 409-19.
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Development Genes and Evolution* **Volume 203**, 266-280.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y. and Brehelin, M.** (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112 (Pt 1)**, 135-42.
- Schaerlinger, B.** (2004). Rôle de la sérotonine dans le développement embryonnaire précoce de *Drosophila melanogaster* : Etude d'un mutant ponctuel du récepteur 5-HT_{2Dro}: Thèse.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Schnepf, B., Donaldson, T., Grumbling, G., Ostrowski, S., Schweitzer, R., Shilo, B. Z. and Simcox, A.** (1998). EGF domain swap converts a *drosophila* EGF receptor activator into an inhibitor. *Genes Dev* **12**, 908-13.

- Schnepp, B., Grumbling, G., Donaldson, T. and Simcox, A.** (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-13.
- Schreiber, J., Enderich, J. and Wegner, M.** (1998). Structural requirements for DNA binding of GCM proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 2337-43.
- Schreiber, J., Riethmacher-Sonnenberg, E., Riethmacher, D., Tuerk, E. E., Enderich, J., Bosl, M. R. and Wegner, M.** (2000). Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMA. *Mol Cell Biol* **20**, 2466-74.
- Schreiber, J., Sock, E. and Wegner, M.** (1997). The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4739-44.
- Schubert, S. W., Kardash, E., Khan, M. A., Cheusova, T., Kilian, K., Wegner, M. and Hashemolhosseini, S.** (2004). Interaction, cooperative promoter modulation, and renal colocalization of GCMA and Pitx2. *J Biol Chem* **279**, 50358-65.
- Sears, H. C., Kennedy, C. J. and Garrity, P. A.** (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* **130**, 3557-65.
- Selleck, S. B. and Steller, H.** (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* **6**, 83-99.
- Sepp, K. J., Schulte, J. and Auld, V. J.** (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**, 122-33.
- Shcherbata, H. R., Yatsenko, A. S., Patterson, L., Sood, V. D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D. and Ruohola-Baker, H.** (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *Embo J* **26**, 481-93.
- Shimizu, M., Hiroaki, H., Kohda, D., Hosoya, T., Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Morita, E. H. and Morikawa, K.** (2003). NMR and ICP spectroscopic analysis of the DNA-binding domain of the *Drosophila* GCM protein reveals a novel Zn²⁺-binding motif. *Protein Eng* **16**, 247-54.
- Shrestha, R. and Gateff, E.** (1982). Ultrastructure and Cytochemistry of the Cell Types in the Larval Hematopoietic Organs and Hemolymph of *Drosophila Melanogaster*. *Development, Growth & Differentiation* **Volume 24**, Page 65-82.
- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-31.
- Soderhall, K. and Cerenius, L.** (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-8.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y. and Govind, S.** (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* **243**, 65-80.

- Sorrentino, R. P., Melk, J. P. and Govind, S.** (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* **166**, 1343-56.
- Soustelle, L. and Giangrande, A.** (2004). Early Embryonic Development: Neurogenesis (CNS). In *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. I (ed. I. Gilbert K. Iatrou and S. S. Gill), pp. 343-378.
- Soustelle, L. and Giangrande, A.** (2007a). Glial differentiation and the Gcm pathway. *Neuron Glia Biology* **In press**.
- Soustelle, L. and Giangrande, A.** (2007b). Novel gcm-dependent lineages in the postembryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Dyn* **236**, 2101-8.
- Soustelle, L., Jacques, C., Altenhein, B., Technau, G. M., Volk, T. and Giangrande, A.** (2004). Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. *Development* **131**, 4521-32.
- Soustelle, L., Trousse, F., Jacques, C., Ceron, J., Cochard, P., Soula, C. and Giangrande, A.** (2007). Neurogenic role of Gcm transcription factors is conserved in chicken spinal cord. *Development* **134**, 625-34.
- Speck, N. A. and Gilliland, D. G.** (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev. Cancer* **2**, 502-513.
- Sprecher, S. G., Reichert, H. and Hartenstein, V.** (2007). Gene expression patterns in primary neuronal clusters of the *Drosophila* embryonic brain. *Gene Expr Patterns* **7**, 584-95.
- Strumpf, D. and Volk, T.** (1998). Kakapo, a novel cytoskeletal-associated protein is essential for the restricted localization of the neuregulin-like factor, vein, at the muscle-tendon junction site. *J Cell Biol* **143**, 1259-70.
- Sturrock, R. R.** (1982). Gliogenesis in the prenatal rabbit spinal cord. *J Anat* **134**.
- Subramanian, A., Prokop, A., Yamamoto, M., Sugimura, K., Uemura, T., Betschinger, J., Knoblich, J. A. and Volk, T.** (2003). Shortstop recruits EB1/APC1 and promotes microtubule assembly at the muscle-tendon junction. *Curr Biol* **13**, 1086-95.
- Subramanian, A., Wayburn, B., Bunch, T. and Volk, T.** (2007). Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in *Drosophila*. *Development* **134**, 1269-78.
- Suh, G. S., Poeck, B., Chouard, T., Oron, E., Segal, D., Chamovitz, D. A. and Zipursky, S. L.** (2002). *Drosophila* JAB1/CSN5 acts in photoreceptor cells to induce glial cells. *Neuron* **33**, 35-46.
- Takizawa, K. and Hotta, Y.** (2001). Pathfinding analysis in a glia-less gcm mutant in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **211**, 30-6.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-37.

- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **161**, 563-96.
- Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H. and Kolodkin, A. L.** (2002). MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**, 887-900.
- Thompson, E. A., Jr. and Siiteri, P. K.** (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem* **249**, 5373-8.
- Ting, C. Y. and Lee, C. H.** (2007). Visual circuit development in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 65-72.
- Truman, J. W.** (1990). Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *J Neurobiol* **21**, 1072-84.
- Truman, J. W. and Bate, M.** (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **125**, 145-57.
- Truman, J. W., Schuppe, H., Shepherd, D. and Williams, D. W.** (2004). Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development* **131**, 5167-84.
- Truman, J. W., Taylor, B. J. and Awad, T.** (1993). Formation of the adult nervous system. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1245-1275. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tsuda, L., Kaido, M., Lim, Y. M., Kato, K., Aigaki, T. and Hayashi, S.** (2006). An NRSF/REST-like repressor downstream of Ebi/SMRTER/Su(H) regulates eye development in *Drosophila*. *Embo J* **25**, 3191-202.
- Tzou, P., De Gregorio, E. and Lemaitre, B.** (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **5**, 102-10.
- Udolph, G., Rath, P. and Chia, W.** (2001). A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions. *Development* **128**, 1457-66.
- Umemiya, T., Takeichi, M. and Nose, A.** (1997). M-spondin, a novel ECM protein highly homologous to vertebrate F-spondin, is localized at the muscle attachment sites in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **186**, 165-76.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* **26**, 739-51.
- Van De Bor, V. and Giangrande, A.** (2002). glide/gcm: at the crossroads between neurons and glia. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 465-72.
- Van De Bor, V., Walther, R. and Giangrande, A.** (2000). Some fly sensory organs are gliogenic and require glide/gcm in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells. *Development* **127**, 3735-43.

- van der Plas, M. C., Pilgram, G. S., de Jong, A. W., Bansraj, M. R., Fradkin, L. G. and Noordermeer, J. N. (2007). Drosophila Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech Dev* **124**, 617-30.
- van der Plas, M. C., Pilgram, G. S., Plomp, J. J., de Jong, A., Fradkin, L. G. and Noordermeer, J. N. (2006). Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the Drosophila neuromuscular junction. *J Neurosci* **26**, 333-44.
- Vanolst, L., Fromental-Ramain, C. and Ramain, P. (2005). Toutatis, a TIP5-related protein, positively regulates Pannier function during Drosophila neural development. *Development* **132**, 4327-38.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. and Giangrande, A. (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131-9.
- Volk, T. and VijayRaghavan, K. (1994). A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the Drosophila embryo. *Development* **120**, 59-70.
- Vorbruggen, G., Constien, R., Zilian, O., Wimmer, E. A., Dowe, G., Taubert, H., Noll, M. and Jackle, H. (1997). Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in Drosophila. *Mech Dev* **68**, 139-47.
- Vorbruggen, G. and Jackle, H. (1997). Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing Drosophila epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8606-11.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S. and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in Drosophila haematopoiesis. *Embo J* **21**, 5477-86.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L. and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during Drosophila hematopoiesis. *Embo J* **22**, 6516-25.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A. and Jones, R. S. (2004). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**, 637-46.
- Warren, L. A. and Rothenberg, E. V. (2003). Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Curr Opin Immunol* **15**, 166-75.
- Williams, M. J., Wiklund, M. L., Wikman, S. and Hultmark, D. (2006). Rac1 signalling in the Drosophila larval cellular immune response. *J Cell Sci* **119**, 2015-2024.
- Winberg, M. L., Perez, S. E. and Steller, H. (1992). Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of Drosophila melanogaster. *Development* **115**, 903-11.
- Wright, T. R. (1960). The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in Drosophila melanogaster. *J Exp Zool* **143**, 77-99.

- Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. and Montell, C.** (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes Dev* **8**, 981-94.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yamada, K., Ogawa, H., Honda, S., Harada, N. and Okazaki, T.** (1999). A GCM motif protein is involved in placenta-specific expression of human aromatase gene. *J Biol Chem* **274**, 32279-86.
- Yarnitzky, T., Min, L. and Volk, T.** (1997). The Drosophila neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev* **11**, 2691-700.
- Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M. and Tabata, T.** (2005). DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of Drosophila. *Development* **132**, 4587-98.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P. and Hartenstein, V.** (1996). Early neurogenesis of the Drosophila brain. *J Comp Neurol* **370**, 313-29.
- Yu, C., Shen, K., Lin, M., Chen, P., Lin, C., Chang, G. D. and Chen, H.** (2002). GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem* **277**, 50062-8.
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W. C., Hiromi, Y. and Okano, H.** (2003). Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* **130**, 2419-28.
- Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. and Hultmark, D.** (2004). A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14192-7.
- Zhao, J.** (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.*