UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :

Guillaume TREBUCHET

soutenue le : **25 Septembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie du développement

Etude des mécanismes de la différenciation cellulaire impliquant le facteur de transcription Glide/Gcm chez la drosophile

THÈSE dirigée par :

Mme GIANGRANDE Angela	Docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. REICHERT Heinrich	Professeur, Biozentrum University of Basel
Mme. HIDALGO Alicia	Professeur, School of Biosciences University of Birmingham

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. FERRANDON Dominique	Docteur, université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon comité de thèse, Pr. Alicia Hidalgo, Pr. Heinrich Reichert et Dr. Dominique Ferrandon. C'est vraiment un honneur que vous ayez accepté de juger ma thèse.

Je remercie également Dr. Angela Giangrande pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe pendant quatre ans, pour son soutient et pour m'avoir transmis ses connaissances. Ce fut une expérience très enrichissante.

Merci à La Ligue et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour leur soutient financier et leur confiance dans mes travaux.

Je remercie particulièrement mes premiers coachs, Dr. Orban Komoniyi, pour m'avoir appris tout ce qu'il faut savoir sur les drosophiles et pour son soutient sans faille, et Dr. Pietro Laneve pour tout ce qui est en rapport avec la biologie moléculaire et la bonne humeur qu'il apportait dans l'équipe. Vous êtes vraiment des exemples à suivre.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe qui forment et un environnement de travail formidable et très diversifié. Claude Delaporte et Céline Diebold (merci de tenir le labo en ordre !!!), Damiano Porcelli, Sara Bersenyi, Arun Kumar, Omer Faruk Karatas (j'aurais aimé travailler plus avec toi, dommage que tu sois partit si tôt), Francesca Taglini, Tripti Gupta (you're crazy ^^), Anna Popkova, Giualia Papalini, Carole Mura, Iren Kerekes, Guiseppe d'Agostino, Yoshihiro Yuasa (the best climbing partner), Chettan Reddy, Pierre Cattenoz, Wael Bazzi, Janos Zsamboki et Yazeed ZamZami. Je remercie particulièrement ma stagiaire Maria Pezze avec qui j'ai partagé mon projet pendant 1 an.

Merci également aux membres des plateformes de production de peptides et d'anticorps, Pascal Eberling, Mustapha Oulad-Abdelghani et Gilles Duval. Sans vous, ce projet n'aurai pas été le même. Je remercie aussi les membres de la plateforme d'imagerie, Marc Koch, Pascal Kessler, Marcel Boeglin, Yves Lutz, Jean-Luc Vonesch, et les membres de la plateforme des drosophiles, Nadine Arbogast et Holy Dietrich, pour leur disponibilité et leur savoir faire.

Un grand merci à tous mes collègues de l'IGBMC avec qui j'ai passé de bons moments pendant ces quatre années.

Finalement, le meilleur pour la fin, merci ma chérie, Manon, pour son soutient, et à mes parents, France et Jean-Louis, pour avoir relu et corrigé ma thèse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 1

TABLE DES FIGURES 7

TABLE DES TABLES 9

ABREVIATIONS 10

Introduction **13**

I. LA DROSOPHILE 15

I.A. La drosophile comme modèle d'étude 15

I.B. Cycle de développement 17

I.B.1. Cycle de vie 17

I.B.2. Embryogénèse 17

II. LES CELLULES GLIALES DANS LE SYSTEME NERVEUX 19

II.A. Structure du système nerveux 19

II.B. Les neurones 21

II.C. La glie 21

II.C.1. Diversité des cellules gliales 21

II.C.1.a. Dans le CNS *21*

II.B.1.b. Dans le PNS *23*

II.C.2. Fonctions de la glie 25

II.C.2.a. Rôle dans la transmission du signal *25*

II.C.2.b. Rôle dans la connectivité neurale *27*

II.C.2.c. Rôle dans l'homéostasie du système nerveux *31*

II.C.2.d. Mécanismes de la phagocytose gliale *35*

III. BASES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA GLIOGENESE **38**
III.A. Les précurseurs neuraux **38**
III.A.1. Origine 38
III.A.2. Mode de division des progéniteurs neuraux 40
III.A.3. Les différentes classes de précurseurs neuraux 40
III.A.4. Cartographie 42
III.A.5.La division asymétrique 44
III.B. Glide/Gcm et la gliogénèse **46**
III.B.1. Le déterminant glial 46
III.B.2. Régulation 47
III.B.3. La cascade transcriptionnelle de la gliogénèse 48
III.B.3.a. Le mode d'action de Gcm *48*
III.B.3.b. L'autorégulation *48*
III.B.3.c. Le gène homéotique repo *50*
III.B.3.c. Le gène tramtrack *52*
III.B.3.d. Les gènes loco et pointed *54*
III.B.4. Structure de la protéine Gcm 54
III.B.5. La famille des facteurs de transcription de type Gcm 56
III.B.6. Le territoire d'expression de *gcm* et ses autres rôles 58

IV. LE SYSTEME IMMUNITAIRE **60**
IV.A. L'Immunité chez la drosophile **60**
IV. B. Les hémocytes **60**
IV.B.1. Les plasmatocytes et la phagocytose 60
IV.B.2. Les cellules à cristaux et la mélanisation 62
IV.B.3. Les lamellocytes et l'encapsulation 64
IV.C. Origine des hémocytes **65**
IV.D. L'hématopoïèse larvaire **67**
IV.D.1. La glande lymphatique 67
IV.D.3. La voie JAK/STAT et les tumeurs mélanotiques 68
IV.E. L'hématopoïèse embryonnaire **70**

IV.E.1. Chronologie 70
IV.E.2. La migration des plasmatocytes 72
IV.E.3. Les facteurs de transcription 74
IV.E.3.a. Le déterminant mésodermal Twist *74*
IV.E.3.b. Le déterminant hémocytaire Srp et son cofacteur U-shaped *74*
IV.E.3.c. Le déterminant des cellules à cristaux Lozenge *76*
IV.E.3.d. Le déterminant plasmatocytaire Gcm *77*
IV.E.4. L'hématopoïèse chez les vertébrés 79

V. OBJECTIFS DE LA THESE 83
V.1. De la glie au sang : choix du destin entre hémocytes et cellules gliales. 83
V.2. Caractérisation du territoire d'expression de *gcm* au niveau protéique : identification d'un nouveau rôle de Gcm dans la production de cellules neurosécrétrices. 84

Publication 1 : Glial cells in neural developpement 85

Résultats **99**

Publication 2 : Of Glia and Blood 100

I. OF GLIA AND BLOOD : RESUME DE LA PUBLICATION 101
I.A. Contexte scientifique général 101
I.B. Résultats 102
I.B.1. Caractérisation du potentiel gliogénique et hématopoïétique de Gcm 102
I.B.2. Rôle du dosage de Gcm et des facteurs indépendants 103
I.B.3. Repo contribue à la répression du destin hémocytaire dans la glie. 103
I.B.4. La perte de fonction de Repo n'induit pas de phagocytes ectopiques. 104
I.B.5. Repo agit comme le gardien de l'identité gliale. 104
I.C. Conclusion 105

II. RESULTATS ADDITIONNELS 1 : ETUDE DE LA REGULATION DE *REPO* **154**

II.A. Construction de rapporteurs transcriptionnels de *repo* **154**

II.B. Twi et Srp ne répriment pas directement *repo in* vitro. **154**

II.C. Etude du rôle des boites E dans la régulation de *repo in vivo*. **156**

II.D. Discussion et perspectives **158**

III. RESULTATS ADDITIONNELS 2 : RECHERCHE DE NOUVELLES CIBLES DIRECTES DE GCM DANS LES HEMOCYTES **160**

III.A. Le crible Dam-ID **160**

III.B. Validation du crible Dam-ID *in vitro* : **162**

III.C. *singed,* une nouvelle cible directe de Gcm dans les hémocytes **164**

III.C.1. Gcm active Singed 164

III.C.2. Etude de la régulation transcriptionnelle de *singed* 164

III.C.2.a. Etude in vitro *164*

III.C.2.b. Etude in vivo *166*

III.D. Repo réprime *singed* dans une sous-population de cellules gliales. **168**

III.E. Discussion et perspectives **168**

Publication 3 : The Gcm/Glide molecular pathway : new actors and new lineages. **173**

IV. THE GCM/GLIDE MOLECULAR PATHWAY : NEW ACTORS AND NEW LINEAGES. RÉSUMÉ DE LA PUBLICATION **174**

IV.A. Contexte scientifique général **174**

IV.B. Résultats **175**

IV.B.1. Caractérisation de la protéine Gcm-FLAG 175

IV.B.2. Génération et caractérisation des souches transgéniques *gcm-FLAG*^{BAC} 175

IV.B.3. Gcm est exprimé et requis dans les cellules péritrachéales 176

IV.B.3. Gcm et le métabolisme des miRNAs 177

IV.C. Conclusion **177**

Matériels et Méthodes 205

I. PRÉPARATION ET CULTURE DES MICROORGANISMES 206

I.A. Les souches d'*E .coli* 206

I.B. Préparation et transformation de cellules électro-compétentes 206

II. MÉTHODES LIÉES À LA TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT 208

II.A. Electrophorèse sur gel d'agarose 208

II.B. Réaction d'amplification en chaîne (PCR) 208

II.B.1. PCR classique 208

II.B.1. Mutagénèse par PCR 210

II.C. Extraction et purification de l'ADN 210

II.C.1. Extraction de l'ADN génomique 210

II.C.2. Extraction de l'ADN plasmidique 210

II.C.3. Purification des acides nucléiques 212

II.D. Modifications enzymatiques des acides nucléiques 212

II.E. Les plasmides 214

II.E.1. Les vecteurs d'expression 214

II.E.2. Les rapporteurs transcriptionnels 214

II.F. Clonages moléculaires 216

II.F.1. Génération du rapporteur muté *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4* 216

II.F.2. Génération du rapporteur *repo(4.3kb)ΔTBSs-GFP* 216

II.F.3. Génération du rapporteur *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBSs-GFP* 218

II.F.3. Génération des autres rapporteurs transcriptionnels : *STAT92E(2-4)-GFP*, *STAT92E(2-4)ΔGBSs-GFP*, *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*. 220

III. METHODES COURANTES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 222

III.A. Culture cellulaire et transfection 222

III.B. Techniques liées à l'étude des protéines 222

III.B.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) 222

III.B.2. Surproduction et purification de la protéine GST-Twi 224

III.B.3. Expérience de retard de migration électrophorétique (EMSA) 226
III.B.4. Western Blot 226
III.B.5. Immunocytochimie 228
III.C. Techniques liées à l'étude des ARNs 230
III.C.1. Extraction des ARNs solubles 230

IV. METHODES D'ETUDES *IN VIVO* CHEZ LA DROSOPHILE 233
IV.A. Le système UAS-Gal4 233
IV.B. Les souches transgéniques utilisées 234
IV.C. Immunohistochimie 235
IV.D. Microscopie 236
IV.E. Statistiques 236

Discussion Générale **237**

REFERENCES 243

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de développement de Drosophila mélanogaster 14
Figure 2 : La gastrulation 16
Figure 3 : Les différents stades de l'embryogénèse 16
Figure 4 : Le système nerveux embryonnaire de la drosophile 18
Figure 5 : Organisation des axones dans le système nerveux 20
Figure 6 : Diversité de la glie latérale dans la VNC chez l'embryon 22
Figure 7 : Ultrastructure d'un nerf périphérique au troisième stade larvaire 24
Figure 8 : Modèle du recyclage du glutamate par les cellules gliales 26
Figure 9 : Le guidage des axones dépend de molécules sécrétées et de leurs récepteurs 28
Figure 10 : Remodelage des axones des corps pédonculés durant la métamorphose 30
Figure 11 : Nettoyage de CNS par les CBGs 32
Figure 12 : Rôle de la glie dans la régénération du CNS 32
Figure 13 : Bases moléculaires de la phagocytose gliale 34
Figure 14 : Le processus d'inhibition latérale 37
Figure 15 : Les cellules souches neurales dans le CNS embryonnaire 39
Figure 16 : Carte des NPs dans la VNC embryonnaire 41
Figure 17 : Division asymétrique d'un NGB de type 2 43
Figure 18 : Division asymétrique d'un NGB de type 1 43
Figure 19 : Gcm, un interrupteur moléculaire entre neurones et glie 45
Figure 20 : Etude de la régulation transcriptionnelle de *repo* dans le CNS de l'embryon 49
Figure 21 : La cascade transcriptionnelle de la gliogénèse 51
Figure 22 : Structure du transcrit *gcm* 53
Figure 23 : Structure cristallographique du DBD en interaction avec l'ADN 53
Figure 24 : Le locus de *gcm* 55
Figure 25 : Structure des protéines de type Gcm 55
Figure 26 : Territoire d'expression de *gcm* et *gcm2* chez l'embryon 57
Figure 27 : Les plasmatocytes 61
Figure 28 : Les cellules à cristaux 63
Figure 29 : Les lamellocytes et l'encapsulation 63

Figure 30 : La glande lymphatique.....66
Figure 31 : La voie JAK/STAT chez la drosophile.....69
Figure 32 : La voie JAK/STAT et les tumeurs mélanotiques 69
Figure 33 : L'hématopoïèse embryonnaire 71
Figure 34 : Singed est requis pour la formation des filopodes.....73
Figure 35 : Structure des facteurs GATA.....75
Figure 36 : Mécanisme gouvernant l'acquisition de l'identité cellulaire durant l'hématopoïèse embryonnaire.....78
Figure 37 : Comparaison de l'hématopoïèse chez la drosophile et les vertébrés.....80
Figure 38 : Problématique.....82
Figure 39 : Carte génomique de Repo.....153
Figure 40 : Etude de la régulation de *repo* par Twi et Srp *in vitro* 155
Figure 41 : Etude du rôle des boites E dans la régulation de *repo in vivo* 157
Figure 42 : Gcm peut directement activer *STAT92E in vitro*.....161
Figure 43 : Gcm peut activer l'expression de Singed dans les cellules S2. 163
Figure 44 : Gcm est requis pour l'expression de Singed dans les hémocytes.....163
Figure 45 : Gcm peut activer *singed in vitro.*.....165
Figure 46 : Gcm peut activer singed dans le territoire neurogénique. 167
Figure 47 : Repo réprime *singed* dans une sous-population de cellules gliales.....169
Figure 48 : Mutagénèse des quatre TBSs du promoteur de *repo* 209
Figure 49 : Carte du plasmide *psrp(hemo)-Gal4*.....211
Figure 50 : Carte du plasmide *pH-Stinger repo(4.3kb)-nGFP*.....213
Figure 51 : Construction du plasmide *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4* 215
Figure 52 : Construction du plasmide *repo(4.3kb)ΔTBS-GFP* 217
Figure 53 : Construction des rapporteurs *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP* 219
Figure 54 : Construction des rapporteurs *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP* 221
Figure 55 : Surproduction et purification de la protéine GST-Twi.....223
Figure 56 : Détection de l'expression de Twi et Srp par immunocytochimie.....227
Figure 57: Le système UAS/Gal4 232

TABLE DES TABLES

Table 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR 207
Table 2 : Liste des oligonucléotides radiomarqués en 5' 225
Table 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR 229

ABREVIATIONS

A/P : Antéro-postérieur
aa : Acide aminé
Abd-A/ Abd-B : Abdominal-A/Abdominal-B
AD : Domaine transactivateur
Ago-1 : Argonaute-1
AML-1 : Acute myeloid leukemia factor 1
AP-1 : Activator Protein 1
APF : Après la formation de la pupe
aPKC : Atypical protein kinase C
APS : Persulfate d'ammonium
Ase : Asense
BAC : Chromosome artificiel bactérien
BBB : Barrière sang-cerveau
Bc : Black cell
BET : Bromure d'éthidium
β-Gal : β-Galactosidase
bHLH : Hélice-boucle-hélice basique
BNB : Barrière sang-nerf
BTB : Bric-à-brac Tramtrack Broad
Casp3 : Caspase3
CBG : Glie des corps cellulaires
CDNF : Conserved dopamine neurotrophic factor
CG : Glie du canal
ChIP-seq : Immunoprécipitation de la chromatine suivie par un séquençage à haut débit
CNS : Système nerveux central
Crq : Croquemort
Cyc : Cycline
D/V : Dorso-ventral
Dam : ADN méthyltransférase
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
Dome : Domeless
Dpn : Deadpan
E(spl) : Enhancer-of-split
EAAT : Transporteur d'acides aminés excitateurs
EDC : 1-Ethyl-3-(diméthylaminopropyle) carbodiimide
EGF : Epidermal growth factor
EH : Eclosion hormone
Elav : Embryonic lethal abnormal vision
EMI : EMILIN
EMSA : Expérience de retard de migration électrophorétique
ETH : Ecdysis-triggering hormone
ETS : Erythroblast Transformation Specific
FDR : Taux de fausses découvertes
FOG : Friend of GATA
GB : Glioblastes
GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP : Green fluorescent protein
Glide/Gcm : Glial cell missing/Glial cell deficient
GMC : Cellule mère des ganglions
GOF : Gain-de-function
GPC : Précurseur des cellules gliales
GS : Glutamine synthétase
GSH : Glutation

GST : Glutation S-transférase
Hh : Hedgehog
Hkb : Huckebein
HRP : Horseradish peroxidase
HSC : Cellule souche hématopoïétique
IE : Elément d'instabilité
IGF : Insuline/insulin-like growth factor
INP : Progéniteur neural intermédiaire
Insc : Inscuteable
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
LB : Luria Broth
LG : Glie longitudinale
LGB : Glioblaste longitudinal
Loco : Locomotion defect
LOF : Perte de fonction
LPC : Cellule précurseur de la lamina
Lz : Lozenge
MANF : Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
Mef2 : Mesodermal factor 2
Mira : Miranda
NB : Neuroblaste
NGB : Neuroglioblastes
NGS : Normal goat sérum
NIM : Nimrod
NLS : Signal de localisation nucléaire
NP : Précurseur neural
NRG : Glie des racines nerveuses
NSC : Cellule souche neurale
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
Par : Partition-defective
PDGF : Plateled-derived growth factor
PGs : Glie périneurale
PHM : Peptidylglycine a-hydrolylating monooxygénase
Pias : Protein inhibitor of activated STAT
Pins : Partner of Inscuteable
PM : Mésoderme procéphalique
PNS : Système nerveux périphérique
Pnt : Pointed
PO : Phénoloxydase
Pon : Partner of Numb
Pros : Prospero
PS : Phosphatidyl-serine
PSC : Centre de signalisation postérieur
PTP : Protein tyrosine phosphatase
PVF : PDGF/VEGF-like factor
PVR : PDGF/VEGF receptor
Ras85D : Ras oncogène at 85D
RBS : Sites de fixation de Repo
Robo : Roundabout
RUNX : Runt box
S2 : Schneider 2
SDS : Dodécylsulfate de sodium
SIMU : Six microns under
Socs : Suppressor of cytokine signaling
SPG : Glie subpérineurale
Srp : Serpent

ssDNA : ADN de sperme de saumon

STAT : Signal transducers and activators of transcription

Stau : Staufen

Su(H) : Supressor of hairless

TBS : Site de fixation de Twi

TEMED : Tétraméthylène diamine

Ttk : Tramtrack

Twi : Twist

UAS : Upstream activating sequence

Ubx : Ultrabithorax

UDO : Unité de densité optique)

Upd : Unpaired

UTR : Région non traduite

VEFG : Vascular endothelial growth factor

VM : Ventromédial

VNC : Corde nerveuse ventrale

WGs : Glie d'emballage

ZC : Zone corticale

ZM : Zone médullaire

Introduction

Figure 1 : Cycle de développement de Drosophila mélanogaster

Le développement de *Drosophila mélanogaster* dure dix jours à 25 °C et passe par quatre stades. Le stade embryonnaire s'étend sur 24h. Ensuite, 3 stades larvaires successifs (L1-L3) permettent la mise en place des disques imaginaux. Entre les stades larvaires et l'émergence de l'adulte se produit la métamorphose dans la pupe. La durée de chaque stade est indiquée sur le schéma. (http://flymove.uni-muenster.de/)

I. LA DROSOPHILE

I.A. La drosophile comme modèle d'étude

Un des grands défis de la biologie du développement est de comprendre comment la diversité cellulaire est engendrée. Un intérêt majeur est donné aux cellules souches qui sont douées d'auto-renouvellement et de plasticité. Les premiers stades de l'embryogenèse permettent la formation d'une masse de cellules souches totipotentes capables de reconstituer un organisme entier. Le développement de l'embryon amène progressivement à une perte de la plasticité des cellules souches et leur différenciation. Une cellule différenciée est dotée d'un programme transcriptionnel spécifique établi par des combinaisons de facteurs de transcription impliqués dans l'initiation de la différenciation puis dans la consolidation et le maintien de l'identité cellulaire. *Drosophila melanogaster* est un modèle de choix pour étudier le développement des organismes complexes de part son cycle de vie rapide (**Fig. 1**), la conservation au cours de l'évolution de processus biologiques majeurs et la disponibilité d'une approche génétique solide.

Beaucoup de gènes majeurs impliqués dans le développement ont été identifiés grâce aux travaux sur ce modèle d'étude. En 1995, E. B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E.F. Wieschaus ont reçu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour leur découverte sur le contrôle du développement embryonnaire précoce par les gènes homéotiques et par les gènes déterminant le plan d'organisation des axes majeurs dorso-ventral (D/V) et antéro-postérieur (A/P) chez les êtres vivants **(Roush, 1995)**. Il a ainsi été démontré que les gènes homéotiques Hom (insectes) et Hox (vertébrés) présentent de grandes similitudes dans leur séquence, leur organisation, leur profil d'expression et leurs fonctions **(Akam, 1989)**. En 2011, les Dr. B. A. Beutler et J. A. Hoffman et R. M. Steinman sont aussi récompensé par le prix Nobel pour leurs études sur les mécanismes de l'immunité innée et en particulier pour la découverte des récepteurs de type Toll chez la drosophile **(Lemaitre et al., 1996; Tauszig et al., 2000)** et Toll-like chez les vertébrés **(Poltorak et al., 1998)**. Ces récepteurs sont nottement impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes.

Figure 2 : La gastrulation

Durant la gastrulation, le blastoderme cellulaire (Stade 5) s'invagine donnant naissance aux trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme (ms, vert) et l'ectoderme. L'interaction entre l'ectoderme et le mésoderme donne lieu à la formation du mésectoderme (mec, bleu). Les cellules souches neurales délaminent (NCSs, violet) de l'épithélium neurogénique (NE, rose) à partir du stade 9. **(Hartenstein, 1995)**

Figure 3 : Les différents stades de l'embryogénèse

Vue dorsale des principaux changements morphologiques durant le développement de l'embryon sont : l'invagination du blastoderme (stade 5), l'élongation (stade 9-11) puis la rétractation (stade 12) de la bande germinale, la segmentation (stade 11) et la fermeture dorsale (stade13-15).

I.B. Cycle de développement

I.B.1. Cycle de vie

Le cycle de vie de la drosophile passe par quatre stades **(Fig. 1)**. Le stade embryonnaire précède trois stades larvaires où se mettent en place les tissus imaginaux, amas cellulaires qui donneront les structures adultes. Viennent ensuite le stade pupal, au cours duquel se déroule la métamorphose et où l'organisme subit de profonds changements morphologiques, et enfin le stade adulte. Entre chaque stade larvaire et avant l'éclosion de l'adulte se produit la mue, un phénomène permettant à l'organisme de changer de cuticule.

I.B.2. Embryogénèse

Le cycle embryonnaire est lui-même subdivisé en 17 stades **(Campos-Ortega and Hartenstein, 1985)**. Durant les premiers stades, le noyau de l'œuf fertilisé effectue 13 divisions rapides pour former le blastoderme syncytial. Les noyaux s'organisent en une seule couche sous la surface de l'œuf avant d'être séparés par des membranes pour former le blastoderme cellulaire. Durant la gastrulation (stade 6-8), le blastoderme s'invagine donnant naissance aux trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (**Fig. 2**). L'interaction entre l'ectoderme et le mésoderme donne lieu à la formation du mésectoderme. Ici, nous nous intéresserons principalement aux hémocytes et aux cellules neurales qui proviennent respectivement du mésoderme procéphalique (PM) et de l'ectoderme neurogénique. Les principaux changements morphologiques qui se produisent durant la suite de l'embryogénèse sont l'allongement de la bande germinale (stade 9-11), la formation des sillons parasegmentaux qui séparent la bande germinale en unités métamériques (stade 11), la rétractation de la bande germinale (stade 12), la fermeture dorsale (stade 15) et l'involution de la tête (stade 17) (**Fig. 3**).

Figure 4 : Le système nerveux embryonnaire de la drosophile

Visualisation des neurones (vert) et des cellules gliales (rouge) de l'embryon de drosophile. Le système nerveux central (CNS) et le système nerveux périphérique (PNS) sont indiqués ainsi que le cerveau et la corde nerveuse ventrale (VNC). Barre d'échelle : 50 µm.

II. LES CELLULES GLIALES DANS LE SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux est le plus complexe système du corps humain. Il est constitué de milliards de neurones et de cellules gliales organisés dans un réseau serré. Les neurones sont requis pour la transmission de l'information tandis que la glie joue de nombreux rôles dans le développement du système nerveux et dans la maintenance des fonctions neurologiques. De manière intéressante, les systèmes nerveux des vertébrés et des invertébrés partagent de nombreuses similarités. Ainsi, les gènes qui sont nécessaires et suffisants pour induire la neurogenèse ont été conservés au cours de l'évolution **(Kiefer et al., 2005)**. Ces découvertes mettent en valeur l'importance de la drosophile comme modèle pour étudier le développement et le fonctionnement du système nerveux.

II.A. Structure du système nerveux

Chez la drosophile, le système nerveux est d'abord divisé en trois parties : le CNS, le système nerveux périphérique (PNS) et le système nerveux stomatogastrique, qui ne sera pas abordé ici **(Hartenstein et al., 1994)**. Le CNS comprend le cerveau et la corde nerveuse ventrale (VNC) **(Fig. 4)**. Le cerveau est constitué de deux lobes optiques et du cerveau central **(Fischbach and Hiesinger, 2008)**. La VNC, qui est l'équivalent de la moelle épinière chez les vertébrés, permet de relier le cerveau au PNS qui s'étend jusqu'aux organes sensoriels. La VNC est subdivisée en trois segments thoraciques (T1-T3) et huit segments abdominaux (A1-A8). A la fin de l'embryogénèse, chaque segment (ou neuromère) contient approximativement 600 neurones et 60 cellules gliales. Grâce son organisation simple et segmentée, la VNC constitue un excellent modèle pour étudier les mécanismes moléculaires qui gouvernent le développement du système nerveux à une résolution cellulaire. Le PNS contient 12 cellules gliales par hémisegment qui entourent les nerfs périphériques **(von Hilchen and Altenhein, 2014)**. La plupart de ces cellules gliales ont pour origine le CNS d'où elles ont migré pour atteindre le PNS **(Sepp et al., 2000)**.

Figure 5 : Organisation des axones dans le système nerveux

Visualisation des trois fuseaux d'axones longitudinaux du neuropile et des motoneurones (Vert) (Santos et al., 2007; von Hilchen et al., 2013). Dans le CNS, les axones sont organisés dans une structure en forme d'échelle. Les motoneurones projettent leurs axones du neuropile vers la périphérie par le nerf segmental (SN) et le nerf intersegmental (ISN). Barre d'échelle : 40 µm.

II.B. Les neurones

Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire à partir duquel s'étendent une branche principale, l'axone, et des branches secondaires, les dendrites. Les neurones communiquent entre eux ou avec d'autres tissus par les synapses.

Trois principaux types de neurones sont présents dans le système nerveux : les neurones sensoriels, les motoneurones et les interneurones. Les neurones sensoriels projettent leurs axones des organes sensoriels périphériques vers le CNS. Les interneurones forment de multiples connexions pour relayer l'information entre plusieurs neurones. On distingue les interneurones intersegmentaux qui relayent l'information entre deux segments et les interneurones locaux qui transmettent l'information à l'intérieur d'un même segment. Enfin les motoneurones étendent leurs axones du CNS à la périphérie pour innerver les muscles.

Après leur naissance, les axones s'étendent le long de voies spécifiques jusqu'à atteindre leurs cibles (**Fig. 5**) (**Landgraf and Thor, 2006**). Ils s'organisent en deux fuseaux bilatéraux le long de l'axe A/P de l'embryon et forment deux commissures par segments : la commissure antérieure et la commissure postérieure. Ces fuseaux d'axones constituent le neuropile. Chaque hémineuromère (ou hémisegment) est également caractérisé par un nerf segmental et un nerf intersegmental qui quittent le CNS vers la périphérie. Ces nerfs sont composés d'axones des neurones moteurs et sensoriels.

II.C. La glie

II.C.1. Diversité des cellules gliales

II.C.1.a. Dans le CNS

A l'intérieur de la VNC, deux types de glie sont définis selon leur feuillet embryonnaire d'origine : la glie latérale qui provient du neuroectoderme et la glie de la ligne médiane qui dérive du mésectoderme (**Bossing and Technau, 1994; Jacobs, 2000**). Les cellules gliales latérales et les cellules gliales de la ligne médiane ont des origines et des comportements complètement

Figure 6 : Diversité de la glie latérale dans la VNC chez l'embryon

Dans le CNS, les cellules gliales latérales sont divisées en plusieurs groupes selon leur position (surface, cortex ou neuropile). Une section transversale d'un embryon mature est représentée. Les cellules gliales localisées dans le cortex (en rouge) sont appelées cellules gliales des corps cellulaires (CBG). Elles sont en contacts avec les corps cellulaires des neurones. Parmi les cellules gliales associées aux axones (en vert), les cellules gliales longitudinales (LG) sont localisées à la surface du neuropile alors que les cellules gliales des racines nerveuses (NRG) recouvrent les nerfs périphériques qui quittent la VNC. Parmi les cellules gliales localisées à la surface de la VNC (en bleu), les cellules gliales subpérineurales (SPG) sont localisées à la surface externe alors que les cellules gliales du canal (CG) sont positionnées le long du canal D/V entre les hémineuromères.

différents. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la glie latérale qui requiert le facteur de transcription Glial cell missing/Glial cell deficient (Glide/Gcm) pour se différencier **(Akiyama et al., 1996; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996)**.

Les cellules gliales latérales sont divisées en trois groupes selon leur morphologie et leur localisation dans la VNC (surface, cortex et neuropile) **(Fig. 6) (Ito et al., 1995)**. Les cellules gliales subpérineurales (SPGs), rondes et plates, sont associées avec la surface externe tandis que les cellules gliales des canaux (CGs) sont associées avec la surface interne qui sépare deux hémisegments. Dans le cortex, les cellules gliales des corps cellulaires (CBGs), en forme d'étoile, sont entremêlées entre les corps cellulaires des neurones. Elles ressemblent morphologiquement aux astrocytes des vertébrés **(Freeman and Doherty, 2006)**. Enfin, les cellules gliales longitudinales (LGs) recouvrent les fuseaux d'axones du neuropile alors que les cellules gliales des racines nerveuses (NRGs) enveloppent les nerfs qui se projettent vers la périphérie. Aux stades larvaires, une couche supplémentaire de cellules gliales périneurales (PGs) recouvre la surface externe de la VNC **(Edwards et al., 1993; Stork et al., 2008)**. Cette classification simple ne reflète pas l'entière complexité des sous-types de glie puisque chaque cellule gliale individuelle exprime une combinaison unique de marqueurs **(Beckervordersandforth et al., 2008)**. Les cellules gliales sont donc extrêmement diversifiées ce qui leur permet d'accomplir de nombreuses tâches pour supporter les fonctions neuronales.

II.B.1.b. Dans le PNS

Dans le PNS, plusieurs couches de cellules gliales recouvrent les nerfs périphériques **(Stork et al., 2008)**. A la surface externe se trouve les cellules gliales périneurales (PGs). Les PGs prolifèrent principalement aux stades larvaires et très peu d'entre elles sont observées chez l'embryon. La seconde couche est formée par les SPGs. La couche finale est formée par les cellules gliales d'emballage (WGs) qui ressemblent en apparence aux cellules de Schwann non myélinisantes des vertébrés **(Fig. 7) (Nave and Salzer, 2006; Nave and Trapp, 2008)**.

Figure 7 : Ultrastructure d'un nerf périphérique au troisième stade larvaire

Les cellules gliales périneurales (PGs, bleu) et subpérineurales (SPGs, violet) forment les couches externes tandis que les cellules gliales d'emballage (WGs, rouge) forment une gaine autours des axones (ax). Les SPGs forment un feuillet continu, la barrière sang-nerf (BNB) grâce à des jonctions septates autocellulaires (tête de flèche blanche) **(Stork et al., 2008)**. Barre d'échelle : 1 µm.

II.C.2. Fonctions de la glie

II.C.2.a. Rôle dans la transmission du signal

Chez les vertébrés, les oligodendrocytes dans le CNS et les cellules de Schwann dans le PNS forment une gaine de myéline autour des axones, ce qui augmente considérablement la vitesse de conduction des impulsions nerveuses. Les cellules gliales des invertébrés ne forment pas de gaine de myéline, les membranes des WGs forment un feuillet multicouche autour des axones périphériques qui ressemble morphologiquement à la gaine de myéline bien que moins compacte et moins complexe **(Leiserson et al., 2000; Nave and Salzer, 2006)**. Chez l'embryon, les WGs séparent grossièrement les fuseaux d'axones moteurs et sensoriels. Elles vont progressivement isoler individuellement chaque axone périphérique durant les stades larvaires. Les WGs expriment la sérine/thréonine kinase Fray dont la fonction est absolument requise pour l'emballage des axones. Les animaux mutants pour le gène *fray* montrent des problèmes de défasciculation et meurent aux stades larvaires **(Leiserson et al., 2000)**.

Le système nerveux de la drosophile doit être isolé des tissus non neuraux puisque la forte concentration d'ions K^+ contenue dans l'hémolymphe abolirait l'excitabilité des neurones. A la fin de l'embryogénèse, les SPGs forment un feuillet continu qui isole complètement le système nerveux et permet d'éviter la dépolarisation **(DeSalvo et al., 2011; Stork et al., 2008)**. Ce feuillet est appelé la barrière sang-cerveau (BBB) dans le CNS ou la barrière sang-nerf (BNB) dans le PNS. Chez les vertébrés, la barrière est formée par les astrocytes en association avec l'endothélium vasculaire **(Obermeier et al., 2013).** Chez la drosophile, la barrière est formée par les cellules gliales périneurales (PGs) et subpérineurales (SPGs) **(Fig.7)**. A la fin de l'embryogénèse, les SPGs sont connectées entre elles par des jonctions serrées autocellulaires, appelées jonctions septates, dont un des composant majeur est la Gliotactine **(Auld et al., 1995; Tepass and Hartenstein, 1994)**. De manière intéressante, les jonctions septates glie-axone au niveau des axones myélinisés des vertébrés et les jonctions septates glie-glie des SPGs des invertébrés expriment les mêmes protéines membranaires telles que Caspr/NeurexinIV, Contactin et Neurofascin155/Neuroglian **(Banerjee et al., 2006; Baumgartner et al., 1996; Bellen et al., 1998)**. Ces observations suggèrent que les mécanismes d'isolation des axones ont été conservés au cours de l'évolution.

Figure 8 : Modèle du recyclage du glutamate par les cellules gliales

Schéma représentant une voie possible de recyclage du glutamate (Glu) par une cellule gliale associée à une synapse. Le glutamate pénètre dans la cellule gliale via un transporteur du glutamate (EAAT, bleu). Le glutamate est ensuite recyclé en glutamine (Gln) par la Glutamine Synthétase (GS, rouge) **(Parker and Auld, 2006)**.

Au niveau des synapses, la glie joue aussi un rôle majeur dans le recyclage des neurotransmetteurs. Deux membres de la famille des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs), qui régulent le niveau de glutamate extracellulaire, ont été mis en évidence chez les cellules gliales de la drosophile **(Besson et al., 1999; Seal et al., 1998)**. Les mouches mutantes pour le gène *EAAT1* ont des problèmes de régulation de la concentration extracellulaire en glutamate. Le haut niveau de glutamate extracellulaire est neurotoxique et déclenche une hypersensibilité au stress oxydant. En conséquence, les drosophiles montrent une dégénération du neuropile, des problèmes de vol et leur espérance de vie diminue **(Rival et al., 2004)**. La glie exprime aussi la Glutamine Synthétase (GS), un composant essentiel de la voie de recyclage du glutamate **(Freeman et al., 2003)**. Comme les cellules gliales de la drosophile, les astrocytes des vertébrés expriment la GS et des transporteurs de type EAAT **(Danbolt, 2001)** et recyclent probablement le glutamate par le même mécanisme que la glie de la drosophile **(Fig. 8)**.

II.C.2.b. Rôle dans la connectivité neurale

De nombreuses évidences soulignent l'importance des cellules gliales dans le guidage des axones. L'ablation des cellules gliales périphériques perturbe les axones sensoriels quand ils approchent du CNS et les axones moteurs quand ils quittent le CNS **(Sepp and Auld, 2003; Sepp et al., 2000)**. L'ablation des LGs affecte la formation des fuseaux d'axones longitudinaux et les étapes de fasciculation et de défasciculation **(Hidalgo and Booth, 2000)**. L'ablation des cellules gliales de la ligne médiane empêche les axones de croiser la ligne médiane au niveau des jonctions antérieures et postérieures **(Jacobs, 2000)**. Enfin, la glie peut aussi contrôler la spécificité de la cible des axones. Par exemple, la formation de connexions spécifiques entre les axones de la rétine et leur cible dans le cerveau requièrent la glie des lobes optiques **(Poeck et al., 2001)**. Toutes ces données montrent que la glie est absolument nécessaire à l'élaboration d'un réseau fonctionnel de connexions nerveuses.

Figure 9 : Le guidage des axones dépend de molécules sécrétées et de leurs récepteurs

A) Le neuropile d'un embryon sauvage est constitué de deux fuseaux d'axones longitudinaux (flèche) reliés par deux points de jonction à chaque segment (tête de flèche). B,C) La perte de fonction du gène *slit* (*slit* LOF) conduit à une fusion de tous les axones du neuropile tandis que la perte de fonction du gène *robo-1* (*robo* LOF) conduit à une augmentation du nombre d'axones qui croisent la ligne médiane. La ligne médiane est indiquée en pointillé. Barre d'échelle : 40 µm.

Plusieurs mécanismes permettent aux cellules gliales de guider les axones. Des cellules gliales, localisées à des positions clés, peuvent sécréter des combinaisons de signaux attractifs ou répulsifs dans l'environnement **(Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)**. Par exemple, les cellules gliales de la ligne médiane sécrètent dans l'environnement la molécule chémorépulsive Slit. La perte de fonction du gène *slit* (*slit* LOF) conduit à la fusion de tous les axones du neuropile (**Fig. 9C**) **(Rothberg et al., 1990)**. Les cônes de croissance, à l'extrémité des axones en expansion, expriment à leur surface des récepteurs qui perçoivent ces signaux **(Dickson, 2002)**. L'interaction entre une molécule de guidage et son récepteur dédié déclenche une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à un réarrangement du cytosquelette. Ainsi, les axones qui ne croisent jamais la ligne médiane expriment le récepteur de Slit, Roundabout (Robo), à un haut niveau tandis que les axones destinés à croiser la ligne médiane l'expriment à un niveau plus faible **(Kidd et al., 1998a; Kidd et al., 1998b)**. La perte de fonction du gène *robo-1* (*robo-1* LOF) conduit à une augmentation du nombre d'axones qui croisent la ligne médiane (**Fig. 9B**). En réalité, un cône de croissance possède de nombreux récepteurs sur sa surface, permettant de répondre simultanément à de multiples signaux de guidage.

Durant le développement, les axones, les dendrites et les synapses sont souvent produits en excès, ce qui nécessite un remodelage pour l'établissement et le maintien d'un circuit fonctionnel. Ce remodelage inclut l'élimination du matériel en excès et leurs débris. Plusieurs études ont démontré le rôle crucial de la glie pour sculpter les circuits neuronaux. Pendant la croissance larvaire, la taille des muscles est multipliée par 100. En réponse à cette croissance, les synapses périphériques au niveau des jonctions neuromusculaires sont remodelées en permanence dans un processus qui implique les cellules gliales **(Chung and Barres, 2009; Fuentes-Medel et al., 2009)**. Durant la métamorphose, les circuits neuronaux larvaires doivent être profondément réarrangés pour former le système nerveux adulte. Durant ce processus, les cellules gliales associées au neuropile montrent alors une activité macrophagique intense **(Cantera and Technau, 1996)**.

Figure 10 : Remodelage des axones des corps pédonculés durant la métamorphose

Peu après la formation de la pupe (APF), l'ecdysone induit une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la fragmentation des axones et des dendrites et l'augmentation locale du nombre de cellules gliales. Par la suite, les débris neuronaux sont nettoyés par la glie avant l'élongation des nouveaux axones qui formeront les connexions de l'adulte. **(Hakim et al., 2014)**

Les mécanismes gouvernant le remodelage des axones durant la métamorphose ont été particulièrement étudiés au niveau des neurones γ des corps pédonculés, responsables de la mémoire et de l'apprentissage **(Fig. 10) (Awasaki and Ito, 2004; Awasaki et al., 2006; Boulanger and Dura, 2014; Hakim et al., 2014; Hoopfer et al., 2006; Lee et al., 2000; Watts et al., 2004)**. La stimulation part l'ecdysone, l'hormone stéroïdienne qui contrôle la métamorphose **(Buszczak and Segraves, 1998)**, conduit à la fragmentation des axones et des dendrites **(Boulanger et al., 2012)**. Les débris sont phagocytés par les cellules gliales dont le nombre augmente localement. Après le nettoyage, les axones des neurones γ peuvent croître de nouveau pour former les connexions adultes. En conclusion, les cellules gliales participent au réarrangement des connexions neuronales en agissant comme des macrophages résidents.

II.C.2.c. Rôle dans l'homéostasie du système nerveux

Durant le développement, les neurones et les cellules gliales doivent être produits en nombre approprié pour établir un système nerveux fonctionnel. L'ajustement du nombre de cellules est en partie contrôlé par un mécanisme non-autonome, ainsi, les neurones reçoivent un support trophique des cellules gliales vice-versa **(Barres and Raff, 1994; Davies, 1998; Hidalgo et al., 2011)**. Selon la théorie neurotrophique, les neurones sont produits en large excès et meurent s'ils ne reçoivent pas un support trophique **(Levi-Montalcini, 1987)**. Chez les mammifères, de nombreux facteurs neurotrophiques ont été identifiés tel que GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) et CDNF/MANF (conserved dopamine neurotrophic factor/mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) **(Allen et al., 2013; Lindstrom et al., 2013)**. Ces facteurs sont souvent considérés comme des agents potentiels pour traiter les maladies neurodégénératives. Ils contribuent également à la plasticité du système nerveux nécessaire à l'apprentissage et à la mémoire.

De nombreuses évidences suggèrent la présence de facteurs neurotrophiques chez la drosophile. Ainsi, une augmentation de la mort cellulaire neuronale est observée chez les animaux mutants pour des gènes codant des facteurs essentiels au développement de la glie comme *reverse polarity* (*repo*), *disconnected* (*disco*) ou *sine oculis* (*so*) **(Booth et al., 2000; Campos et al., 1992; Xiong and Montell, 1995)**. De plus, un homologue du récepteur du facteur

Figure 11 : Nettoyage de CNS par les CBGs

Les membranes des cellules gliales (vert) sont marquées avec la GFP (green fluorescent protein). A) Les membranes des CBGs entourent les corps apoptotiques (rouge). B) Le marquage des lysosomes par un LysoTracker permet aussi de détecter des phagosomes matures dans les CBGs. Barre d'échelle : 40 µm. **(Kurant et al., 2008)**

Figure 12 : Rôle de la glie dans la régénération du CNS

A) Le CNS larvaire est disséqué, blessé avec une aiguille en tungstène et mis en culture. B) Visualisation des neurones (vert) et des cellules gliales (violet) à différents temps après la blessure. Les trous GFP négatifs sont colonisés par les cellules gliales (tête de flèche) puis disparaissent. Barre d'échelle : 40 mm. **(Kato et al., 2011; Kato and Hidalgo, 2013)**

GDNF, Ret, est exprimé dans le système nerveux et peut induire la croissance des neurites (**Abrescia et al., 2005**).

Les cellules gliales peuvent aussi contrôler la prolifération des précurseurs neuronaux. En effet, la surexpression d'un allèle dominant négatif de la protéine DE-cadherine dans les cellules gliales réduit la prolifération des NPs (**Dumstrei et al., 2003**). A la fin du développement embryonnaire, la plupart des cellules souches neurales (NSCs) entrent en phase de quiescence (**Ito and Hotta, 1992; Prokop and Technau, 1991; Truman and Bate, 1988**). Ces cellules sont réactivées et reprennent leurs cycles de division aux stades larvaires en réponse à une voie de signalisation dépendante de la nutrition (**Britton and Edgar, 1998; Sousa-Nunes et al., 2011**). Un stimulus nutritionnel active la synthèse d'un peptide de type IGF (insuline/insulin-like growth factor) dans une sous population de glie associée à la surface. En réponse, les NSCs qui expriment les récepteurs à IGF sortent de la phase de quiescence et commencent à proliférer (**Chell and Brand, 2010; Lanet et al., 2013**). Les cellules gliales contrôlent donc la prolifération et la survie des neurones.

Après la formation de la BBB, les macrophages circulants dans l'hémolymphe sont exclus du CNS. Le nettoyage de ce territoire dépend donc des cellules gliales qui jouent le rôle de macrophage résident. Durant le développement, les neurones sont produits en large excès et subissent trois vagues de mort cellulaire programmée : à la fin de l'embryogénèse, durant la métamorphose et à l'émergence de la mouche adulte (**Abrams et al., 1993; Robinow et al., 1988**). La mort programmée des neurones semble d'abord en mesure de stimuler la prolifération de la glie (**Kato et al., 2009**). Ensuite, les cellules gliales disposent d'une activité macrophagique pour nettoyer les corps apoptotiques par phagocytose. Une telle activité est observée dans toutes les cellules gliales latérales durant la métamorphose (**Cantera and Technau, 1996**) alors que, chez l'embryon, seules les CBGs possèdent une activité macrophagique (**Fig. 11**) (**Kurant, 2011; Kurant et al., 2008**). La glie répond aussi aux agressions extérieures. Lorsqu'une blessure survient dans le CNS de l'adulte ou de la larve, les cellules gliales associées axones prolifèrent, phagocytent les corps apoptotiques et stimulent la régénération du neuropile (**Fig. 12**) (**Doherty et al., 2009; Kato et al., 2011; Kato and Hidalgo, 2013**). La glie constitue donc vraisemblablement la première barrière de défense du CNS.

Figure 13 : Bases moléculaires de la phagocytose gliale

Schéma représentant les différentes étapes de la phagocytose de différents débris dans le CNS : reconnaissance, internalisation, maturation du phagosome et dégradation du matériel. L'étape initiale semble impliquer différents signaux selon le type de débris. L'activité de la Caspase 3 ainsi que la reconnaissance entre le récepteur Six microns under (SIMU) et la phosphatidylsérine (PS) semblent spécifiquement impliqués dans la dégradation des corps apoptotiques. En revanche, les étapes suivantes semblent partager le même mécanisme impliquant le récepteur Draper et la protéine adaptatrice dCED-6 (**Kurant, 2011**).

Ces processus de défense ne semblent pas conservés chez les cellules gliales des vertébrés puisque la fonction immunitaire dans leur CNS est principalement effectuée par une population indépendante de cellules, la microglie **(Kim and de Vellis, 2005; Simard et al., 2006; Stoll and Jander, 1999)**. Contrairement à ce que son nom indique, les cellules microgliales ont une origine hématopoïétique et migrent dans le CNS durant le développement. Comme la glie chez drosophile, la microglie joue un double rôle dans le CNS des vertébrés. En plus de soutenir le développement et les fonctions neurales, la microglie répond aux blessures, phagocyte les cellules mortes et module la réponse inflammatoire. Cependant, dans certaines circonstances, les astrocytes peuvent supporter la microglie et possèdent aussi la capacité à phagocyter **(Bechmann and Nitsch, 1997; Farina et al., 2007; Pekny and Nilsson, 2005)**.

II.C.2.d. Mécanismes de la phagocytose gliale

Il apparaît de plus en plus que les cellules gliales sont extrêmement dynamiques agissant comme des macrophages capables de migrer, remodeler les connexions neuronales et nettoyer les débris. Elles nettoient le matériel non désiré par phagocytose, un processus qui se décompose en plusieurs étapes : reconnaissance de la cible, internalisation, maturation du phagosome et dégradation du matériel.

Le mécanisme de reconnaissance des corps apoptotiques a été précisément caractérisé dans la VNC (**Fig. 13**). Les neurones en apoptose sont caractérisés par une Caspase3 (Casp3) activée et exposent à leur surface un phospholipide, la phosphatidyl-serine (PS) **(van den Eijnde et al., 1998)**. La PS agit comme un ligand pour le récepteur SIMU (Six Microns Under) qui est exprimé à la surface des CBGs **(Shklyar et al., 2013)**. Dans les embryons mutants pour le gène *simu*, de nombreux corps apoptotiques s'accumulent dans la VNC. Bien que l'activité de Casp3/SIMU soit requise pour la reconnaissance des corps apoptotiques, elle n'intervient pas dans les mécanismes de remodelage des axones.

Le récepteur Draper et la protéine adaptatrice dCED-6 sont requis pour l'internalisation et la maturation du phagosome, et ce, dans toutes les situations où la glie phagocyte **(Awasaki et al., 2006; Freeman et al., 2003; Fuentes-Medel et al., 2009; Logan and Freeman, 2007; MacDonald et al., 2006)**. En plus d'être conservée du nématode à la souris, la voie de phagocytose Draper/dCED-6 est partagée entre les hémocytes et les cellules gliales. Ces

observations suggèrent l'existence d'un mécanisme moléculaire commun, apparu très tôt au cours de l'évolution, pour effectuer la phagocytose. A la différence des embryons mutants pour le gène *simu,* la perte de fonction du gène *draper* conduit à une accumulation des corps apoptotiques à l'intérieur des phagocytes **(Kurant et al., 2008)**. Suivant une blessure, l'expression de Draper augmente dans la glie à travers un mécanisme impliquant la voie JNK/AP-1 (c-Jun N-terminal Kinase/Activator Protein 1) **(Macdonald et al., 2013)**.

SIMU et Draper appartiennent tous les deux à la famille des protéines Nimrod (NIM). Elles sont caractérisées par le domaine NIM, un variant du domaine EGF-repeat (Epidermal Growth Factor-repeat) **(Kurucz et al., 2007a; Somogyi et al., 2008; Zsámboki et al., 2013)**. SIMU et Draper possèdent également un domaine EMILIN (EMI) à l'extrémité N-terminale **(Doliana et al., 2001)**. Draper contient en plus un long domaine intracytoplasmique avec un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) dont la phosphorylation par la Src kinase Src42A permet de recruter des facteurs agissant en aval **(Ziegenfuss et al., 2008)**. D'autres récepteurs de la famille NIM, tel que NimC1 et Eater, sont exprimés dans les hémocytes pour permettre la reconnaissance des bactéries, cependant, ils ne sont pas détectés dans les cellules gliales **(Erturk-Hasdemir and Silverman, 2005; Kocks et al., 2005; Kurucz et al., 2007a; Somogyi et al., 2008)**.

Figure 14 : Le processus d'inhibition latérale

Des informations positionnelles dans la région neurogénique conduisent à l'expression des gènes proneuraux dans un cluster de cellule, le cluster proneural (orange). Chaque cellule de ce cluster a la capacité de former un précurseur neural. Le processus d'inhibition latéral par la voie de signalisation Notch/Delta conduit à la sélection d'un seul NPqui délamine.

III. BASES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA GLIOGENESE

III.A. Les précurseurs neuraux

III.A.1. Origine

Dans l'épithélium neurogénique ventral, la neurogénèse est initialement contrôlée par les gènes proneuraux. Ils sont nécessaires et suffisants pour induire la neurogénèse **(Bertrand et al., 2002)**. Ces gènes sont conservés au cours de l'évolution et codent pour des facteurs de transcriptions de type hélice-boucle-hélice basique (bHLH). Chez la drosophile, il ya trois facteurs proneuraux appartenant au complexe Achaete-Scute : Achaete, Scute, Lethal of scute **(Cabrera et al., 1987; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1988; Gonzalez et al., 1989; Martin-Bermudo et al., 1991)**. L'expression des gènes proneuraux est contrôlée par des informations positionnelles le long de l'axe A/P et D/V **(Skeath and Carroll, 1994)**. Elle permet de définir des clusters de cellules compétentes pour devenir des précurseurs neuraux, les clusters proneuraux **(Romani et al., 1987; Simpson and Carteret, 1990; Skeath and Carroll, 1994)**. Le quatrième membre du complexe Achaete-Scute, Asence (Ase), n'est pas exprimé dans le cluster proneural chez l'embryon, son expression étant initiée dans la NSC **(Brand et al., 1993)**.

Dans l'épithélium neurogenic du tronc, toutes les cellules d'un cluster proneural expriment initialement les gènes proneuraux au même niveau, cependant, une seule va se différencier en un NP et délaminer **(Fig. 14) (Cabrera, 1990; Cubas et al., 1991; Urbach et al., 2003)**. L'équilibre entre les cellules du cluster proneural est rompu par le mécanisme d'inhibition latérale impliquant la voie de signalisation Notch/Delta **(Heitzler and Simpson, 1991)**. Dans toutes les cellules du cluster, Achaete-Scute active l'expression du gène *delta* **(Kunisch et al., 1994)**. A un moment donné, une cellule du cluster va exprimer le ligand Delta à un niveau plus élevé que les autres. La fixation de Delta sur le récepteur Notch d'une cellule adjacente va induire le clivage de Notch et la translocation dans le noyau de son domaine intracellulaire $Notch^{intra}$. $Notch^{intra}$ agit alors comme un cofacteur pour le facteur de transcription Supressor of Hairless (Su(H)) pour réguler positivement la transcription du gène *Enhancer-of-split* (*E(spl)*) **(Bailey and Posakony, 1995; Heitzler et al., 1996)**. En retour, E(spl) régule négativement l'expression des facteurs proneuraux

Figure 15 : Les cellules souches neurales dans le CNS embryonnaire

Deux types de neuroglioblaste (NGB) délaminent de l'épithélium neurogénique. Les NGBs de type 1 se divisent une fois asymétriquement pour produire un neuroblaste (NB) et un glioblaste (GB) qui ensuite prolifèrent pour produire respectivement des neurones et de la glie. Dans les NGBs de type2, les premières divisions conduisent à la production d'un autre NGB et d'une cellule mère des ganglions (GMC) qui produit uniquement des neurones. Après plusieurs divisions, des GMCs mixtes, produisant un neurone et une cellule gliale, sont générés.

(Nakao and Campos-Ortega, 1996). L'inhibition latérale est donc une boucle de rétrocontrôle négatif qui va conduire à l'augmentation et la maintenance de l'expression d'Achaete-Scute et de Delta dans une seule cellule du cluster, le précurseur neural. Les autres cellules se différencient alors en cellules épidermiques **(Nakao and Campos-Ortega, 1996)**.

III.A.2. Mode de division des progéniteurs neuraux

Les précurseurs neuraux (NPs) sont classés en deux grandes catégories en fonction de leur mode de division et des marqueurs moléculaires qu'ils expriment. La pluspart d'entre eux appartiennent au Type I et expriment les facteurs de transcription Ase, Deadpan (Dpn) et Prospero (Pros) **(Bier et al., 1992; Choksi et al., 2006; Gonzalez et al., 1989)**. Lors de chaque division, les NPs de Type I génèrent un autre gros NP et une cellule mère des ganglions (GMC) plus petite. Ensuite, la GMC ne se divise qu'une seule fois pour produire deux cellules post-mitotiques. Observés uniquement dans le cerveau larvaire, les NPs de Type II sont beaucoup moins abondants que les NPs de Type I. Les NPs de Type II expriment Dpn mais n'expriment pas Ase et Pros. Après chaque division, ces NPs produisent un autre NP et un progéniteur neural intermédiaire (INP). Plus gros que le GMC, l'INP peut encore accomplir entre quatre et huit divisions **(Bello et al., 2008; Boone and Doe, 2008; Bowman et al., 2008)**.

III.A.3. Les différentes classes de précurseurs neuraux

Les NPs sont ensuite classés en trois catégories selon leur progéniture. Les neuroblastes purs (NBs) produisent seulement des neurones, les glioblastes pures (GBs) produisant seulement de la glie et les neuroglioblastes mixtes (NGBs) produisent des neurones et de la glie **(Bossing et al., 1996; Broadus et al., 1995; Doe, 1992; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997)**. Deux types de NGB existent dans le CNS embryonnaire **(Fig. 15)**. Les NGBs de type 1 produisent de la glie juste après leur délamination en se divisant asymétriquement pour produire un NB et un GB

Figure 16 : Carte des NPs dans la VNC embryonnaire

Carte des NPs dans les segments thoraciques et abdominaux **(Van De Bor and Giangrande, 2002)**. Les neuroblastes (vert), les glioblastes (blanc) et les neuroglioblastes (rouge) sont cartographiés en fonction de leur vague de délamination (S1 à S5) et leur position en fonction des axes A/P (premier chiffre) et D/V (second chiffre). LGB : glioblaste longitudinal. MNB : neuroblaste médian. La ligne verticale indique la ligne médiane. Antérieur est en haut.

qui ensuite prolifèrent pour produire respectivement des neurones et de la glie **(Bernardoni et al., 1999)**. Les NGBs de type 2 délaminent et se divisent asymétriquement pour produire un autre NGB et une GMC qui produit deux neurones. Après plusieurs divisions, des GMCs mixtes sont générés qui produisent un neurone et une cellule gliale qui ne se divisent plus **(Ragone et al., 2001; Udolph et al., 2001)**. Les NSCs peuvent donc se diviser asymétriquement pour se renouveler et pour générer des précurseurs intermédiaires qui se différencient en neurones ou en cellules gliales. Ainsi, les NGBs de type 2 génèrent initialement des neurones et produisent de la glie seulement plus tard, ressemblant aux NSCs du cortex cérébral des mammifères.

A l'image des NGBs de type 2, la compétence d'un NP à produire des neurones ou de la glie peut varier en fonction du temps. Ce mécanisme est en parti régulé par l'expression séquentielle de facteurs de transcription selon l'axe temporel : Hunchback, Kruppel, Pdm1/Pdm2 et Castor **(Grosskortenhaus et al., 2006; Kanai et al., 2005; Pearson and Doe, 2003)**. A la fin de l'embryogénèse, certains NPs arrêtent de se diviser et entrent en phase de quiescence tandis que les autres sont éliminés par apoptose **(Datta, 1995; Prokop and Technau, 1991; Truman and Bate, 1988; White et al., 1994)**. Ces derniers reprennent leurs cycles de division aux stades larvaires.

III.A.4. Cartographie

Chaque NP a une identité propre selon sa position au sein de l'épithélium neurogénique, du moment de sa délamination et de la combinaison unique de gènes exprimés. Les NPs produisent des neurones et des cellules gliales de manière stéréotypée et plusieurs groupes ont établi une carte précise des lignages dans la VNC embryonnaire **(Fig. 16) (Bossing et al., 1996; Ito et al., 1995; Schmidt et al., 1997; Van De Bor and Giangrande, 2002)**

Après cinq vagues de délamination (S1-S5) successives depuis l'épithélium neurogénique, 30 lignages de NPssont produits de manière invariable dans chaque hémisegment **(Campos-Ortega, 1993, 1995; Doe, 1992)**. Ils sont d'abord classifiés selon leur appartenance à un segment thoracique (T) ou abdominal (A). Ensuite, ils sont identifiés par leur position sur les axes A/P et D/V. Ainsi, le précurseurs 6-4 est en 6ième position sur l'axe A/P et en 4ième position sur l'axe D/V **(Fig. 16)**. Seuls deux précurseurs sont des GBs purs : le GB6-4A et le glioblaste longitudinal. La plupart des cellules gliales proviennent donc de NGBs mixtes capables de

Figure 17 : Division asymétrique d'un NGB de type 2

A) Durant la métaphase, la protéine Inscuteable (Insc) est localisée au pôle apical de la cellule formant un croissant apical. A-C) A l'opposé, Miranda (Mira), Prospero (Pros) et Numb sont localisés au pôle basal de la cellule formant un croissant basal. Barre d'échelle : 10 µm**. (Slack et al., 2007)**

Figure 18 : Division asymétrique d'un NGB de type 1

Profil de division du NGB6-4T. Le NGB6-4T en division est spécifiquement détecté avec le marqueur de lignage Eagle. L'ARNm de *gcm* est asymétriquement distribué dans le NGB en division. Une fois que le NGB se sera divisé, une des cellules filles, le GB, aura accumulé plus d'ARNm de *gcm* que l'autre, le NB. Barre d'échelle : 3.2 mm. **(Bernardoni et al., 1999)**

produire des neurones et de la glie. De manière intéressante, certains lignages ont des progénitures différentes selon leur appartenance à un segment thoracique ou à un segment abdominal. Ainsi, le précurseur 1-1A est un NGB mixte tandis que le précurseur 1-1T est un pur NB produisant uniquement des neurones. De la même manière, le précurseur 6-4A est un pur GB produisant uniquement de la glie tandis que le précurseur 6-4T est un NGB mixte.

III.A.5.La division asymétrique

Un des processus majeur permettant de générer la diversité cellulaire est la division asymétrique. Les mécanismes gouvernants la division asymétrique des NPs ont été particulièrement étudiés au niveau sur les NPs de Type I. Juste après sa délamination, le NP est déjà polarisé selon un axe apico/basal (A/B). Le complexe Partition-Defective (Par), constitué de Bazooka, Par6 et Atypical Protein Kinase C (aPKC), recrute au pôle apical de la cellule Inscuteable (Insc), Partner of Inscuteable (Pins) et la sous-unité de la protéine G Gαi pour former un croissant apical (**Fig. 17**) à la fin de l'interphase et au début de la prophase **(Kraut and Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996; Parmentier et al., 2000; Petronczki and Knoblich, 2001; Schaefer et al., 2000; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 2000**). Le complexe du croissant apical est responsable de l'orientation A/B des fuseaux mitotiques et le positionnement dans un croissant basal (**Fig. 17**) des déterminants du destin cellulaire Prospero (Pros), Brat et Numb ainsi que leurs protéines d'ancrage Miranda (Mira), Staufen (Stau) et Partner of Numb (Pon) **(Betschinger et al., 2006; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Lee et al., 2006; Matsuzaki et al., 1998; Schuldt et al., 1998; Shen et al., 1998; Slack et al., 2007**). Durant l'anaphase, le GMC bourgeonne basalement et Mira, Numb et Pros sont spécifiquement ségrégués à l'intérieur. Après la division, le facteur à homéodomaine Pros se relocalise dans le noyau du GMC où il agit comme un interrupteur moléculaire entre le renouvellement et la différenciation de la cellule **(Choksi et al., 2006; Fuerstenberg et al., 1998; Li and Vaessin, 2000**). En absence de Pros, les NPs montrent une prolifération accrue et échouent à se différencier. Pros réprime les marqueurs des NSCs, en particulier ceux impliqués dans la prolifération cellulaire, et active les marqueurs des GMCs **(Bello et al., 2008**). La division asymétrique joue donc un rôle clé dans l'homéostasie des NCSs et des défauts dans ce mécanisme peuvent conduire à une croissance tumorale non contrôlée **(Castellanos et al., 2008; Caussinus and Gonzalez, 2005; Reichert, 2011**).

Figure 19 : Gcm, un interrupteur moléculaire entre neurones et glie

Dans les embryons sauvages, la plupart des cellules gliales proviennent de NSCs bipotentes capables de produire des neurones et de la glie. Dans les embryons mutants pour *gcm* (perte de fonction de *gcm* = *gcm* LOF), aucune cellule gliale n'est produite. Au contraire, l'expression ectopique de Gcm dans la région neurogénique (gain de fonction de *gcm* = *gcm* GOF) conduit à la production de glie ectopique au dépend des neurones. Barre d'échelle : 10 µm **(Alfonso and Jones, 2002)**

Les recherches effectuées sur la division asymétrique du ont permis de mieux comprendre comment des neurones ou de la glie peuvent être générés à partir d'un précurseur commun **(Fig. 18) (Akiyama-Oda et al., 1999; Bernardoni et al., 1999; Ragone et al., 2001)**. Ce mécanisme implique le déterminant glial Glial cell deficient/Glial cell missing (Glide/Gcm). L'ARNm de *gcm* est distribué asymétriquement dans le NGB en division (**Fig. 18**) et colocalise avec Pros durant la métaphase. La cellule fille qui hérite de la plus grande quantité de l'ARNm de *gcm* deviendra un GB tandis que l'autre, recevant une quantité plus faible, deviendra un NB. Les dernières données montrent un rôle de Pros **(Akiyama-Oda et al., 2000; Freeman and Doe, 2001; Miller et al., 1998; Ragone et al., 2001)** et de la CyclineE (CycE) **(Berger et al., 2005a, b)** pour le maintient du transcrit de *gcm*. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un couplage entre la division cellulaire et la détermination de l'identité de la progéniture.

III.B. Glide/Gcm et la gliogénèse

III.B.1. Le déterminant glial

La détermination du destin cellulaire est souvent contrôlée au niveau transcriptionnel par des facteurs clés. Toutes les cellules gliales latérales requièrent l'expression transitoire du facteur de transcription Glide/Gcm (appelé Gcm à travers le publication pour une question de simplicité) pour se différencier, et ce, indépendamment du type de précurseur **(Akiyama et al., 1996; Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Soustelle and Giangrande, 2007a; Vincent et al., 1996)**. Au contraire, la différenciation des cellules gliales de la ligne médiane nécessite le facteur de transcription bHLH Single-Minded **(Sonnenfeld and Jacobs, 1994)**.

Dans les embryons mutants pour *gcm* (perte de fonction de *gcm* = *gcm* LOF), les cellules qui se développent normalement en cellules gliales entrent dans la voie de différenciation neuronale ce qui conduit à une perte de la glie et une augmentation du nombre de neurones. Réciproquement, l'expression ectopique de *gcm* dirigée dans le territoire neurogénique conduit à une augmentation du nombre de cellules gliales au dépend des neurones (**Fig. 19**) **(Bernardoni et al., 1998; Hosoya et al., 1995; Miller et al., 1998)**. Ainsi, *gcm* représente un régulateur transcriptionnel maître pour la différenciation de la glie et agit comme un interrupteur moléculaire entre le destin glial et le destin neuronal de la cellule.

La compétence de la protéine Gcm pour reprogrammer les NSCs en cellules gliales constitue un outil intéressant pour étudier la plasticité des cellules souches. Suivant l'expression ectopique de Gcm, il a récemment été démontré que la reprogrammation des NSCs est complète, déclenchant l'expression de marqueurs tardifs de la glie ainsi qu'une signature épigénétique spécifique **(Flici et al., 2011)**. Aussi, la reprogrammation des NPs ne requiert pas la division cellulaire mais dépend de l'âge de la cellule. Ils perdent progressivement leur plasticité avec l'âge et les cellules quiescentes ne sont plus aptes à être reprogrammées. Enfin, Gcm ne requiert pas un environnement neural pour produire de la glie puisque l'expression ectopique de Gcm dans l'ectoderme dorsal ou le mésoderme conduit à la production de glie ectopique dans ces territoires **(Akiyama-Oda et al., 1998; Bernardoni et al., 1998)**.

III.B.2. Régulation

L'expression de Gcm est initialement contrôlée par des informations spatiales et temporelles provenant des gènes homéotiques exprimés le long des axes A/P, D/V et temporel **(Sprecher and Hirth, 2006; Van De Bor and Giangrande, 2002)**. Par exemple, en absence du gène *ultrabithorax* (*ubx*), Gcm est absent du NGB1-1A qui ne produit plus que des neurones **(Prokop and Technau, 1994)**. En concordance, la surexpression d'*ubx* dans le NB1-1T, qui normalement ne produit que des neurones, conduit à sa conversion en un NGB mixte qui produit des neurones et de la glie. Plusieurs observations suggèrent que Ubx agit directement sur le promoteur de Gcm notamment la présence de plusieurs sites de fixation d'Ubx l'activation transcriptionnelle. De plus, Ubx agit directement sur le promoteur de Gcm pour activer la transcription *in vitro* **(De Iaco and Giangrande, données non publiées)**. Un autre exemple est fourni par les gènes *abdominal-A* (Abd-*A*) et *abdominal-B* (*Abd-B*) qui répriment l'expression de *cycE* dans les segments abdominaux **(Berger et al., 2005a, b)**. Puisque la CycE réprime l'accumulation du transcrit de *gcm*, Abd-A et Abd-B permettent l'accumulation plus importante de Gcm dans les segments abdominaux. En conséquence, le précurseurs 6-4A est un GB pur tandis que le précurseur 6-4T est un NGB mixte.

D'autres voies de signalisation sont aussi impliquées dans la régulation de *gcm*. Dans le système visuel, l'expression de *gcm* dépend des voies Hedgehog (Hh) et Decapentaplegic (Dpp) **(Yoshida et al., 2005)**. Enfin, dans le PNS, la voie Notch peut positivement ou négativement réguler l'expression de *gcm* selon le lignage **(Umesono et al., 2002; Van De Bor and Giangrande, 2001)**.

III.B.3. La cascade transcriptionnelle de la gliogénèse

III.B.3.a. Le mode d'action de Gcm

Gcm est un facteur transactivateur qui, pour initier la gliogénèse, est exprimé transitoirement dans les précurseurs neuraux. Cette observation indique que des gènes spécifiques de la glie doivent être activés pour consolider et maintenir le destin glial, promouvoir la différenciation tardive de la glie et réprimer le destin neuronal. Gcm agit donc à travers de ses cibles. Les cibles putatives de Gcm ont été identifiées par des cribles à l'échelle du génome. Les études de microarrays, basées sur l'analyse d'embryons avec gain ou perte de fonction pour *gcm*, ont mis en évidence des gènes dont l'expression est régulée par Gcm **(Altenhein et al., 2006; Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003)**. Cependant, ces méthodes n'ont pas nécessairement identifiées les cibles directes de Gcm mais des gènes agissant en aval le long de la cascade génétique permettant la gliogénèse. Parmi les cibles putatives de Gcm identifiées, une activation est observée pour les gènes exprimés dans la glie comme *draper*, *EAAT1* et *unc5*. Au contraire, une répression est observée pour les gènes connus pour promouvoir la neurogénèse comme *embryonic lethal abnormal vision (elav)* **(Robinow et al., 1988)**. Enfin, des gènes impliqués dans le remodelage et la modification de la chromatine ont été identifiés. Ils permettent l'établissement et le maintien de l'état transcriptionnel spécifique de la cellule gliale.

III.B.3.b. L'autorégulation

La première cible Gcm est *gcm* lui-même. En effet, Gcm est capable de se fixer directement sur plusieurs GBSs localisés dans son propre promoteur **(Jones et al., 2004; Miller et al., 1998; Ragone et al., 2003)**. La mutation de ces sites ne conduit pas à des défauts dans

Figure 20 : Etude de la régulation transcriptionnelle de *repo* dans le CNS de l'embryon

A) Carte génomique de *repo*. En amont du site d'initiation de la transcription (+1), le promoteur de *repo*, de 4.3 kb, contient 11 GBSs (ovales noirs). Des éléments *cis* conduisant l'expression dans les PGs, CBGs, et les LGs ont aussi été identifiés. Le promoteur, contenant les GBSs sauvages ou mutés (ΔGBSs), a été isolé pour générer des rapporteurs transcriptionnels de *repo*, *repo(4.3kb)-LcZ* et *repo(4.3kbΔGBSs)-LcZ.* B) Le promoteur sauvage récapitule le territoire d'expression complet de *repo* et la mutation des 11 GBSs abolit presque totalement l'expression de *repo*. Gcm active donc directement *repo* dans la glie. Barre d'échelle : 20 µm. **(Lee and Jones, 2005)**

l'expression initiale de Gcm mais son expression décline plus vite que dans les embryons sauvages. Gcm peut donc s'autoréguler pour amplifier et maintenir son expression au début de la gliogénèse. De manière surprenante, il a été démontré que la capacité de Gcm à s'autoréguler est restreinte à la région neurogénique, et donc, dépend de l'existence de cofacteur dans ce territoire. Un d'entre eux a été identifié spécifiquement dans le NGB1-1A **(De Iaco et al., 2006)**. Dans ce lignage, la protéine à homéodomaine Huckebein (Hkb) interagit directement avec Gcm pour réguler positivement son l'autorégulation. Ainsi, dans les embryons mutant pour *hkb*, seul des neurones sont produits dans le NGB1-1A.

III.B.3.c. Le gène homéotique repo

Parmi les cibles de Gcm, les gènes pan-gliaux, c'est-à-dire les gènes exprimés dans toutes les cellules gliales, sont les plus susceptibles de jouer un rôle clé dans la différenciation de la glie. Le gène pan-glial le plus connu est *repo*, aussi connu sous le nom de RK2 **(Campbell et al., 1994; Halter et al., 1995; Xiong et al., 1994)**. *repo* code pour un facteur de transcription transactivateur de 612 acides aminés. Il possède un homéodomaine de type Paired-like et, à l'instar des facteurs de cette famille, il reconnaît la séquence consensus CAATTA. *repo* joue un rôle clé dans l'établissement et le maintien de l'identité gliale et des mutations dans le locus de *repo* conduisent à de nombreux défauts au sein du système nerveux. Les embryons mutants pour le gène *repo* sont caractérisés par la perte des marqueurs tardifs de la glie et de graves défauts dans la prolifération et la survie des cellules gliales. La perte de Repo affecte aussi indirectement le développement des axones, la condensation de la VNC et induit la mort neuronale. Récemment, des cibles directes de Repo ont été identifiées par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans les cellules de drosophile Schneider 2 (S2) **(Kerr et al., 2014)**. De nombreux gènes impliqués dans la différenciation terminale de la glie ont été identifiés (*pointed (pnt), locomotion defect (loco)*) (**Fig. 21**) ainsi que des gènes participant à la maintenance de la BBB (*gliotactin*), au métabolisme des neurotransmetteurs (*EAAT1, GS2*) et à la phagocytose (*Ced-6*).

Figure 21 : La cascade transcriptionnelle de la gliogénèse

A) Schéma récapitulant la voie de la différenciation gliale. La transcription de *gcm* est déclenchée par une combinaison d'informations positionnelles et temporelles. Gcm initie la différenciation de la glie en activant simultanément des gènes impliqués dans la différenciation terminale de la glie (*repo, pnt*) et des gènes impliqués dans la répression du destin neuronal (*ttk*). La différenciation neuronale est bloquée par Ttk à travers la répression des gènes neuronaux *asense* (*ase*) et *deadpan* (*dpn*). *repo* peut aussi contribuer à la répression du destin neuronal en agissant en synergie avec *ttk*. B) Schéma récapitulant la cascade transcriptionnelle aboutissant l'activation et la maintenance de l'expression du gène *loco* **(Jones, 2005)**. C) Schéma représentant la relation entre Gcm et Repo durant la gliogénèse **(Flici et al., publication acceptée dans Nature Communications)**.

L'expression maintenue de Repo dans la glie suit l'expression transitoire de Gcm **(Akiyama et al., 1996; Johnson et al., 2012; Jones, 2005; Lee and Jones, 2005)**. La régulation transcriptionnelle de *repo* a été particulièrement bien étudiée **(Fig. 20)**. Ces travaux ont identifiés que : 1) les séquences promotrices de *repo*, de 4.3 kb, sont suffisantes pour récapituler l'expression de ce gène dans la glie **(Fig. 20)**; 2) l'expression de *repo* dépend directement des GBSs localisés dans ce promoteur; 3) des éléments *cis* spécifiques sont impliqués dans l'activation de *repo* dans certains sous-types de cellules gliales. Selon les dernières données produite au laboratoire **(Flici et al., publication acceptée dans Nature Communications)**, Repo semble directement impliqué dans l'autorégulation de Gcm durant les premiers stades de la gliogénèses. Repo consoliderait donc l'expression de Gcm et l'établissement du destin glial. Dans un second temps, lorsque le niveau d'expression de Repo dépasse un certain seuil, Repo semble requis pour la déstabilisation de Gcm et sa dégradation via le protéasome. Finalement, une fois que l'expression de Gcm s'affaiblit, l'expression de Repo est maintenue à travers un mécanisme d'autorégulation pour maintenir le destin glial et promouvoir la différenciation tardive de la glie. Repo jouerait donc un rôle charnière entre l'établissement et le maintien du destin glial et la différenciation tardive la glie.

III.B.3.c. Le gène tramtrack

Le transcrit du gène *tramtrack* (*ttk*) est épissé de manière à produire deux isoformes, *ttk69* et *ttk88*. Seul l'isoforme *ttk69* est induit par Gcm et exprimé dans le système nerveux. *ttk69 c*ode pour une protéine à doigt de Zinc de type BTB (Bric-à-brac Tramtrack Broad) **(Badenhorst, 2001; Giesen et al., 1997)**. De manière différente de Repo, Ttk69 est exprimé dans toutes les cellules gliales, incluant les cellules gliales de la ligne médiane, ainsi que dans d'autres territoires tels que les muscles ou l'épiderme. Ttk69 est un répresseur transcriptionnel des gènes de la différenciation neuronale tels que *ase* et *dpn* (**Fig. 21**). L'expression ectopique de Ttk 69 dans le système nerveux conduit à la répression de marqueurs neuronaux. De manière intéressante, Ttk et Repo peuvent agir en synergie pour réprimer le destin neuronal (**Fig. 21**) **(Yuasa et al., 2003)** ou pour promouvoir le destin glial **(Klambt and Goodman, 1991)** lorsqu'ils sont exprimés ectopiquement.

Figure 22 : Structure du transcrit *gcm*

La protéine Gcm contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine riche en proline, glutamate, sérine et thréonine (PEST), un domaine de signalisation nucléaire (NLS) et un domaine transactivateur (AD). N-ter et C-ter représentent respectivement l'extrémité N-terminale et C-terminale de la protéine. L'ARNm de *gcm* possède un notamment élément d'instabilité (IE) dans sa région non traduite en 3' (3'UTR).

Figure 23 : Structure cristallographique du DBD en interaction avec l'ADN

Modélisation du DBD avec le logiciel PyMOL. Le DBD en doigt de Zinc est composé de deux feuillets β (violet), a six et trois brins, trois hélices α (bleu) et deux ions Zinc (jaune). Il interagit avec le grand sillon de l'ADN par l'un de ses feuillets β.

III.B.3.d. Les gènes loco et pointed

pnt code pour deux isoformes, PntP1 et PntP2. Les deux isoformes partagent la même extrémité C-ter où est situé un DBD de type ETS (Erythroblast Transformation Specific) **(Klaes et al., 1994; Klambt, 1993)**. En revanche, PntP1 et PntP2 diffèrent dans leur extrémité N-ter et leur territoire d'expression. Seul PntP1 est activé par Gcm dans les LGs où il est requis pour la différenciation tardive. PntP2 est exprimé dans les cellules gliales de la ligne médiane. Dans les embryons mutants pour *pnt*, les LGs ne sont plus capables de s'étendre pour recouvrir le neuropile ce qui provoque des défauts de conduction.

Le gène *loco* code pour deux variants, LocoC1 et LocoC2, qui partagent trois exons. Les deux isoformes contiennent un domaine RGS (Regulators of G-protein Signalling). Seul LocoC1 est exprimé dans les cellules gliales latérales **(Granderath et al., 2000; Granderath et al., 1999)**. Les études menées sur la régulation de *loco* ont montré que l'expression de ce gène est initialement activée par Gcm puis, dans un second temps, renforcée par la coopération de Gcm et de PntP1 (**Fig. 21**). Dans les embryons mutants pour *loco*, la BBB est détruite à cause d'une disruption des interactions glie-glie.

III.B.4. Structure de la protéine Gcm

Gcm est un facteur de transcription transactivateur de 504 acides aminés. Il contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un signal de localisation nucléaire, un domaine transactivateur et un domaine PEST, riche en proline, glutamate sérine et thréonine **(Fig. 22)**. Le domaine PEST est généralement associé à des protéines de demi-vie courte car il favorise leur dégradation **(Hosoya et al., 1995; Mao et al., 2012; Schreiber et al., 1997)**. L'ARNm de *gcm* possède aussi un élément d'instabilité riche en A et U dans sa région non traduite en 3' **(Fig. 22)**. Le DBD est appelé domaine Gcm car il ne partage pas les mêmes propriétés des autres domaines en doigt de Zinc **(Fig. 23) (Akiyama et al., 1996; Cohen et al., 2003; Schreiber et al., 1998; Schreiber et al., 1997)**. D'une taille de 150 résidus, le DBD est constitué de deux feuillets β, à six et trois brins, trois hélices α et deux ions Zinc. Sa structure unique permet à son feuillet β d'interagir avec le grand sillon de l'ADN. Enfin, le DBD reconnaît une séquence consensus particulière sur l'ADN, 5'-(A/G)CCCGCAT-3', le site de fixation de Gcm (GBS).

Figure 24 : Le locus de *gcm*

gcm (rose) est localisé sur le bras gauche du chromosome 2 à la position 30B (Flybase genome browser). L'échelle indique la position par rapport au centromère. Dans le même locus, *gcm* contient un homologue, *gcm2*, transcrit en sens inverse. Entre *gcm* et *gcm2* se trouvent deux gènes, *CG3841* et *CG4382*, eux-mêmes homologues et transcrits en sens inverse. Un axe de symétrie peut donc être tracé entre ces deux gènes.

Figure 25 : Structure des protéines de type Gcm

Structure des facteurs de type Gcm identifiés dans plusieurs organismes. d : drosophile; m : souris; c : poulet; xe : xénope; Sp : oursin de mer. Le nombre à droite représente le nombre de résidus d'acides aminés dans chaque protéine. Les différentes couleurs correspondent à différents domaines fonctionnels. DBD : domaine de liaison à l'ADN; TA : domaine transactivateur; NLS : domaine de localisation nucléaire; NES : signal d'export nucléaire; PEST : domaine riche en prolines, glutamines, sérines et thréonines; ID : Domaine d'inhibition. Pour éviter la superposition de deux domaines, l'un des deux est représenté à mi-hauteur. **(Hashemolhosseini and Wegner, 2004)**

III.B.5. La famille des facteurs de transcription de type Gcm

Les propriétés structurales et fonctionnelles uniques du DBD de Gcm définissent une nouvelle famille de protéines appelée la famille Gcm **(Akiyama et al., 1996; Cohen et al., 2003)**. Un seul homologue, *gcm2*, est retrouvé chez la drosophile **(Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001)**. Bien que *gcm2* soit exprimé à un niveau plus faible que *gcm*, *gcm* et *gcm2* ont un profil d'expression semblable durant l'embryogénèse et leurs fonctions sont redondantes. *gcm2* ne semble pas jouer un rôle critique durant le développement car les animaux mutants pour *gcm2* sont viables jusqu'à l'âge adulte et ne présentent pas de défauts majeurs dans la glie. Le DBD de Gcm2 possède 69 % d'homologie avec celui de Gcm1 et *gcm2* appartient au même locus que *gcm1*, les deux gènes étant transcrits en sens inverse. De manière intéressante, entre les gènes *gcm* et *gcm2* se trouvent deux gènes, CG3841 et CG4382, qui possèdent 37 % d'homologie et qui sont eux-aussi transcrits en sens inverse. *gcm* et *gcm2* sont donc vraisemblablement issus d'une duplication **(Fig. 24)**.

Les facteurs de transcriptions Gcm et Gcm2 partagent des orthologues avec d'autres organismes **(Hanaoka et al., 2004; Hashemolhosseini et al., 2004; Mao et al., 2012; Ransick et al., 2002) (Fig. 25)**. Chez les mammifères, GCM1 est exprimé dans les cellules trophoblastiques puis au niveau du labyrinthe qui dérive du trophoblaste. Une déficience de ce gène provoque des défauts d'implantation et la mort de l'embryon **(Basyuk et al., 1999; Knerr et al., 2005; Schreiber et al., 2000)**. GCM2 est exprimé au niveau de la parathyroïde et une mutation de ce gène provoque un hypoparathyroïdisme **(Gunther et al., 2000; Maret et al., 2004)**. L'expression des facteurs de type GCM a aussi été détectée dans le système nerveux des mammifères où ils seraient requis pour la production de NSCs **(Hitoshi et al., 2011; Iwasaki et al., 2003)**. Finalement, un rôle neurogénique de GCM1 a été mis en évidence chez le poulet où il est requis pour la différenciation neuronale dans la moelle épinière en développement **(Soustelle et al., 2007)**.

Figure 26 : Territoire d'expression de *gcm* et *gcm2* chez l'embryon

Les territoires d'expressions embryonnaires de *gcm* (B-L) et *gcm2* (A-K) sont révélés par hybridation *in situ* aux différents stades de l'embryogénèse. Bien *gcm2* soit exprimé à un niveau plus faible que *gcm*, *gcm* et *gcm2* sont exprimés dans les même territoires : dans le mésoderme procéphalique et les précurseurs des hémocytes (têtes de flèches), dans les précurseurs gliaux (flèches épaisses), les cellules de tendons (flèches fines) et deux structures céphaliques inconnues (astérisques). Barre d'échelle : 50 µm. **(Alfonso and Jones, 2002)**

Bien que la cascade transcriptionnelle induisant la gliogénèse chez la drosophile ne semble pas conservée chez la souris **(Altshuller et al., 1996; Hashemolhosseini et al., 2002; Wakamatsu, 2004)**, il semblerait que certaines propriétés gliogéniques des facteurs de type Gcm aient été conservées au cour de l'évolution. 1) m-GCM1 (mice-GCM1) est capable de sauver le phénotype des mouches mutantes pour *gcm* **(Kim et al., 1998; Reifegerste et al., 1999)**; 2) L'injection *in utero* d'un rétrovirus contenant le gène m-GCM1 a le potentiel d'induire l'expression de marqueurs astrocytaires **(Iwasaki et al., 2003)**. 3) L'introduction du gène *gcm* de la drosophile au sein d'un médulloblastome de rongeur ou au sein de cellule HeLa induit l'expression de marqueurs gliaux **(Buzanska et al., 2001; Soustelle and Giangrande, 2007b)**. Il est donc possible que les facteurs de type Gcm jouent un rôle dans le développement du système nerveux chez les vertébrés, cependant, il est exclu qu'ils soient les gènes maîtres de la gliogénèse comme chez la drosophile.

III.B.6. Le territoire d'expression de *gcm* et ses autres rôles

Gcm est un déterminant clé de l'identité cellulaire, cependant, la caractérisation de son territoire d'expression et sa régulation au niveau protéique ont longtemps été freinées par l'absence d'anticorps stables et spécifiques. Au début de ma thèse, le profil d'expression de *gcm* au niveau protéique n'avait toujours pas été caractérisé. Il avait initialement été étudié par l'utilisation de mouches transgéniques contenant des rapporteurs spécifiques dont l'expression récapitule le territoire d'expression de *gcm*. L'une d'entre elles, la souche gcm^{rA87}, contient une insertion d'un élément transposable de type élément P, contenant le gène *lacZ,* au niveau du site d'initiation de la transcription de *gcm* **(Miller et al., 1998)**. Dans cette souche, le profil d'expression de la β-Galactosidase (β-Gal) récapitule le territoire d'expression de *gcm* mis en évidence par hybridation *in situ* **(Fig. 26) (Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001)**. Cependant, cette méthode reflète un territoire d'expression biaisé. D'une part, l'insertion d'un élément transposable peut affecter la régulation du gène. D'autre part, cette méthode ne permet pas d'accéder aux régulations post-transcriptionnelles.

L'ARNm de *gcm* est détecté dans les précurseurs gliaux à partir du stade 9. L'expression de *gcm* est maintenue dans ce territoire jusqu'au stade 14 et commence à décliner à partir du stade 15. Notons que l'expression de *gcm* n'est pas restreinte aux précurseurs gliaux. Au début de l'embryogénèse, *gcm* est également exprimé dans le mésoderme procéphalique où il joue un rôle clé dans l'hématopoïèse embryonnaire. Le rôle de *gcm* dans ce territoire sera abordé en détail dans le prochain chapitre. L'ARNm de *gcm* est également détecté dans les cellules tendons, cellules permettant d'attacher les muscles à la cuticule. Dans ce territoire, Gcm permet la formation de sites d'attachements tendons/muscles fonctionnels **(Soustelle et al., 2004)**. La perte de fonction de *gcm* engendre des défauts dans l'attachement des muscles et des problèmes de locomotion. Finalement, *gcm* est aussi exprimé dans deux clusters de cellules encore non caractérisés et localisés dans la région céphalique de l'embryon. L'ensemble de ces données démontre que Gcm ne représente pas uniquement le déterminant glial et que ce facteur de transcription joue est requis dans d'autres populations de cellules, comme les cellules du « sang » et les cellules tendons.

Aux stades post-embryonnaires, l'expression de *gcm* a été observée dans les dans les précurseurs gliaux du CNS **(Viktorin et al., 2011)** et du PNS **(Fichelson and Gho, 2003; Van De Bor et al., 2000)**. De manière surprenante, un rôle neurogénique de Gcm a été mis en évidence au niveau de la lamina du système visuel larvaire **(Chotard et al., 2005; Soustelle and Giangrande, 2007b; Yoshida et al., 2005)**. Dans ce territoire, les neurones proviennent de NBs appelés cellules précurseurs de la lamina (LPC) tandis que la glie est générée dans des cellules précurseurs des cellules gliales (GPC) **(Perez and Steller, 1996)**. Dans la lamina, Gcm et Gcm2 sont fortement exprimés et requis à la fois dans les précurseurs gliaux et dans les précurseurs neuronaux. En effet, la perte de Gcm/Gcm2 bloque la production de glie mais provoque aussi des défauts importants dans la prolifération et la différenciation des LPCs. Plus récemment, il a été démontré dans l'équipe que Gcm et Gcm2 sont exprimés et requis dans les lignages neuronaux du cerveau central larvaire et que l'expression ectopique de Gcm ou Gcm2 peut induire l'expression ectopique de marqueurs neuronaux **(Soustelle et al., 2007)**. La biologie des facteurs de transcription de type Gcm apparaît donc plus complexe que ce qui avait été initialement prédit.

IV. LE SYSTEME IMMUNITAIRE

IV.A. L'Immunité chez la drosophile

Chez les insectes, les mécanismes de défense reposent uniquement sur l'immunité innée et, contrairement aux vertébrés, ils ne sont pas dotés de l'immunité adaptative basée essentiellement sur la production d'anticorps par les lymphocytes. Chez la drosophile, la cuticule et la barrière épithéliale constituent une première barrière physique contre l'entrée de pathogènes dans l'organisme. En cas d'infection, deux types de réponses immunitaires sont déclenchées : la réponse humorale et la réponse cellulaire. La réponse humorale est assurée par le corps gras, l'équivalent du foie chez les vertébrés, qui synthétise et libère dans l'hémolymphe des peptides antimicrobiens et antifongiques à large spectre d'action **(Ferrandon et al., 2007; Leclerc and Reichhart, 2004; Lemaitre and Hoffmann, 2007)**. La réponse cellulaire est assurée par les hémocytes et implique des processus de phagocytose, de mélanisation et d'encapsulation **(Meister and Lagueux, 2003)**. Les dernières données suggèrent que les réponses humorales et cellulaires sont étroitement liées, les hémocytes joueraient ainsi le rôle de sentinelles permettant de signaler la présence de pathogènes au corps gras. En effet, la sécrétion du ligand Unpaired3 (Upd3) par les hémocytes est requise pour déclencher la réponse du corps gras après une blessure septique **(Agaisse et al., 2003)**.

IV. B. Les hémocytes

IV.B.1. Les plasmatocytes et la phagocytose

Les plasmatocytes sont les équivalents des macrophages des vertébrés dont ils partagent les caractéristiques structurales et fonctionnelles **(Lemaitre and Hoffmann, 2007; Meister and Lagueux, 2003)**. Les plasmatocytes constituent la principale population d'hémocytes chez l'embryon et représentent environ 90 % des hémocytes circulants chez la larve. Ils sont aussi le seul type d'hémocyte présent chez l'adulte.

Figure 27 : Les plasmatocytes

L'observation de plasmatocytes au microscope électronique à transmission révèle la présence de nombreux phagosomes dans leur cytoplasme (flèches blanches). Barre d'échelle : 2 µm. **(Meister and Lagueux, 2003)**

Les plasmatocytes sont des phagocytes professionnels caractérisés par de nombreux phagosomes et lysosomes témoignant d'une intense activité de phagocytose **(Fig. 27)**. Ils jouent d'abord un rôle dans la défense de l'hôte, phagocytant les microbes ou les petits pathogènes. Le principal récepteur identifié et impliqué dans la phagocytose des bactéries est Eater, appartenant à la famille NIM **(Kocks et al., 2005)**. Récemment, plusieurs autres membres de la famille NIM capables de se fixer aux bactéries ont été identifiés **(Zsámboki et al., 2013)**. Durant le développement, les plasmatocytes participent aussi au remodelage des tissus, en éliminant les cellules apoptotiques durant le développement ou les structures larvaires histolysées durant la métamorphose **(Lanot et al., 2001)**. L'élimination des corps apoptotiques est largement dépendante du récepteur Croquemort (Crq), de type CD36 **(Franc et al., 1996; Franc et al., 1999)**. Des travaux plus récents ont aussi dévoilé une seconde voie de phagocytose agissant indépendamment de Crq et impliquant le récepteur Draper, aussi de type NIM. Cette voie est partagée entre les hémocytes et les cellules gliales, phagocytes résidents du CNS (voir II.C.2.d) **(Manaka et al., 2004**).

Les plasmatocytes participent également à la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire comme le Collagène ou la Peroxidasine **(Fessler et al., 1994; Fogerty et al., 1994; Nelson et al., 1994)**. La matrice extracellulaire entoure les organes et participe notamment à la condensation de la VNC durant l'embryogénèse, un processus durant lequel la taille de la VNC diminue et sa densité cellulaire augmente **(Olofsson and Page, 2005)**.

IV.B.2. Les cellules à cristaux et la mélanisation

Les cellules à cristaux constituent la seconde population d'hémocytes. Elles apparaissent au stade embryonnaire puis représentent environ 5 % des hémocytes en circulation chez la larve. Cette population d'hémocytes disparaît au cours de la métamorphose **(Lanot et al., 2001)**.

Durant la vie larvaire, les cellules à cristaux sont responsables d'une réponse immunitaire spécifique aux insectes, la mélanisation. La mélanisation correspond à un dépôt de mélanine permettant la cicatrisation d'une plaie ou l'encapsulation d'un parasite **(Carton and Nappi, 1997; Nappi and Vass, 1993; Rizki and Rizki, 1984)**. L'enzyme clé de la mélanisation est la phénoloxydase (PO) qui catalyse l'oxydation des phénols en quinones. Les quinones polymérisent ensuite pour former la mélanine par un mécanisme non enzymatique.

Figure 28 : Les cellules à cristaux

L'observation de cellules à cristaux au microscope électronique à transmission révèle la présence d'inclusions cristallines dans leur cytoplasme (flèches blanches). Barre d'échelle : 2 µm. **(Dearolf, 1998; Meister and Lagueux, 2003)**

Figure 29 : Les lamellocytes et l'encapsulation

A) Observation de lamellocytes au microscope électronique **(Meister and Lagueux, 2003)**. Barre d'échelle : 10 µm. B) Larve parasitée par *Leptopilina Boulardi.* Les structures inertes noires correspondent aux capsules mélanisées visibles à travers la cuticule (flèches). **(Lemaitre and Hoffmann, 2007)**

Chez la drosophile, la PO est stockée sous forme de pro-PO inactive dans des inclusions cristallines au sein du cytoplasme des cellules à cristaux **(Fig. 28)**. Suivant une infection, le zymogène est libéré dans l'hémolymphe et peut alors être activé par une cascade protéolytique. Les différentes étapes de la mélanisation impliquent la formation de composés toxiques tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde ou autres radicaux libres **(Nappi and Vass, 1993, 1998; Nappi et al., 1995, 2000)**. L'activité des PO doit donc être impérativement contenue sur le site de l'infection. La mélanisation est limitée à un niveau local grâce à des inhibiteurs de protéases de type serpine qui empêchent l'amplification des cascades protéolytiques **(Ligoxygakis et al., 2002)**.

Les cellules à cristaux peuvent être facilement visualisées dans des animaux portant la mutation *Black cell* (*Bc*) qui cause une mélanisation prématurée de leurs inclusions cristallines **(Rizki et al., 1980)**.

IV.B.3. Les lamellocytes et l'encapsulation

Les lamellocytes sont des cellules plates de grande taille **(Fig. 29A)**. Leur cytoplasme contient peu d'organites à l'exception de nombreux ribosomes sous forme libre **(Lanot et al., 2001)**. Ce troisième type d'hémocyte est absent chez l'embryon et l'adulte. Les lamellocytes se différencient uniquement chez la larve en cas de parasitisme par des pathogènes comme les œufs d'hyménoptère, trop gros pour être phagocytés par les plasmatocytes.

Le parasitisme représente un danger naturel pour les drosophiles. Les larves de drosophile sont confrontées à des hyménoptères parasites, comme la guêpe *Leptopilina Boulardi*, dont le cycle de développement dépend d'un hôte **(Carton and Nappi, 1997)**. Les guêpes pondent directement leurs œufs dans l'hémocoele des larves et ils se développent ensuite au détriment de l'hôte. La réaction d'encapsulation, dans laquelle les lamellocytes sont les acteurs principaux, consiste à isoler un parasite volumineux dans une capsule pour l'éliminer. L'encapsulation se déroule dans un processus en plusieurs étapes. Les plasmatocytes en circulation dans l'hémolymphe, qui ont un rôle de sentinelle, forment une première couche d'hémocytes autour du parasite **(Russo et al., 1996)**. Si celui-ci est trop gros pour être phagocyté, les plasmatocytes sécrèteraient un signal qui déclencherait une différenciation massive de lamellocytes et de cellules à cristaux **(Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002b)**. Les lamellocytes s'accumulent

alors dans l'hémolymphe. Ces cellules, dotées d'une grande capacité adhésive, forment une capsule multicellulaire autour du parasite afin de l'isoler du reste de l'organisme. En coopération avec les cellules à cristaux, la capsule est ensuite mélanisée et devient noire **(Fig. 29B) (Meister and Lagueux, 2003)**. Le pathogène succombe par asphyxie ou sous l'action des espèces réactives de l'oxygènes libérées lors de la mélanisation. Récemment, une étude transcriptomique a mis en évidence l'expression d'un gène codant pour une PO chez les lamellocytes **(Irving et al., 2005)**. Depuis cette découverte, les cellules à cristaux ne semblent donc plus être les seules cellules hémocytaires capables de produire cette enzyme clé de la mélanisation.

IV.C. Origine des hémocytes

A l'instar des vertébrés, l'hématopoïèse de la drosophile de déroule en deux vagues **(Holz et al., 2003; Lanot et al., 2001; Lebestky et al., 2000; Tepass et al., 1994)**. La vague primitive commence durant les tous premiers stades de l'embryogénèse. Elle permet la production de plasmatocytes et de cellules à cristaux. Chez la larve, les hémocytes circulant dans l'hémolymphe et les hémocytes sessiles, attachés au niveau de l'épiderme, sont issus de cette vague primitive. La deuxième vague se produit aux stades larvaires au sein d'un organe spécialisé, la glande lymphatique. Les plasmatocytes et les cellules à cristaux produits dans la glande lymphatique n'entrent pas dans la circulation en condition non immune. Durant la métamorphose, la glande lymphatique se désagrège sous l'action de l'ecdysone et ses hémocytes sont libérés dans l'organisme **(Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002a)**. Chez l'adulte, l'hémolymphe contient donc un mélange d'hémocytes d'origine embryonnaire et larvaire. A ce jour, aucun processus hématopoïétique n'a été mis en évidence chez l'adulte.

En cas de parasitisme chez la larve, le nombre d'hémocytes circulant augmente. Ils proviennent essentiellement des cellules dans la glande lymphatique qui prolifèrent de façon drastique. Ceci induit l'éclatement de la glande lymphatique et la libération de ses hémocytes dans l'organisme **(Sorrentino et al., 2002a)**. Elle devient également capable de produire des lamellocytes qui seront libérés dans l'hémolymphe. Les derniers travaux montrent également que les lamellocytes peuvent aussi se différencier à partir des plasmatocytes d'origine embryonnaire ou larvaire **(Stofanko et al., 2010)**.

Figure 30 : La glande lymphatique

A-B) Représentation schématique de la glande lymphatique en fin d'embryogénèse et au stade larvaire L3. ZC : Zone Corticale; ZM : Zone Médullaire; PSC : Centre de Signalisation Postérieur; DV : Vaisseau Dorsal; PC : Cellule péricardiaque. C) Observation de la glande lymphatique au microscope électronique à balayage au troisième stade larvaire. La flèche indique le vaisseau dorsal. Barre d'échelle : 50 µm. **(Meister and Lagueux, 2003)**

IV.D. L'hématopoïèse larvaire

IV.D.1. La glande lymphatique

Les précurseurs de la glande lymphatiques prennent naissance dans le mésoderme latéral de l'embryon. Ils migrent dorsalement pour former les premiers lobes appareillés de la glande lymphatique au contact du tube cardiaque **(Fig. 30C) (Crozatier et al., 2004; Holz et al., 2003; Jung et al., 2005; Tepass et al., 1994)**. Un rôle du gène *serpent* (*srp*) dans la détermination embryonnaire de la glande lymphatique a été mis en évidence **(Han and Olson, 2005; Mandal et al., 2004)**. Les embryons mutants pour le gène *srp* expriment des marqueurs péricardiaques dans la glande lymphatique et, réciproquement, l'expression ectopique de *srp* dans le mésoderme péricardiaque induit la transformation de ces cellules en cellules hématopoïétiques. Ces données suggèrent l'existence d'un précurseur commun aux cellules hématopoïétiques et aux cellules cardiaques, l'hémangioblaste.

Durant les trois stades larvaires successifs, la taille et le nombre de lobes de la glande lymphatique augmentent, chaque lobe étant séparé du lobe suivant par une cellule péricardiaque. Les hémocytes entament leur différenciation au stade L3. A ce stade, la glande lymphatique est un organe bilatéral multilobé composé de deux lobes antérieurs primaires et plusieurs petits lobes postérieurs secondaires. Les lobes antérieurs contiennent trois zones : la zone médullaire (ZM), la zone corticale (ZC) et le centre de signalisation postérieur (PSC) **(Fig. 30A, B) (Jung et al., 2005)**. La ZM constitue une réserve de précurseurs hématopoïétiques multipotents. Cette zone est considérée comme un réservoir de prohémocytes quiescents. La ZC, située à la périphérie, contient des plasmatocytes et des cellules à cristaux matures ou en cours de différenciation caractérisés par une intense activité proliférative. Le PSC est une petite zone jouant un rôle instructif dans la prolifération et la différenciation des hémocytes.

IV.D.2. La niche

La spécification du PSC dépend du facteur de transcription Collier, un orthologue du facteur EBF (early B-cell-factor) des mammifères. L'analyse d'animaux mutants pour le gène *collier* a permis de mettre en évidence le rôle du PCS dans la maintenance de la ZM et son

réservoir de précurseurs hématopoïétiques **(Crozatier et al., 2007; Krzemien et al., 2007; Mukherjee et al., 2011)**. En effet, l'absence de Collier conduit à la perte complète de la ZM de la glande lymphatique, tous les hémocytes s'étant différenciés. Le PSC joue donc un rôle similaire à la niche des vertébrés qui permet le maintien d'un pool de cellules souches hématopoïétiques (HSCs) **(Morrison and Spradling, 2008)**.

Le PSC contrôle les autres compartiments de la glande lymphatique à travers la sécrétion de signaux diffusibles dans l'environnement. Ces signaux permettent le maintien de l'équilibre entre les populations de progéniteurs et de cellules différenciées. Plusieurs de ces signaux ont été identifiés dont le morphogène Hedgehog (Hh) et le ligand PVF1 (Plateled-derived growth factor/Vascular endothelial growth factor-like Factor) **(Mandal et al., 2007; Mondal et al., 2011)**. Comme les glandes lymphatiques mutantes pour le gène *collier*, la perte de fonction conditionnelle de Hh ou PVF1 dans le PSC conduit à la différenciation prématurée des précurseurs hématopoïétiques. Le PSC maintient probablement l'activité de la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) par la sécrétion du ligand Upd3 **(Jung et al., 2005)**. La voie JAK/STAT est active et nécessaire dans la ZM de la glande lymphatique et la perte de STAT92E conduit à la disparition de la ZM **(Krzemien et al., 2007)**. Finalement, le PSC contrôle la production des cellules à cristaux à travers la voie Notch/Serrate **(Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003)**. Le ligand Serrate est exprimé spécifiquement dans le PSC tandis que le récepteur Notch est exprimé dans la ZM. L'activation de la voie Notch est requise pour l'activation du marqueur des cellules à cristaux Lozenge (Lz) et la perte de fonction de Notch conduit à une réduction considérable du nombre de cellules à cristaux.

IV.D.3. La voie JAK/STAT et les tumeurs mélanotiques

Des défauts dans le contrôle de l'homéostasie des hémocytes peuvent conduire à la formation de tumeurs hématopoïétiques, aussi appelées tumeurs mélanotiques. Elles sont causées par une surprolifération des hémocytes et des agrégations de plasmatocytes et de lamellocytes. De nombreux travaux ont été effectués dans le but de disséquer les mécanismes moléculaires qui contrôlent la formation de ces tumeurs.

Figure 31 : La voie JAK/STAT chez la drosophile

La fixation des cytokines Unpaired (Upd) sur les récepteurs à cytokine Domeless (Dome) conduit à leur dimérisation et provoque un changement conformationnel de leur région intracytoplasmique. Ce changement de conformation appose les kinases de type JAK (Janus Kinase) Hopscotch (Hop) qui s'activent par transphosphorylation de résidus tyrosine. Les tyrosines phosphorylées représentent des sites d'ancrages pour le facteur de type STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) STAT92E. Ils sont alors eux même phosphorylés puis transportés dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. La voie JAK/STAT peut être négativement régulée par les facteurs de type Pias (Protein inhibitor of STAT), Socs (Suppressor of cytokine signaling) ou les phosphatases de type Ptp (Protein tyrosine phosphatase).

Figure 32 : La voie JAK/STAT et les tumeurs mélanotiques

Larve L3 sauvage (A) et Hop^{Tum-1} (B). Le phénotype Hop^{Tum-1} est causé par la substitution G341E dans la kinase Hopscotch (Hop). Cette mutation conduit à une hyperactivation de Hop. En conséquence, la voie JAK/STAT est hyperactivée ce qui conduit à la formation de masses mélanotiques (flèche).

Ces études ont mis en évidence l'existence de nombreux mécanismes contrôlant la prolifération des hémocytes comme la voie Ras85D(Ras oncogène at 85D)/Pnt. D'autre part, un rôle clé de la voie JAK/STAT a été mis en évidence dans la différenciation des lamellocytes, et ce, à travers un processus indépendant de la prolifération. L'hyperactivation de cette voie conduit à la production de lamellocytes et à la formation de tumeurs mélanotiques **(Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995; Zettervall et al., 2004**). Réciproquement, la perte de fonction de la voie JAK/STAT conduit à l'absence de lamellocytes même en condition de parasitisme **(Sorrentino et al., 2004)**.

Les composantes et fonctions de la voie de transduction du signal JAK/STAT ont été particulièrement bien conservés dans l'évolution **(Fig. 31) (Arbouzova and Zeidler, 2006; Zeidler and Bausek, 2013)**. La fixation du ligand Upd sur les récepteurs à cytokine Domeless (Dome) entraîne leur dimérisation et un changement conformationnel de leur région intracytoplasmique. Suivant ce changement de conformation, les kinases Hopscotch (Hop), de type JAK, s'activent par transphosphorylation de résidus tyrosines clés. Ces tyrosines représentent des sites d'ancrage pour les facteurs de type STAT STAT92E. Une fois recrutés, les facteurs STAT92E sont eux même phosphorylés par Hop avant d'être transportés dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. L'activité de la voie JAK/STAT peut être négativement régulée par les facteurs Socs (Suppressor of cytokine signaling), qui inhibent l'activité du récepteur ou de la kinase JAK, Pias (Protein Inhibitor of Activated STAT), qui interagissent directement avec les facteurs STATs, ou les phosphatases de type PTP (Protein Tyrosine Phosphatase).

Les larves Hop^{Tum-1}, dans lesquelles l'activité kinase de Hop est constitutivement activée, développent des tumeurs mélanotiques (**Fig. 32**) **(Luo et al., 1995; Luo et al., 1997)**.

IV.E. L'hématopoïèse embryonnaire

IV.E.1. Chronologie

Chez l'embryon, les hémocytes proviennent de précurseurs bipotents capables de produire des plasmatocytes et des cellules à cristaux. Ces précurseurs apparaissent au stade blastoderme (stade 5) dans le mésoderme procéphalique. Après la gastrulation, les cellules à cristaux restent groupées dans deux clusters bilatéraux localisés au niveau du proventricule de l'intestin antérieur. Au contraire, les plasmatocytes s'invaginent avec le sillon ventral et migrent dans l'embryon en

Figure 33 : L'hématopoïèse embryonnaire

Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire. Vue latérale. A) Embryon au stade 5. Le mésoderme antérieur est représenté en violet (ae). Les précurseurs des hémocytes (he, vert) apparaissent au niveau du mésoderme procéphalique. Les précurseurs de la glande lymphatique (lg, bleu) apparaissent dans le mésoderme latéral. B) Embryon au stade 11. Les précurseurs des plasmatocytes (bleu) commencent leur migration tandis que les précurseurs des cellules à cristaux (ccp, rouge) apparaissent au niveau mésoderme antérieur. Les précurseurs de la glande lymphatique migrent dorsalement. C) Embryon au stade 17. Les cellules à cristaux sont groupées autour du proventricule (pv) tandis que les plasmatocytes sont dispersés à travers l'ensemble de l'embryon. La glande lymphatique forme deux lobes appareillés autour du vaisseau dorsal (dv). br : cerveau; e : œsophage m : segment maxillaire; lb : segment labial. **(Lebestky et al., 2000)**

suivant un cheminement précis **(Fig. 33) (Evans and Wood, 2011; Tepass et al., 1994)**. Pendant les stades 10 et 11, ils colonisent d'abord la région de la tête. Ensuite, du stade 12 au stade 14, ils migrent le long de voies stéréotypées. Les plasmatocytes migrent postérieurement sur la surface de VNC. Ils franchissent aussi l'amnioséreuse au stade 11 avant de migrer antérieurement le long de la VNC. Ils peuplent l'arrière de l'embryon après la rétractation de la bande germinale. Ils migrent également le long de l'amnioséreuse pour coloniser la région dorsale de l'embryon. Des stades 15 à 17, les plasmatocytes se répandent dans l'ensemble de l'embryon.

IV.E.2. La migration des plasmatocytes

Au cours de leur migration, les hémocytes circulants étendent des protrusions cytoplasmiques dynamiques de type lamellipode et filopode. Ces protrusions cytoplasmiques sont largement dépendantes de la formation de structures basées sur l'actine comme les fuseaux parallèles d'actine **(Mattila and Lappalainen, 2008; Pollard and Borisy, 2003)**. Les protéines de type fascine, impliquées dans la formation des fuseaux d'actines **(Fig. 34)**, jouent un rôle majeur dans la migration cellulaire et l'augmentation de leur expression est souvent liée à l'invasivité de nombreux cancers **(Adams, 2004; Kureishy et al., 2002; Vignjevic and Montagnac, 2008)**. La protéine de type fascine Singed est fortement exprimée dans les plasmatocytes et elle joue un rôle critique dans la migration de ces cellules. En effet, dans les embryons mutants pour le gène *singed,* les plasmatocytes ne parviennent pas à atteindre la partie postérieure de l'embryon et s'agrègent dans la partie antérieure **(Cant et al., 1994; Zanet et al., 2009a; Zanet et al., 2009b)**. La migration des plasmatocytes dépend également du système de guidance PVR/VEGF (PDGF VEGF receptor/Vascular Endothélial Growth Factor) **(Bruckner et al., 2004; Cho et al., 2002)**. Les hémocytes circulants expriment à leur surface le récepteur PVR tandis que les ligands chemoattractifs VEGF sont exprimés le long des routes de migration des plasmatocytes.

Figure 34 : Singed est requis pour la formation des filopodes

Embryons sauvage (A) ou mutant pour le gène *singed* (perte de fonction de *singed* = *singed* LOF) (B). Architecture du cytosquelette d'hémocytes vivants. L'absence de la protéine Singed, de type fascine, conduit à des défauts dans la formation et la polarisation des lamellipodes. **(Zanet et al., 2009b)**

IV.E.3. Les facteurs de transcription

IV.E.3.a. Le déterminant mésodermal Twist

Le facteur de transcription Twist (Twi) est exprimé dans le mésoderme présomptif avant la gastrulation et est absolument nécessaire à l'invagination primaire de la plaque mésodermale séparant ce feuillet de l'ectoderme neurogénique. Twi est également exprimé dans le mésectoderme. Après la gastrulation, ce facteur mésodermal régule la détermination des différents tissus issus du mésoderme comme les hémocytes, le corps gras et les muscles **(Castanon et al., 2001; Cripps et al., 1998; Furlong, 2004; Yin et al., 1997)**. Il permet notamment l'activation de gènes critiques tels que *srp,* exprimé dans le corps gras et les hémocytes, ou *mef2* (*mesodermal factor 2*) nécessaire à la myogenèse.

Le gène *twist* code pour une protéine de 490 acides aminés qui appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (bHLH). Comme les facteurs proneuraux du même type, Twist peut dimériser avec les protéines E, comme Daughterless, et agir comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel selon les cofacteurs avec lesquels il dimérise **(Wong et al., 2008)**. Twist est également capable de se lier directement aux séquences consensus appelées boîtes E (CANNTG). Trois types de boîte E peuvent être reconnues par Twist (CATGTG; CACGTG; CATATG), cependant, les dernières données de ChIP-seq suggèrent que Twist peut se lier sur des boîtes E non canoniques selon les cofacteurs avec lesquels il dimérise **(Sandmann et al., 2007; Sokol and Ambros, 2005)**.

IV.E.3.b. Le déterminant hémocytaire Srp et son cofacteur U-shaped

Le seul facteur connu pour la spécification des précurseurs hématopoïétiques chez la drosophile est le facteur Srp, un facteur de transcription à doigt de Zinc appartenant à la famille GATA **(Bataille et al., 2005; Rehorn et al., 1996; Reuter, 1994; Sorrentino et al., 2005; Waltzer et al., 2010; Zsámboki et al., 2013)**. Srp est absolument requis pour la production de tous les types d'hémocyte et la mutation du gène *srp* conduit à l'absence d'hématopoïèse. Il est d'ailleurs le premier marqueur permettant de distinguer les prohémocytes. Chez l'embryon, *srp* est aussi exprimé dans d'autres territoires endodermiques et mésodermiques

Figure 35 : Structure des facteurs GATA

A) Les facteurs de type GATA contiennent deux doigt de zinc, de type Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys, séparés par 29 résidus d'acides aminés (aa). Ces deux doigts de zinc sont référencés comme le doigt N, en N terminal, et le doigt C, en C terminal. Le doigt N est spécifiquement impliqué dans le recrutement de cofacteurs de type FOG (Friend Of GATA). Le doigt C est impliqué dans la liaison à L'ADN au niveau des séquences consensus WGATAR. B-C) Structures tridimensionnelles des doigts de zinc de GATA-1 déterminées par résonnance magnétique nucléaire. B) Structure du doigt N en interaction avec FOG-1 **(Liew et al., 2005)**. C) Structure du doigt C en interaction avec l'ADN **(Clore and Gronenborn, 1998)**. D) Représentation schématique du locus de *srp* et des isoformes générés par épissage alternatif **(Waltzer et al., 2002)**. Les exons sont numérotés de 1 à 7 (E1-E7). Les exons E4A et E5 codent respectivement pour les doigts N et C. Les deux isoformes SrpC et Srp NC sont générés par épissage alternatif des exons E4A ou E4B. E7 contient un site accepteur d'épissage interne permettant la génération de deux isoformes supplémentaires encore non caractérisés, SrpCδ et SrpNCδ.

tel que le corps gras **(Hoshizaki et al., 1994)**. Ces observations impliquent l'existence d'autres facteurs agissant en synergie avec Srp pour la spécification du destin hémocytaire, cependant, ces autres facteurs n'ont pas encore été identifiés à ce jour.

Dans un second temps, Srp peut dimériser avec son cofacteur dédié U-shaped (Ush), de type FOG (Friend-Of-GATA), pour promouvoir le destin plasmatocytaire et réprimer la différenciation des cellules à cristaux **(Fossett et al., 2000; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003)**. Dans les embryons mutants pour le gène *ush*, le nombre de cellules à cristaux augmente drastiquement. A l'inverse, l'expression ectopique de Ush dans les cellules à cristaux conduit à la réduction de leur nombre. Les protéines FOGs possèdent de multiples doigts de Zinc. Elles sont connues pour interagir avec les facteurs GATAs de manière à moduler leur activité, cependant, le mode d'action précis de cette régulation reste mal compris. Il semblerait que les facteurs FOGs puissent augmenter ou diminuer le potentiel transactivateur des facteurs GATAs selon le contexte cellulaire **(Cantor and Orkin, 2005)**.

De manière intéressante, le gène *srp* code pour deux isoformes, SrpC et SrpNC, contenant respectivement un et deux doigts de Zinc **(Waltzer et al., 2002)**. Bien que les deux isoformes partagent le même territoire d'expression, ils sont dotés de propriétés biochimiques différentes. A l'instar des facteurs GATA des vertébrés, SrpNC contient deux doigts de zinc **(Fig. 35)**. Le doigt C, en position C-terminal, joue le rôle de DBD et permet d'interagir avec la séquence consensus WGATAR sur l'ADN. Le doigt N, en N-terminal, est nécessaire pour interagir avec le cofacteur Ush. Contrairement aux protéines GATA des vertébrés, l'isoforme SrpC, est dépourvus du doigt N et ne peut donc pas interagir avec la protéine Ush.

IV.E.3.c. Le déterminant des cellules à cristaux Lozenge

Lz est un facteur de transcription de type RUNX (Runt box) possédant un domaine de liaison à l'ADN Runt spécifique. Lz est exprimé au stade 7 dans la sous-partie antérieure du territoire hématopoïétique exprimant Srp. Le territoire de Lz, recouvre environ 20 % des prohémocytes et correspond aux précurseurs potentiels des cellules à cristaux **(Bataille et al., 2005)**. Lz est nécessaire au développement des cellules à cristaux, les embryons mutants pour le gène *lz* étant dépourvus de cette population d'hémocytes **(Lebestky et al., 2000)**. Agissant en

synergie avec Srp, Lz permet l'activation des gènes codant pour les pro-PO et la répression du facteur de transcription Ush. **(Ferjoux et al., 2007; Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003)**. En effet, l'expression ectopique de la seule protéine Lz à travers le mésoderme ne conduit qu'à une modeste augmentation du nombre de cellules à cristaux tandis que la coexpression de Srp et Lz provoque une différenciation massive de ces cellules **(Fossett et al., 2003)**.

IV.E.3.d. Le déterminant plasmatocytaire Gcm

Gcm et Gcm2 sont exprimés dans le mésoderme procéphalique présomptif du blastoderme où ils colocalisent avec Srp et Twi **(Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997; Kammerer and Giangrande, 2001)**. Gcm agit alors comme un déterminant plasmatocytaire. Les embryons mutants pour les gènes *gcm/gcm2* montrent des défauts importants dans la maturation des hémocytes. Ils perdent notamment leur capacité à phagocyter. Par opposition, l'expression ectopique de Gcm ou Gcm2 dans les précurseurs des cellules à cristaux induit leur transformation en plasmatocytes **(Bataille et al., 2005; Lebestky et al., 2000)**. De manière surprenante et contrairement à Ush, Srp et Lz, Gcm ne semble pas conserver son rôle dans l'hématopoïèse larvaire puisqu'il n'est pas exprimé dans la glande lymphatique.

Bien que Gcm puisse convertir des précurseurs de cellules à cristaux en plasmatocytes, il n'est pas encore précisément clarifié si Gcm possède un rôle instructif dans la production d'hémocytes. En effet, les précurseurs des cellules à cristaux sont déjà des hémocytes caractérisés par l'expression de la protéine Srp. L'expression ectopique de Gcm dans la corde ventrale conduit à une augmentation du nombre de plasmatocytes dans ce territoire, cependant, l'absence de marqueurs de lignage n'a pas permis de déterminer précisément l'origine de ces hémocytes **(Bernardoni et al., 1997)**. Il est donc possible que ces « hémocytes ectopiques » seraient des plasmatocytes recrutés au niveau de la VNC à cause d'une augmentation du nombre de corps apoptotiques dans ce territoire **(Alfonso and Jones, 2002).**

A l'instar de leur rôle d'interrupteur moléculaire entre le destin glial et le destin neuronal dans le système nerveux, les facteurs de type Gcm jouent également un rôle de pivot dans l'hématopoïèse embryonnaire. Cependant, la fonction de Gcm dans ce territoire reste peu explorée par rapport à son rôle dans la gliogénèse. Il existe une relation étroite entre les différents

Figure 36 : Mécanisme gouvernant l'acquisition de l'identité cellulaire durant l'hématopoïèse embryonnaire
Au stade 5, tous les prohémocytes expriment Gcm. L'expression de Gcm s'efface au stade 7 dans la partie antérieur du mésoderme procéphalique ce qui conduit à l'activation de Lozenge (Lz) dans ces cellules. Les autres prohémocytes dans lesquelles l'expression de Gcm est maintenue se différentient en plasmatocytes. 60 % des cellules dans lesquelles Lz est activé parviennent à maintenir l'expression de cette protéine, à travers un mécanisme d'autorégulation, et se différencient en cellules à cristaux. Les autres cellules acquièrent le destin de plasmatocytes à cause de l'activité résiduelle de Gcm

facteurs de transcription gouvernant l'hématopoïèse embryonnaire. L'activation de Gcm dans ce territoire requiert absolument la présence de Srp **(Bernardoni et al., 1997)**. Srp a aussi été identifié dans un crible visant à identifier les gènes agissant en aval de Gcm **(Freeman et al., 2003)**. Gcm pourrait donc vraisemblablement activer Srp dans une boucle de rétrocontrôle de manière à promouvoir la maturation des plasmatocytes.

Les mécanismes gouvernant l'acquisition de l'identité cellulaire durant l'hématopoïèse embryonnaire ont été décrits précédemment **(Fig. 36) (Bataille et al., 2005)**. Gcm est exprimé initialement au stade 5 dans l'ensemble des prohémocytes. Son expression s'estompe dans les 10 % de précurseurs localisés dans la partie antérieure du mésoderme procéphalique. En retour, le facteur RUNX Lz est activé dans ces cellules ainsi que dans les 10 % de prohémocytes adjacents exprimant encore Gcm. A ce stade, 80 % des prohémocytes expriment uniquement Gcm, 10 % expriment exclusivement Lz et 10 % expriment à la fois Gcm et Lz. Tous les prohémocytes exprimant Gcm deviendront des plasmatocytes. En revanche, parmi les 10 % restant (Lz positifs), l'expression de Lz ne sera maintenue que dans 60 % ce cette population via une boucle d'autorégulation (6 % des hémocytes totaux). Ces cellules deviendront des cellules à cristaux tandis que les 40 % restant (4 % des hémocytes totaux) se différencieront en plasmatocytes à cause d'une activité résiduelle de Gcm.

Récemment, il a été démontré dans l'équipe que Gcm interagit directement avec dPias pour réguler négativement la voie JAK/STAT. Ainsi, la surexpression d'un allèle dominant négatif de Gcm dans les hémocytes conduit à la formation de tumeurs mélanotiques **(Jacques et al., 2009)**.

IV.E.4. L'hématopoïèse chez les vertébrés

Chez les vertébrés, les HSCs génèrent deux types de progéniteurs : les progéniteurs lymphoïdes et myeloïdes. Les progéniteurs lymphoïdes sont à l'origine des lymphocytes B et T tandis que les progéniteurs myéloïdes produisent les érythrocytes, les mégacaryocytes, les granulocytes et les monocytes/macrophages **(Evans et al., 2003)**. L'absence d'immunité adaptative assurée par lymphocytes des vertébrés font que l'on considère les hémocytes de la drosophile comme les équivalents de la lignée myeloïdes des vertébrés. De plus, ils partagent certaines similarités fonctionnelles comme la phagocytose.

Figure 37 : Comparaison de l'hématopoïèse chez la drosophile et les vertébrés

Représentation schématique des différentes voies de signalisation et des facteurs de transcription régissant l'hématopoïèse chez la drosophile (A) et les vertébrés (B). Les facteurs de transcription de type GATA (rouge), FOG (vert) et RUNX (Bleu) sont particulièrement bien conservés. Les lignées lymphoïdes et Erythrocyte/Megakaryocytes (EM) des vertébrés sont présentées en gris pour souligner l'absence d'équivalent chez a drosophile **(Evans et al., 2003)**.

Les bases moléculaires de l'hématopoïèse ont été remarquablement bien conservées au cours de l'évolution et impliquent les mêmes facteurs de transcription appartenant aux familles GATA, FOG et RUNX **(Fig. 37) (Evans and Banerjee, 2003; Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996)**. Trois facteurs de type GATA sont impliqués dans l'hématopoïèse chez les vertébrés. GATA-1 est requis pour le développement des érythrocytes **(Fujiwara et al., 1996**), GATA-2 contrôle la prolifération et la survie des HSCs **(Tsai et al., 1994**) et GATA-3 pour le développement des cellules T **(Ting et al., 1996)**. Comme SrpNC, les facteurs GATAs des vertébrés peuvent interagir avec les protéines de type FOG par l'intermédiaire de leur doigt de Zinc N-terminal. Ainsi, le dimère GATA-1/FOG-1 est nécessaire pour réprimer la différenciation des éosinophiles (granulocytes) et pour promouvoir la différenciation des érythrocytes/mégacaryocytes (EM) **(Querfurth et al., 2000; Tsang et al., 1997)**. Le facteur de type RUNX AML-1 (Acute Myeloid Leukemia Factor 1), dont le domaine Runt conserve 71 % d'identité avec celui de Lz, joue aussi un rôle clé pour la spécification des précurseurs myéloïdes **(Coffman, 2003)**. AML-1 est d'ailleurs souvent la cible de translocations chromosomiques à l'origine des leucémies myéloïdes aigües **(Liu et al., 1993; Miyoshi et al., 1991)**. Finalement, la voie JAK/STAT régule de nombreux aspects de l'hématopoïèse et elle est associée avec les leucémies et les lymphomes **(Bromberg, 2002)**. Selon les connaissances actuelles et contrairement aux facteurs de type GATA, FOG ou RUNX, aucun rôle des facteurs de type Gcm n'a encore été mis en évidence dans l'hématopoïèse chez les vertébrés.

Figure 38 : Problématique

Lorsqu'il est exprimé dans les prohémocytes, Gcm favorise la différenciation des plasmatocytes (A). De manière différente, Gcm agit comme le gène maître de la gliogénèse au sein du système nerveux (B). L'activité de Gcm dépend donc de facteurs spécifiques de chaque tissu que j'ai entrepris d'identifier (C). Le gène maître de l'hématopoïèse, *srp*, qui est aussi une cible de Gcm dans les hémocytes, n'est pas exprimé dans la glie (A). De même, l'expression du cofacteur de Srp, Ush, suit l'expression de Gcm dans les hémocytes mais pas dans la glie. A l'inverse, *repo*, la principale cible directe de Gcm dans la glie, est exclue du territoire hématopoïétique (B). Comment sont régulées les cibles de Gcm?

V. OBJECTIFS DE LA THESE

V.1. De la glie au sang : choix du destin entre hémocytes et cellules gliales.

L'acquisition du destin cellulaire est souvent contrôlée au niveau transcriptionnel par des facteurs clés. Gcm constitue un de ces déterminants de l'identité cellulaire. Ce facteur de transcription atypique à doigt de Zinc joue un rôle critique dans l'hématopoïèse embryonnaire. Il est exprimé dans les précurseurs des hémocytes et déclenche la différenciation des plasmatocytes qui jouent le rôle de macrophages circulant dans l'hémolymphe **(Bernardoni et al., 1997)**. Par ailleurs, *gcm* est exprimé dans les NCSs où il constitue le gène maître pour la production de cellules gliales, cellules impliquées dans le développement du système nerveux et la maintenance des fonctions neurologiques **(Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996)**.

Bien que le mode d'action de Gcm dans la gliogénèse soit particulièrement bien décrit, son rôle précis dans les précurseurs hémocytaires reste mal compris. En particulier, les cibles directes de Gcm dans les hémocytes n'ont pas encore été nécessairement mises en évidence, les connaissances actuelles reposant sur des cribles ayant identifié des gènes positivement ou négativement régulés par Gcm **(Altenhein et al., 2006; Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003)**. Au vu de l'excellente conservation des bases moléculaires de l'hématopoïèse dans l'évolution, il est crucial d'approfondir l'étude du rôle de Gcm dans l'hématopoïèse. J'ai ainsi entrepris la caractérisation précise du potentiel hématopoïétique de Gcm et l'identification de nouvelles cibles directes de ce facteur de transcription dans les hémocytes.

La plupart des gènes déterminant l'identité cellulaire, agissent dans plusieurs tissus. La fonction d'un facteur de transcription peut donc varier en fonction du territoire dans lequel il est exprimé. Le mode d'action d'un déterminant de l'identité cellulaire dépend alors d'autres facteurs de transcription avec lesquels il agit en synergie ainsi que des enzymes ou des partenaires qui modifient son activité. Chez la drosophile, Gcm constitue un modèle unique dans lequel un gène maître est partagé entre la gliogénèse et l'hématopoïèse. D'autres facteurs, agissant en amont ou en aval de Gcm, doivent contribuer à la spécificité du processus de différenciation **(Fig. 38)**. L'objectif principal de ma thèse fut d'identifier de tels facteurs.

Pendant que les plasmatocytes sont des macrophages professionnels, les cellules gliales chez la drosophile, constituent les macrophages résidents du système nerveux **(Kurant, 2011)**. Elles phagocytent les corps apoptotiques durant le développement et stimulent la régénération du système nerveux suite à une blessure à travers un processus qui reste mal compris **(Kato et al., 2011)**. L'objectif de ce projet est donc double. En plus d'apporter de nouvelles informations concernant les mécanismes qui régulent l'acquisition de l'identité cellulaire, ce projet a aussi pour but d'explorer les mécanismes sous-jacents des fonctions immunitaires de la glie.

V.2. Caractérisation du territoire d'expression de *gcm* au niveau protéique : identification d'un nouveau rôle de Gcm dans la production de cellules neurosécrétrices.

Gcm constitue un déterminant clé de l'identité cellulaire, cependant, la caractérisation de son territoire d'expression et sa régulation au niveau protéique ont longtemps été freinées par l'absence d'anticorps stables et spécifiques. Pour contourner ce problème, nous avons entrepris au laboratoire la génération d'animaux transgéniques portant un allèle de Gcm marqué par l'épitope FLAG. J'ai alors participé à la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de l'activité protéine Gcm-FLAG ainsi qu'à l'étude de la dynamique de son territoire d'expression au niveau protéique et sa régulation par les miRNA. Dans ce contexte, j'ai découvert un nouveau lignage cellulaire qui exprime et requiert Gcm : il s'agit de cellules neurosécrétrices absolument cruciales pour initier le signal hormonal déclenchant le phénomène de mue chez les insectes **(Laneve et al., 2012)**.

Publication 1 :

Glial cells in neural developpement

Version 1.0 a0023740

a0001

Glial Cells in Neural Development

Guillaume Trébuchet, *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France*
Angela Giangrande, *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France*

Advanced article

Article Contents

- Introduction
- Glial Organisation and Function
- Glial Cell Migration
- Gliogenesis
- gcm, The Master Regulatory Gene of the Glial Fate
- Discussion

Online posting date: 15th August 2012

Glial cells and neurons depend on each other from birth to death. Glial cells accomplish many tasks for the proper development of the nervous system and for the maintenance of neurological functions. This review focuses on recent findings in the simple *Drosophila* model and underlines the similarities and differences between fly and vertebrate glia. The molecular and cellular mechanisms underlying gliogenesis will be reviewed as well as the role of the master regulatory gene of the glial fate: *glial cells deficient/glial cells missing (glide/gcm)*. All along the review, the features shared between glia and macrophages are highlighted, as *glide/gcm* is also required in macrophage development and fly glia behave as nervous system-specific scavenger cells. Finally, the recent data about the developmental pathways and the role of fly glia prompt us to reconsider the origin of glial cells during evolution.

s0001

Introduction

p0001 The nervous system consists of two major cell types: neurons and glia. Neurons act as transducers of information whereas glia maintain and support neuronal functions. The similarities between invertebrate and vertebrate nervous systems emphasise the importance of the *Drosophila* model to improve our knowledge about glia. Long thought to be passive structural elements in the brain, glia appear to be absolutely necessary to neuronal activity since loss of these cells induces lethality. Comprising 10% of the cells in the *Drosophila* nervous system, glia are heterogeneous in morphology, function and gene expression profile. This review highlights the large glial diversity, defining several glial subtypes and their known associated functions. It then describes the tight relationship between neurons and glia as well as the processes of glial differentiation and migration. Finally, the molecular pathways underlying gliogenesis will be addressed, including the surprising similarities between glia and macrophages in terms of development and function. All along this review, the conservation throughout evolution will be analysed and comparisons will be made whenever possible between fly and vertebrate glial cells. **See also**: Cells of the Nervous System

eLS subject area: Developmental Biology

How to cite:
Trébuchet, Guillaume; and Giangrande, Angela (August 2012) Glial Cells in Neural Development. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
DOI: 10.1002/9780470015902.a0023740

Glial Organisation and Function s0002

Glial subtypes s0003

p0002 Within the central nervous system (CNS), we define two major classes: lateral glia, originating from the neuroectoderm and peripheral ectoderm and midline glia, which derive from the mesectoderm (Jacobs, 2000). Midline and lateral glia display completely different origin and behaviour. In this review we will focus mainly on the lateral glial cells, which can be further divided into five subgroups according to their position (surface, cortex or neuropile) and to their morphology (**Figure 1**; Ito *et al*., 1995; Beckervordersandforth *et al*., 2008). On the surface of the ventral cord (VNC), which is the equivalent of vertebrate spinal cord, the subperineural glia (SPG) are flat cells associated with the outer surface whereas the channel glia (CG) are positioned between the VNC metameric units that are called hemineuromeres. Within the VNC cortex, cell body glia (CBG) are star-shaped and intermingle with neuronal cell bodies. Among the glia associated with the neuropile and the axons, longitudinal glia (LG) and nerve root glia (NRG) ensheath the nerve bundles (**Figure 1**). Finally, in the peripheral nervous system (PNS), peripheral glia ensheath the sensory and motor nerves that project toward and from the CNS. AU:1

Role of glia in signal transmission s0004

p0003 The *Drosophila* nervous system has to be kept isolated from nonneuronal tissues since the high K^+ concentration contained in the circulating haemolymph would abolish neuronal excitability. At the end of embryogenesis, SPG

glia are connected by tight junctions, called septate junction, and form a single layer sheath, the blood–brain barrier (BBB), which isolates the CNS from nonneuronal tissues and prevents neuronal depolarisation. Invertebrate glia do not myelinate nerve bundles, however, peripheral glia form a multi-layered membrane sheath around the axons, called the blood–nerve barrier (BNB), which isolates the nerves. Gliotactin is a major component of the BNB septate junction and its loss leads to lethality. In *gliotactin* mutant embryos, peripheral glia develop normally except that they do not form a complete BNB and the nerves are exposed to the haemolymph K^+, revealing the major role of the septate junction in axonal insulation.

p0004 In the adult fly, glia associated with synapses express high level of glutamine synthetase and excitatory amino acid transporters (EAATs), which regulate the extracellular level of glutamate (Freeman *et al*., 2003). Typically, EAAT1 is absolutely required for the normal activity of the neuromuscular junction (NMJ), since *EAAT1* deficient flies show a decreased glutamate buffering capacity. High extracellular glutamate concentration is neurotoxic and triggers hypersensitivity to oxidative stress; as a consequence, flies display neuropile degeneration, are flight defective and their lifespan decreases (Rival *et al*., 2004). **See also**: Glutamate as a Neurotransmitter

s0005 Role of glia in neuronal connectivity

p0005 The interactions between neurons and glia are necessary for the correct positioning of both cell types during development. In the embryonic CNS, longitudinal glia support initial joining of pioneer axons and the subsequent fasciculation and defasciculation steps (Hidalgo and Booth, 2000). In the *Drosophila* embryo, peripheral glia guide AU:2 sensory and motor axons (Sepp *et al*., 2000; Sepp and Auld, 2003). Glia can also control axonal target specificity: specific connectivity between retinal axons and their target in the brain require glia of the optic lobes (Poeck *et al*., 2001). **See also**: Axon Growth; Axon Guidance; *Drosophila* Neural Development

p0006 In addition, during metamorphosis, the larval neuronal circuitry has to be remodelled and axons prune and/or sprout again to form the adult nervous system. Axonal pruning has been investigated on the so-called γ neurons belonging to the mushroom body (MB), a region of the brain that develops post-embryonically and is involved in learning and memory (Awasaki and Ito, 2004; Awasaki *et al*., 2006). MB axons are submitted to local degeneration triggered by ecdysone stimulation. Glia located on the MB surface adopt a macrophage-like behaviour, clearing most of MB degenerating axons by engulfment before these axons start growing again. Like axons, synapses also display high levels of plasticity. During larval growth, muscles expand approximately 100-fold. In response to growth, the peripheral synapses or NMJs are remodelled by glial cells (Fuentes-Medel *et al*., 2009). **See also**: Postsynaptic Membranes at the Neuromuscular Junction: Molecular Organisation

Role of glia in nervous system homoeostasis s0006

p0007 In addition to their role in connectivity, glia control the neuronal cell number (Dumstrei *et al*., 2003). During development, neurons are produced in large excess and undergo three main phases of apoptosis: late embryogenesis, at metamorphosis during the pupal life and at emergence of the adult fly. Glia secrete neurotrophic factors that control neurons survival and cell number (Hidalgo *et al*., 2011). Furthermore, at the end of embryonic development, most neural stem cells (NSCs) become quiescent and resume dividing in the larval stages in response to a nutrition dependant pathway. A surface glia subpopulation produces insulin/IGF-like peptides in response to nutrition. As a consequence, IGF receptors in the NSCs drive growth, proliferation and exit from the quiescent phase (Chell and Brand, 2010). Therefore, glia control neuronal cell number and ensure proper homoeostasis during development.

p0008 Glial cells also play a major role in maintaining adult nervous system homoeostasis. After the formation of the BBB, circulating macrophages are excluded from the CNS. Stabbing injuries in the adult or in the larval *Drosophila* CNS triggers glial proliferation and dying neurons are cleared by glia that display engulfment ability (MacDonald AU:3 *et al*., 2006; Doherty *et al*., 2009; Kurant, 2011; Kato *et al*., 2011). Therefore, glia play the role of resident phagocytes of the adult CNS and likely constitute the only cell type that can respond to an immune challenge.

Comparison between vertebrates and invertebrates s0007

p0009 The development, the morphology and the function of vertebrate and invertebrate glia share several similarities. In mammals, three main glial subtypes have been described. Astrocytes display a structural role, maintaining the BBB. They have a star-like shape and contact multiple synapses; they also express EAATs and glutamine synthetase, probably recycling the glutamate by the same mechanism as *Drosophila* CBGs. Like the peripheral and the neuropile-associated glia, vertebrate oligodendrocytes in the CNS and Schwann cells in the PNS form multiple membrane sheaths. Interestingly, vertebrate glia can generate a myelin sheath around single axons, which dramatically increases the efficiency of impulse conduction (Lyons *et al*., 2005). The myelin sheath is morphologically similar to the invertebrate nerve ensheathment, although much more compact and complex, with node and internode regions expressing different protein complexes (Leiserson *et al*., 2000). Interestingly, the molecular components of the vertebrate glia–axon tight junctions are strikingly conserved in the invertebrate glia–glia junction in the BBB and BNB.

p0010 Finally, while in *Drosophila* different glial populations display immune activities, in vertebrates, a cell population originating from the immune system acts as a major resident macrophage of the CNS, the microglia. These cells

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

migrate into the nervous system during development and respond to injury, phagocyte dead cells and modulate brain inflammatory responses (Kim and de Vellis, 2005). However, under certain circumstances, astrocytes can support AU:4 microglia and display engulfment abilities as well (Bechmann and Nitsch, 1997). **See also**: Astrocytes and Brain Signalling; Blood–Brain Barrier; Microglia; Oligodendrocytes

s0008 # Glial Cell Migration

s0009 ## Glial migration in the adult PNS

p0011 In the PNS, glial cells move along the axons, often over long distances, to reach their final destination. Neurons send their pioneer axons from the sensory organs toward the CNS and glia directionally migrate as a chain over the nerve bundle. Collective migration is a commonly used developmental strategy which, when defective, may lead to severe diseases. In addition, collective migration is a hallmark of metastasis formation in cancer. The *Drosophila* wing disc provides an excellent model to study glial collective migration (**Figure 2**). Confocal time-lapse and cell ablation analyses have revealed that axon–glia interactions guide the direction of migration and that glia–glia interactions limit the extent of migration (Aigouy *et al*., 2004). In this context, two populations of glia have been identified. Pioneer glia, at the tip of the chain, display numerous filopodia and exploratory activity whereas follower glial cells are less active (Aigouy *et al*., 2008). Complex homoeostatic interactions between these cells control the integrity of the migratory community and the number of pioneers is also a key parameter to control the rate of migration (Berzsenyi *et al*., 2011). Thus, neuron–glia and glia–glia interactions control the directionality and the efficiency of the migratory community.

s0010 ## Glial migration in the embryonic nervous system

p0012 In the embryo, most peripheral glia arise from the CNS and reach their final destination upon migration to form the BNB. They migrate along motor and sensory axonal projections to reach a precise position. At mid-embryogenesis, three nerves fasciculate in each abdominal hemineuromere and are covered by 12 glial cells (von Hilchen *et al*., 2008), which completely ensheath the axon bundles by the end of development. Peripheral glia follow pioneer axon tracts and axon–glia interactions guide the direction of glial migration. Equally, disruption of glial ensheathment leads to severe axon path finding defects showing that a reciprocal interaction between neurons and glia is necessary for PNS development.

Vertebrate glial cell migration s0011

p0013 Migration is also a hallmark of vertebrate glia, which move from their place of birth until their site of differentiation or, following injury, until the wounded nerves to remyelinate it (Klambt, 2009). Several molecules are involved in glial migration, however the cellular mechanisms underlying this collective process are still poorly understood. Moreover, gliomas are among the most deadly types of cancer because of high mobility. In the vertebrate CNS, oligodendrocytes, which develop in few precise areas, migrate individually to spread throughout the neural tube. In the PNS, although Schwann cells individually insulate an axon segment, they migrate as a chain along the peripheral nerves (Gilmour *et al*., 2002). As in *Drosophila*, vertebrate glia migrate following pioneer axonal projections. The collective features of migration probably enhance the coordination and the efficiency of migration similar to what has been shown in *Drosophila* glial cells migration. **See also**: Glioblastoma Models in *Drosophila Melanogaster*; Schwann Cells

Gliogenesis s0012

In the embryonic CNS s0013

p0014 The *Drosophila* VNC is subdivided in three thoracic and nine abdominal neuromeres. After five delamination waves from a neurogenic epithelium, some thirty NSCs are initially produced in each hemineuromere. These lineages produce neurons and glia in a stereotypic manner and the precursors behave as the vertebrate NSCs in terms of self-renewal, pluripotency and asymmetrical division (Juergen and Knoblich1, 2008). (*Drosophila* NSCs divide asymmetrically to produce glia and neurons according to different modalities. Using lineage tracers, a map of each NSC lineages was precisely defined. Most of the initial NSCs ($n = 30$) are pure neuroblasts producing only neurons, two are pure glioblasts producing only glia and five are mixed neuroglioblasts producing both neurons and glia. Two kinds of neuroglioblasts exist in the embryonic CNS (**Figure 3a**). Type 1 neuroglioblast produces glia just after delamination, dividing asymmetrically to produce a glioblast and a neuroblast that proliferate to produce glia and neurons, respectively. Type 2 neuroglioblast initially delaminates and divide asymmetrically to produce another neuroglioblast and an intermediate precursor called the ganglion mother cell or GMC, which produces two neurons. After several neuroglioblast divisions, mixed GMCs are generated, which produce one neuron and one glial cell that do not undergo further division. Therefore, glia originate from precursors (type 1 and type 2 neuroglioblasts) that do not share the same proliferative potential. Because of marker availability, the cellular and molecular bases of gliogenesis have been mostly studied in embryonic neuroglioblasts of type I. Type 2 neuroglioblast lineages resemble mammalian precursors in the cerebral cortex,

which initially generates neurons and only later produce glia.

p0015 During the larval life, lineages are much larger than the embryonic ones and some of them involve a transient amplifier, much like in vertebrates. Some lineages characterized by a transient amplifier cell produce glia, however, the mode of glial production in these lineages has not been so far investigated (Egger *et al*., 2011).

s0014 Gliogenesis in the adult PNS

p0016 In the adult, where sensory organs are located away from the CNS and are often located on appendages, peripheral glia arise from sensory organ precursors (SOPs) that have epithelial origin (**Figure 3**) (Giangrande *et al*., 1993). The SOP of the mechanosensory organs divide asymmetrically. One SOP daughter, the PIIa, divides asymmetrically to generate the cells that form the external structure of the sensory organ, the tormogen cell and the trichogen cell. The other daughter or PIIb divides asymmetrically to produce the PIIIb precursor, which in turn generates one neuron and a sheath cell, as well as the glial precursor or GP1, which produces a variable number of glia (**Figure 3b**; Van de Bor *et al*., 2000). Thus, the SOP is multipotent and divides asymmetrically, like the neuroglioblasts , but is not able to self-renew and has a limited proliferative potential, indicating that neurogenesis at the periphery does not involve stem cells.

s0015 gcm, The Master Regulatory Gene of the Glial Fate

p0017 Cell fate determination is often controlled at the transcriptional level by key regulatory factors. All *Drosophila* lateral glia require the transcription factor encoded by the *glial cells deficient/glial cells missing (glide/gcm)* gene (referred to as *gcm*, for the sake of simplicity), regardless of the type of precursor (Jones *et al*., 1995; Vincent *et al*., 1996). During the type 1 neuroglioblast first division, the *gcm* messenger ribonucleic acid (mRNA) progressively accumulates at the pole of the neuroglioblast from which the glioblast arises. After division, the daughter cell that inherits high levels of *gcm* mRNA becomes the glioblast whereas the daughter cell receiving less *gcm* mRNA AU:5 becomes a neuroblast (**Figure 4**) (Ragone *et al*., 2001). In *gcm* mutant embryos, cells that normally develop into glia enter the neuronal differentiation pathway leading to loss of glia and to an increase in the number of neurons. Accordingly, *gcm* ectopic expression targeted in all NSCs leads to an increase in the number of glial cells at the expense of neurons (**Figure 5**). Therefore, *gcm* represents the master transcriptional regulator of gliogenesis and acts as a molecular switch between neurons and glia. A homologous gene, *gcm2*, due to a genomic duplication, plays a minor role and is expressed at much lower levels than *gcm*.

The ability of the Gcm protein to reprogramme NSCs p0018
into glia makes it an interesting tool to study stem-cell plasticity. Indeed, it has been recently shown that the reprogramming of NSCs depends on the age of these cells rather than on their mitotic potential and that quiescent NSCs are not plastic at all, regardless of the amount of Gcm misexpression (Flici *et al*., 2011). Thus, although *in vitro* studies tend to consider stem cells as self-renewing precursors, *in vivo*, the identity of the NSCs changes with time and their plasticity progressively decreases with aging. Since recent work has shown that the nutritional state influences the proliferative potential of quiescent stem cells, it is conceivable that plasticity is affected by environmental conditions as well.

The gcm pathway s0016

The Gcm transcription factor is controlled at transcrip- p0019
tional and post-transcriptional levels. The spatial and temporal control of transcription is provided by homeobox containing proteins that work along the antero-posterior (A/P), the dorso-ventral (D/V) and the temporal axes. Moreover, many Gcm binding sites are found in its own promoter to mediate positive and direct auto-regulation. At the post-transcriptional level, the stability of the *gcm* mRNA is controlled by A/U rich elements in the 3'UTR (Soustelle *et al*., 2008). Lastly, at the protein level, Gcm can be polyubiquitinylated and degraded by the proteasome (Ho *et al*., 2009). All these regulatory processes produce threshold Gcm levels in specific cells and stages, allowing the integration of glial differentiation and specification pathways at the levels of the single *gcm* gene. For example, the lineage-specific nuclear factor Huckebein (Hkb) maintains *gcm* expression and physically interacts with the Gcm protein to promote the differentiation of a specific type of CBG glia (De Iaco *et al*., 2006). Finally, homeobox proteins expressed in specific lineages control the expression of *gcm* and that of cyclin genes, so that cell-specific factors and cell cycle genes link up stem cell proliferation, glial differentiation and specification.

gcm target genes s0017

gcm encodes a 504 amino acid protein containing a p0020
deoxyribonucleic acid (DNA) binding domain (DBD), a nuclear localisation signal (NLS), a PEST domain and a transcriptional activator domain (AD). The Gcm DBD belongs to a new class of zinc-finger, constituted by two β sheets linked together by one zinc ion, and acts through the 8-mer-consensus sequence ATGCGGGT found in the promoter of many glial-specific genes (Cohen *et al*., 2003). This mode of binding does not share any similarity with the DBDs until now described. Since the Gcm DBD is the only region conserved until humans, this domain defines a unique family of transcription factors conserved throughout evolution (Akiyama *et al*., 1996).

Bioinformatic analyses and microarray data from *gcm* p0021
gain-of-function animals have identified several putative

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

target genes. Among them, upregulation is observed for glial-specific genes whereas downregulation is observed for genes known to promote neurogenesis, supporting the model whereby Gcm promotes the establishment of the glial fate by activating glial genes and by concomitantly repressing neuronal ones. Gcm is expressed early and transiently in all the glial lineages. This indicates that glial-specific genes have to be activated by Gcm in order to maintain the glial programme. Homeodomain transcription factors that are known to maintain cell identity are prime candidates and one such protein, Reverse polarity (Repo), is indeed a direct target of Gcm and is continuously expressed in glia. Mutations in the *repo* locus lead to profound defects in glial proliferation and survival. The initial activation of *repo* depends on eleven Gcm binding sites found in its enhancer/promoter region. Once *gcm* expression has faded away however, the *repo* transcriptional state remains active in lateral glia via direct auto-regulation (**Figure 4**). **See also**: *Drosophila* Embryo: Homeotic Genes in Specification of the Anterior–Posterior Axis

s0018 The other roles of gcm in Drosophila embryonic development

p0022 In addition to their role in gliogenesis, *gcm* and *gcm2* are also required for the differentiation of hemocytes, cells of the immune system that provide the cellular and the humoral responses (Bernardoni *et al*., 1997). *Drosophila* haematopoiesis is restricted to embryonic and larval stages. During embryogenesis, blood cells originate in the head from bipotent precursors called prohemocytes, which produce plasmatocytes and crystal cells. The plasmatocytes migrate throughout the embryo and act as macrophages. They have a crucial role in host defence, phagocyting microbes and apoptotic bodies during development. Crystal cells remain located around the proventriculus and play a role in melanisation, another defence related process. *gcm* is necessary for plasmatocyte differentiation whereas the RUNX factor Lozenge (Lz) counteracts Gcm and is involved in crystal cell formation (Lebestky *et al*., 2000; Bataillé *et al*., 2005). In *gcm* deficient AU:6 embryos, prohemocytes do not differentiate in mature macrophages and *gcm* misexpression in crystal cell precursors converts these cells into plasmatocytes. Interestingly, Lz is the ortholog of the vertebrate acute myeloid leukaemia factor 1 (AML-1). AML-1 is required for definitive hematopoiesis and a frequent target of chromosomal rearrangement in human leukaemia (Okuda *et al*., 1996). During early embryogenesis, prohemocyte specification also requires the GATA factor Serpent, which triggers *gcm* and *lz* expression. Serpent is an ortholog of GATA factors involved in different aspects of vertebrate hematopoiesis, comprising the specification of blood pro- AU:7 genitors (Shivdasani *et al*., 1997). Therefore, the molecular bases of blood cell formation appear to be particularly well conserved between vertebrates and invertebrates.

p0023 Finally, *gcm* controls larval blood cell homoeostasis. During the larval stage, a third type of hemocytes, called lamellocytes, is produced. They are involved in the encapsulation reaction after parasitism. Excess of lamellocyte differentiation gives rise to melanotic tumours, a phenotype observed in animals lacking *gcm* expression. Blood cell homoeostasis is controlled in the fat body where *gcm* act in opposite way to the Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) (Jacques *et al*., 2009). In vertebrates, the JAK/STAT pathway controls several aspects of hematopoiesis and is associated with leukaemias and lymphomas (Bromberg, 2002).

p0024 Another tissue expresses *gcm* during embryonic development. In *Drosophila,* muscles are attached to the cuticle by tendon cells. One tendon cell subpopulation called segment border tendon cells expresses *gcm* for their terminal differentiation. Indeed, the loss of *gcm* triggers abnormalities in muscle attachment and locomotion defects (Soustelle *et al*., 2004). Precise attachment depends on reciprocal interactions between tendon cells and muscles: tendon cells direct myotube migration whereas muscles regulate tendon cells maturation by secreting Vein, a neuregulin-like epidermal growth factor receptor (EGFR) ligand. Interestingly, tendon cell differentiation resembles vertebrate Schwann-cell differentiation, which also required a neuregulin-mediated process (Zorick and Lemke, 1996).

Conservation of gcm genes throughout evolution s0019

p0025 *Drosophila* has been widely used to identify genes that are evolutionarily conserved in vertebrates and the neurogenic pathway provides a typical example. Surprisingly, the vertebrate *gcm* orthologs do not appear to display a gliogenic role in mice: *m-Gcm1* and *m-Gcm2* KO mice display implantation defects and hypoparathyroidism, respectively, (Hashemolhosseini and Wegner, 2004) and both *Gcm* orthologs seem involved in the maintenance of stemness in the mouse developing nervous system, although their precise role is not clear yet (Hitoshi *et al*., 2011). The embryonic lethality of *m-Gcm1* mutant mice doesn't allow to study its role in gliogenesis however the *m-Gcm1* expression profile doesn't appear to be related to glial differentiation. On the other side, it seems that vertebrate *Gcm* genes do have some kind of gliogenic potential: (1) rodent *Gcm1* is able to rescue the fly *gcm* mutant genotype (Reifegerste *et al*., 1999); (2) *in utero* injection of retrovirus harbouring *m-Gcm1* has the potential to induce the expression of some glial markers *in vivo* (Iwasaki *et al*., 2003); (3) introduction of the fly *gcm* gene into a medulloblastoma line or in Hela cells induces the expression of a glial marker (Soustelle *et al*., 2007). In view of the *m-Gcm1* embryonic lethality and the functional redundancy between the two fly *gcm* genes, conditional *m-Gcm1* and *m-Gcm1*/*m-Gcm2* double KO mice should be used to infer the absence of any *m-Gcm* role in gliogenesis. Together with the finding that the *Drosophila* genes have additional roles in very specific cell subpopulations, such as tendon and blood cells (see above), it is clear that the biology of this family of transcription

factors is far more complex than initially predicted and further work will be necessary to clarify their pathways in flies and vertebrates.

s0020 Discussion

p0026 Glial cells display a very rich diversity and interactions between neurons and glia control many pathways that regulate neural development and function. Clearly, *Drosophila* glia display important similarities with vertebrate counterparts, such as the ability to provide a trophic function and to isolate the nerve bundles from nonneural tissues, thereby permitting the transmission of the electrical impulses. A major feature of vertebrate glia, the myelin sheath that allows for saltatory conductance, morphologically resembles the multi-layer sheath of *Drosophila* peripheral glia surrounding the axons bundles. Nevertheless, its compaction and its sophisticated organisation, a gage for efficient conductance in the long vertebrate axons, have no parallel in flies. Thus, fly and vertebrate glia also display important differences and understanding how neuronal functions have improved during evolution will require studies on how glia have evolved.

p0027 *Drosophila* glia constitute the only resident macrophages of the CNS. They display a highly migratory behaviour, they proliferate following an external challenge and phagocyte apoptotic bodies on the wounding area. Recent works showing the crucial role of *Drosophila* glia in sculpting the nervous system highlight the similarities between this cell population and a very intriguing type of cells, the resident macrophages of the vertebrate nervous system, called microglia. Despite their name, these are cells of the immune system, which migrate into the nervous system during development and provide the first defence upon brain injury. Intriguingly, several molecular components of the phagocytosis pathway appear to be conserved between these cells and the *Drosophila* hemocytes. These findings open novel perspectives for understanding the biology, the function and the evolution of glia.

p0028 A better understanding of glial biology also needs to take into consideration the required molecular pathways. Although the genes and the signalling cascades underlying neurogenesis are similar between vertebrates and *Drosophila,* the transcriptional programme triggering the first steps of gliogenesis is not conserved. In *Drosophila*, the Gcm transcription factor is the major regulatory gene of the glial fate and acts as a binary switch between neuron and glia. The vertebrate orthologs, however, do not display a gliogenic role, raising the question of the role and the evolution of this gene family. Finally, no equivalent molecular switch has been identified in vertebrates. Although negative results are difficult to interpret, these findings lead to speculate that the decision to make neurons or glia uses different modalities in vertebrates. The combination of intrinsic/extrinsic temporal cues may better suit the complexity of the vertebrate nervous system than a single fate determinant.

p0029 Altogether, these findings call for revisiting the origin of glia during evolution. One emerging view is that, whereas the signalling units of the nervous system, the neurons, have evolved only once, glia, a much more plastic and adaptive cell population, have evolved several times. The analysis of glial cells and sequencing the genome of more model organisms will likely help filling the existing gaps.

References

Aigouy B, Lepelletier L and Giangrande A (2008) Glial chain migration requires pioneer cells. *Journal of Neuroscience* **28**(45): 11635–11641.

Aigouy B, Van de Bor V, Giangrande A *et al.* (2004) Time-lapse and cell ablation reveal the role of cell interactions in fly glia migration and proliferation. *Development* **131**(20): 5127–5138. AU:8

Akiyama Y, Hosoya T, Poole AM *et al.* (1996) The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**(25): 14912–14916.

Awasaki T and Ito K (2004) Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Current Biology* **14**(8): 668–677.

Awasaki T, Tatsumi R, Ito K *et al.* (2006) Essential role of the apoptotic cell engulfment genes draper and ced-6 in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Neuron* **50**(6): 855–867.

Bataillé L, Augé B, Waltzer L *et al.* (2005) Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* **132**(20): 4635–4644.

Bechmann I and Nitsch R (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* **20**(2): 145–154.

Beckervordersandforth RM, Rickert C, Technau GM *et al.* (2008) Subtypes of glial cells in the *Drosophila* embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. *Mechanisms of Development* **125**(5-6): 542–557.

Bernardoni R, Vivancos V and Giangrande A (1997) *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Developmental Biology* **191**(1): 118–130.

Berzsenyi S, Kumar A and Giangrande A (2011) Homeostatic interactions at the front of migration control the integrity and the efficiency of a migratory glial chain. *Journal of Neuroscience* **31**(39): 13722–13727.

Bromberg J (2002) Stat proteins and oncogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **109**(9): 1139–1142.

Chell JM and Brand AH (2010) Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell* **143**(7): 1161–1173.

Cohen SX, Moulin M, Müller CW *et al.* (2003) Structure of the GCM domain-DNA complex: a DNA-binding domain with a novel fold and mode of target site recognition. *EMBO Journal* **22**(8): 1835–1845.

De Iaco R, Soustelle L, Giangrande A *et al.* (2006) Huckebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. *EMBO Journal* **25**(1): 244–254.

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

Doherty J, Logan MA, Freeman MR *et al*. (2009) Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *Journal of Neuroscience* **29**(15): 4768–4781.

Dumstrei K, Wang F and Hartenstein V (2003) Role of DE-cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis, and axon tract formation in *Drosophila* larval brain development. *Journal of Neuroscience* **23**(8): 3325–3335.

Egger B, Gold KS and Brand AH (2011) Regulating the balance between symmetric and asymmetric stem cell division in the developing brain. *Fly* **5**(3): 237–241.

Flici H, Erkosar B, Giangrande A *et al*. (2011) Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia. *Development* **138**(19): 4167–4178.

Freeman MR, Delrow J, Doe CQ *et al*. (2003) Unwrapping glial biology: gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**(4): 567–580.

Fuentes-Medel Y, Logan MA, Freeman MR *et al*. (2009) Glia and muscle sculpt neuromuscular arbors by engulfing destabilized synaptic boutons and shed presynaptic debris. *PLoS Biology* **7**(8): e1000184.

Giangrande A, Murray MA, Palka J *et al*. (1993) Development and organization of glial cells in the peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **117**(3): 895–904.

Gilmour DT, Maischein HM and Nüsslein-Volhard C (2002) Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* **34**(4): 577–588.

Hashemolhosseini S and Wegner M (2004) Impacts of a new transcription factor family: mammalian GCM proteins in health and disease. *Journal of Cell Biology* **166**(6): 765–768.

Hidalgo A and Booth GE (2000) Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **127**(2): 393–402.

Hidalgo A, Kato K, Alahmed S *et al*. (2011) Trophic neuron-glia interactions and cell number adjustments in the fruit fly. *Glia* **59**(9): 1296–1303.

Hitoshi S, Ishino Y, Ikenaka K *et al*. (2011) Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active DNA demethylation and induce neural stem cells. *Nature Neuroscience* **14**(8): 957–964.

Ho MS, Chen H, Chien CT *et al*. (2009) Gcm protein degradation suppresses proliferation of glial progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**(16): 6778–6783.

Ito K, Urban J, Technau GM *et al*. (1995) Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Development Genes and Evolution* **204**(5): 284–307.

Iwasaki Y, Hosoya T, Ikenaka K *et al*. (2003) The potential to induce glial differentiation is conserved between *Drosophila* and mammalian glial cells missing genes. *Development* **130**(24): 6027–6035.

Jacobs JR (2000) The midline glia of *Drosophila:* a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Progress in Neurobiology* **62**(5): 475–508.

Jacques C, Soustelle L, Giangrande A *et al*. (2009) A novel role of the glial fate determinant glial cells missing in hematopoiesis. *International Journal of Developmental Biology* **53**(7): 1013–1022.

Jones BW (2005) Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Developmental Biology* **278**(2): 265–273.

Jones BW, Fetter RD, Goodman CS *et al*. (1995) *glial cells missing*: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**(6): 1013–1023.

Kato K, Forero MG, Hidalgo A *et al*. (2011) The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by pros-notch and pros-NFκB feedback. *PLoS Biology* **9**(8): e1001133.

Kim SU and de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research* **81**(3): 302–313.

Knoblich1 JA (2008) Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* **132**(4): 583–597.

Kurant E (2009) Keeping the CNS clear: glial phagocytic functions in *Drosophila*. *Glia* **59**(9): 1304–1311. AU:9

Lebestky T, Chang T, Banerjee U *et al*. (2000) Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**(5463): 146–149.

Lyons DA, Pogoda HM, Talbot WS *et al*. (2005) erbb3 and erbb2 are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Current Biology* **15**(6): 513–524.

MacDonald JM, Beach MG, Freeman MR *et al*. (2006) The *Drosophila* cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* **50**(6): 869–881.

Okuda T, van Deursen J, Downing JR *et al*. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**(2): 321–330.

Poeck B, Fischer S, Salecker I *et al*. (2001) Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of *Drosophila*. *Neuron* **29**(1): 99–113.

Ragone G, Bernardoni R and Giangrande A (2001) A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 6-4 T. *Developmental Biology* **235**(1): 74–85.

Reifegerste R, Schreiber J, Wegner M *et al*. (1999) mGCMa is a murine transcription factor that overrides cell fate decisions in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **82**(1-2): 141–150.

Rival T, Soustelle L, Birman S *et al*. (2004) Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the *Drosophila* brain. *Current Biology* **14**(7): 599–605.

Sepp KJ and Auld VJ (2003) Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *Journal of Neuroscience* **23**(23): 8221–8230.

Sepp KJ, Schulte J and Auld VJ (2000) Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**(2): 122–133.

Shivdasani RA, Fujiwara Y, Orkin SH *et al*. (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO Journal* **16**(13): 3965–3973.

Soustelle L and Giangrande A (2007) Glial differentiation and the Gcm pathway. *Neuron GliaBiology* **3**(1): 5–16. AU:10

Soustelle L, Jacques C, Giangrande A *et al*. (2004) Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. *Development* **31**(18): 4521–4532.

Soustelle L, Roy N, Giangrande A *et al*. (2008) Control of gcm RNA stability is necessary for proper glial cell fate acquisition. *Molecular and Cellular Neuroscience* **37**(4): 657–662.

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**(17): 3735–3743.

Vincent S, Vonesch JL and Giangrande A (1996) Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**(1): 131–139.

Von Hilchen CM, Beckervordersandforth RM, Altenhein B *et al*. (2008) Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo. *Mechanisms of Development* **125**(3-4): 337–352.

Zorick TS and Lemke G (1996) Schwann cell differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* **8**(6): 870–876.

Further Reading

Banerjee S and Bhat MA (2008) Glial ensheathment of peripheral axons in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **86**(6): 1189–1198.

Crozatier M and Vincent A (2011) *Drosophila*: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Disease Models Mechanisms* **4**(4): 439–445.

De Salvo MK, Mayer N, Bainton RJ *et al*. (2011) Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of *Drosophila*. *Glia* **59**(9): 1322–1340.

Freeman MR (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* **330**(6005): 774–778.

Hummel T, Menne T, Klämbt C *et al*. (1997) CNS midline development in *Drosophila*. *Perspectives on Developmental Neurobiology* **4**(4): 357–368.

Jones BW (2005) Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Developmental Biology* **278**(2): 265–273.

Klämbt C (2009) Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nature Reviews Neuroscience* **10**(11): 769–779.

Shepherd D (2000) Glial dependent survival of neurons in *Drosophila*. *Bioessays* **22**(5): 407–409.

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

Article Title: Glial Cells in Neural Development

Article ID: A0023740

Article doi: 10.1002/9780470015902.a0023740

Article copyright holder: John Wiley & Sons, Ltd

Version: 1.0

Previous version(s): None

Article type: Standard

Readership level: Advanced

Top level subject categories: Developmental Biology

Keywords: gliogenesis # *glide*/*gcm* # hemocytes # *Drosophila* # nervous system development # stem cells # microglia # immune system # evolution # blood–brain barrier

Key Concepts:

- Glial cells are very diversified in terms of morphology, function and gene expression profile.
- Glial cells are absolutely required for nervous system development and to support neuronal functions.
- Vertebrate and invertebrate nervous systems share many similarities.
- Glial cells are the immune cells of the *Drosophila* nervous system.
- Glial cells are very dynamic and migrate collectively over long distances.
- Most glia and neurons arise from common precursors.
- *glide*/*gcm* transcription factor represents the master gene of the glial fate in *Drosophila* acting as a genetic switch between neuron and glia.
- *glide*/*gcm* is expressed and required in *Drosophila* glia and macrophages.
- Glia and macrophages share molecular and cellular pathways.
- The *gcm* ortholog genes are not necessary in vertebrate glial development.

Glossary:

Axon#Axon is a neuronal cytoplasmic projection conducting the electrical impulses from the cell body until the synapse.

Blood–brain barrier (BBB)#The BBB isolates the CNS from nonneuronal tissues.

Central nervous system (CNS)#The CNS includes the majority of the nervous system and consists in the brain and the ventral nerve cord (spinal cord in vertebrates).

Drosophila metamorphosis#Metamorphosis is a transition phase between larval and adult animals. This involves major morphological changes during the pupal stage.

Homeodomain#The homeodomain is a helix-loop-helix DNA binding domain that defines a large and conserved family of transcription factors.

Imaginal disc#Imaginal discs consist of clusters of undifferentiated cells that are set aside during embryogenesis and proliferate during the larval life to form adult tissues at metamorphosis.

Microglia#Microglia are the resident macrophages of the vertebrate CNS. They derive from hematopoietic lineages and migrate in the CNS and so, microglia are no longer considered as glial cells.

Peripheral nervous system (PNS)#The PNS is the nervous system outside the brain and the ventral nerve cord in *Drosophila* including the sensory nerves and sensory organs.

Scavenger cell#Engulfing cells that clears debris and invading pathogens through phagocytosis.

Stem cell#Stem cells are qualified by self-renewal and pluripotency. They undergo divisions by mitosis to self-renew and can differentiate in a variable panel of specialised cells according to their potency.

Author(s) and affiliation(s): Trébuchet, Guillaume / Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; Giangrande, Angela / Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

f0001 **Figure 1** Lateral glial cell subtypes in the embryonic ventral nerve cord (VNC) In the CNS, lateral glial cell subtypes are defined according to their position (surface, neuropile and cortex). A VNC transversal section from a mature embryo is represented. Glial cells associated with the cortex (in red) are called cell body glia (CBG). They are in contact with neuronal cell bodies. Among glial cells associated with axons (in green), longitudinal glia (LG) are located on the neuropile surface whereas nerve root glia (NRG) ensheath the peripheral nerves that exit the VNC. Among the cells present on the VNC surface (in blue), subperineural glia (SPG) are located on the outer surface whereas channel glia (CG) are positioned along the dorsoventral channel between the hemineuromeres. (Adapted from Beckervordersandforth *et al.*, 2008).

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

f0002 **Figure 2** Schematic representation of a *Drosophila* developing wing. Glia (in red) and neurons originate from sensory organ precusors. In the *Drosophila* deloping wing, two vein, L1 and L3, are inervated. Only three sensory organs are gliogenic on the L3 vein (asterisk). Neurons send their axons (in blue) before the start of glial migration. Glia move as a chain along the axon bundles. They migrate proximally from their place of birth toward the CNS. After completion of migration, glia form a continous sheath around the axon bundles. Along the L1 nerve, pioneer glia, at the tip of the chain, are identified to promote migration efficiency.

f0003 **Figure 3** Glia originate from different precursors. In the embryonic CNS, two kinds of neuroglioblasts (NGBs) delaminate from the neurogenic epithelium. Type 1 NGBs divide once asymmetrically to produce one neuroblast and one glioblast , which then proliferate to produce respectively neurons and glia. In Type 2 NGBs, ganglion mother cells (GMCs) first produce only neurons. After several divisions, mixed GMCs are generated and produce both neurons and glia. In the adult PNS, neurons and glia arise from glia sensory organ precursors (SOP). The SOP divides several times to produce PIIa, PIIb, PIIIb precursors and the gliogenic precursor GP1. The GP1 gives rise to a variable number of glia. PIIa generates the tormogen (To) and the trichogen (Tr), the accessory cells of the sensory organ, whereas PIIb generates the neuron (N) and the sheath cell (Sh). Blue and red colours indicate a neurogenic and gliogenic potential, respectively. (Adapted from Soustelle and Giangrande, 2007).

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

f0004 **Figure 4** The asymmetric division of the neuroglioblast (NGB). Representation of an asymmetrically dividing type 1 NGB. To generate a glioblast (GB), *gcm* mRNA is asymmetrically distributed at metaphase. The daughter cell that inherits high amounts of *gcm* mRNA triggers the expression of genes promoting glial fate such as *repo* and becomes a GB; The GB then divides and produces glial cells. The daughter cell receiving less *gcm* mRNA becomes a neuroblast (NB). The neuroblast then divides and produces only neurons.

f0005 **Figure 5** gcm act as a molecular switch between neurons and glia. In wild type neural stem cells (NSCs), *gcm* is expressed to promote the glial fate. Mixed neuroglioblasts (NGB) produce both neurons and glia. In *gcm* deficient animals (*gcm* Loss-of-function or LOF), glia are converted into neurons. Accordingly, *gcm* ectopic expression in NSCs (*gcm* Gain-of-function or GOF) leads to extopic gliogenesis at the expense of neuronal differentiation. (Adapted from Soustelle and Giangrande (2007) and Jones BW (2005). Copyright by Cambridge University Press/Elsevier).

eLS © 2012, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

Résultats

Publication 2 :

Of Glia and Blood

I. OF GLIA AND BLOOD : RESUME DE LA PUBLICATION

I.A. Contexte scientifique général

La différenciation cellulaire implique des facteurs clés souvent conservés au cours de l'évolution. Notre équipe s'intéresse à l'un d'entre eux, le facteur de transcription Gcm. Il appartient à une famille de facteurs de transcription caractérisée par un domaine à doigt de Zinc atypique appelé le domaine Gcm.

Gcm est d'abord impliqué dans la différenciation de la glie chez la drosophile. La glie joue de nombreux rôles dans le développement du système nerveux et dans la maintenance des fonctions neurologiques. Les cellules gliales constituent aussi les cellules immunitaires du CNS. Elles proviennent essentiellement de NSCs capables de produire des neurones et de la glie. *gcm* appartient à ces gènes maîtres qui sont nécessaires et suffisants pour déterminer le destin de la cellule dans laquelle ils sont exprimés. Lorsqu'il est exprimé dans les NSCs, Gcm déclenche la gliogenèse. Chez les embryons mutants pour *gcm*, seuls des neurones sont produits. Au contraire, l'expression ectopique de Gcm dans les NSCs conduit à une gliogénèse ectopique au détriment des neurones. Gcm agit donc comme un interrupteur moléculaire entre neurones et glie.

Gcm joue également un rôle critique dans l'hématopoïèse embryonnaire. Les précurseurs des hémocytes naissent dans le mésoderme procéphalique. Ils peuvent produire deux types de cellules immunitaires : les plasmatocytes, qui jouent le rôle de macrophage circulant, et les cellules à cristaux, impliquées dans d'autres processus de défense. Gcm est impliqué dans la production des plasmatocytes et la perte de *gcm* conduit à la production de plasmatocytes non fonctionnels. D'autre part, l'expression ectopique de Gcm dans les cellules à cristaux conduit à leur conversion en plasmatocytes. A l'instar de son rôle dans la différenciation de la glie, Gcm a un rôle de pivot entre la production de plasmatocytes et de cellules à cristaux dans le système immunitaire.

La plupart des facteurs clés impliqués dans la différenciation cellulaire agissent dans plusieurs tissus. La fonction d'un facteur de transcription peut donc varier en fonction du tissu dans lequel il est exprimé. En réalité, la détermination du destin cellulaire dépend d'un réseau de facteurs de transcription qui agissent en synergie avec des cofacteurs, des enzymes et des marques épigénétiques qui modifient leurs activités. Gcm constitue le seul exemple connu à ce

jour dans lequel un gène maître est partagé entre la gliogénèse et l'hématopoïèse. Le principal aspect de ma thèse fut d'identifier d'autres facteurs clés agissant en amont ou en aval de Gcm et impliqués dans le choix entre le destin glial et hémocytaire.

Les cibles de Gcm ont été identifiées par des cribles à l'échelle du génome. Certains gènes sont exprimés à la fois dans la glie et dans les hémocytes comme *draper,* qui code pour un récepteur de la phagocytose. Cependant, *repo*, impliqué dans la différenciation terminale de la glie, est exprimé uniquement dans la glie. De la même manière, le gène codant pour le facteur de transcription Srp, de type GATA, est exprimé dans les hémocytes et ne l'est pas dans les cellules gliales. Srp joue un double rôle durant l'hématopoïèse. Avant l'expression de Gcm, Srp est requis pour la spécification des précurseurs hématopoïétiques. Ensuite, en aval de Gcm, Srp peut dimériser avec son cofacteur Ush pour promouvoir la différenciation des plasmatocytes. Comment les cibles de Gcm, Srp et Repo, sont restreintes aux lignages hémocytaires et gliaux?

I.B. Résultats

I.B.1. Caractérisation du potentiel gliogénique et hématopoïétique de Gcm

L'expression ectopique de Gcm peut activer des marqueurs gliaux ou hémocytaires. J'ai d'abord étudié si Gcm est capable d'activer des marqueurs gliaux dans les hémocytes et vice-versa. La surexpression de Gcm dans les précurseurs hématopoïétiques (*gcm* gain-de-function = *gcm* GOF) conduit à l'expression des marqueurs gliaux précoces (Repo) et tardifs (Nazgul) (**Fig. 1**). Le potentiel gliogénique de Gcm est donc conservé dans les précurseurs hématopoïétiques. De la même manière, Gcm a été ectopiquement exprimé (*gcm* GOF) dans la région neurogénique. Les embryons *gcm* GOF déclenchent une gliogénèse ectopique dans la région neurogénique ventrale tandis que les marqueurs hémocytaires Ush et Srp ne sont activés que dans très peu de cellules restreintes aux régions latérales (**Fig. 3**). Les territoires d'expression ectopique de Ush/Srp et de Repo sont alors mutuellement exclusifs. Gcm a donc un fort potentiel gliogénique et un potentiel hématopoïétique limité.

I.B.2. Rôle du dosage de Gcm et des facteurs indépendants

Les résultats provenant de la surexpression de Gcm dans les hémocytes suggèrent que la gliogénèse nécessite un niveau d'expression de Gcm plus fort que l'hématopoïèse. Pour vérifier cela, j'ai analysé plusieurs combinaisons d'allèles hypomorphes et nuls de *gcm* (*gcm* perte-de-fonction = *gcm* LOF). Aucune combinaison n'a conduit à l'expression de marqueurs hémocytaires dans la glie présomptive excluant une simple dépendance du dosage de Gcm pour l'établissement du destin glial ou hémocytaire (**Fig. S2**).

Nous avons suggéré que le potentiel gliogenique de Gcm est contrebalancé par des facteurs indépendants dans le mésoderme procéphalique. J'ai alors étudié les rôles de Srp et du déterminant mésodermal Twi dans ce processus (**Fig. 2**). 1) La surexpression de *gcm* dans le mésoderme induit de la gliogénèse ectopique. L'ajout d'une dose de Srp diminue la gliogénèse ectopique (*gcm* GOF, *srp* GOF). 2) La réduction d'une dose de Twi (*gcm* GOF, *twi* LOF) augmente la gliogénèse ectopique. 3) La surexpression de Twi dans le territoire neurogénique inhibe la gliogénèse (*gcm* GOF, *twi* GOF). Le destin hémocytaire ne dépend donc pas uniquement de la quantité absolue de Gcm et est positivement influencé par l'environnement du mésoderme.

I.B.3. Repo contribue à la répression du destin hémocytaire dans la glie.

Les données précédentes suggèrent la présence d'un répresseur du destin hémocytaire dans le CNS. *repo* est un déterminant majeur du destin glial et constitue une cible de choix. J'ai démontré que *repo* réprime le destin hémocytaire de trois façons. 1) La surexpression de *repo* dans le territoire hématopoïétique réprime les marqueurs hémocytaires précoces (Srp) et tardifs (NimC1 = P1) (*repo* GOF) (**Fig. 4**). 2) L'expression ectopique de *gcm* dirigée dans le CNS déclenche une production ectopique de Srp et Ush uniquement dans les animaux mutants pour *repo* (*gcm* GOF *repo* LOF) (**Fig. 3**). 3) Dans les animaux mutants pour *repo* (*repo LOF*), les marqueurs gliaux ne sont pas activés tandis que certaines cellules gliales présomptives expriment Srp et Ush (**Fig. 6**). Ces résultats démontrent que Repo est suffisant pour réprimer l'apparition de marqueurs hémocytaires précoces dans la glie.

J'ai ensuite étudié le mode d'action de Repo sur Srp dans les cellules en culture. Des rapporteurs transcriptionnels de *srp*, mutés ou non pour le site de fixation de Repo (RBS) ont été générés. Bien que Repo réprime *srp* dans les cellules S2, la mutation du RBS n'a pas levé cette répression (**Fig. S4**). La répression de *srp* par Repo semble donc être indirecte, cependant, nous ne pouvons exclure un mode d'action direct à travers des d'autres sites non canoniques.

I.B.4. La perte de fonction de Repo n'induit pas de phagocytes ectopiques.

La perte de *repo* induit l'expression ectopique des facteurs de transcription hémocytaires dans la glie. Pour étudier si ces hémocytes sont fonctionnels, j'ai analysé le territoire d'expression de Crq, récepteur membranaire de type CD36, qui contribue largement à leur activité de phagocytose des corps apoptotiques. Aucune expression ectopique de Crq n'a été détectée démontrant l'absence de maturité de ces cellules (**Fig. S6**).

Durant le développement embryonnaire, les cellules gliales associées au cortex jouent le rôle de macrophages dans le CNS. Il était donc intéressant d'étudier le rôle de Repo sur l'activité de phagocytose de ces cellules. De manière surprenante, Repo semble requis pour le nettoyage des corps apoptotiques par la glie car en l'absence de *repo*, le nombre de contacts entre les protrusions cytoplasmiques des CBGs et les corps apoptotiques diminue drastiquement. En outre, ces cellules n'expriment plus les récepteurs de la phagocytose Draper et SIMU. Bien qu'en l'absence de Repo des marqueurs hémocytaires précoces apparaissent dans la glie, Repo semble donc nécessaire à la maturation des cellules gliales et en particulier à leur activité macrophagique (**Fig. 5**).

I.B.5. Repo agit comme le gardien de l'identité gliale.

Suivant la perte de *repo*, seule une fraction de la glie présomptive adopte le destin hémocytaire. Ce phénotype soulève la question de la destinée des autres cellules gliales présomptives. Nous savons que les gènes pan-gliaux *repo* et *tramtrack (ttk)* agissent en synergie pour réprimer le destin neuronal lorsqu'ils sont exprimés ectopiquement dans le CNS. L'hypothèse d'une différenciation neuronale a donc été émise. Dans les embryons *repo* LOF, j'ai alors démontré que le destin hémocytaire est en compétition avec le destin neuronal (**Fig. 7**). 1)

Dans les embryons *repo* mutants (*repo* LOF), une autre fraction de la glie présomptive se différencie en neurones. 2) La perte supplémentaire de *elav* (*repo*/*elav* LOF*)*, un gène critique pour la différenciation des neurones, augmente la proportion d'hémocytes ectopiques dans la glie présomptive. 3) Dans les embryons *repo* et *ttk* double mutants (*repo*/*ttk* LOF), la proportion des neurones ectopiques augmente tandis que celle des hémocytes ectopiques diminue. Repo est donc nécessaire pour réprimer à la fois le destin hémocytaire et le destin neuronal qui sont mutuellement exclusifs.

I.C. Conclusion

En conclusion, Gcm constitue un modèle unique dans lequel un gène maître est requis à la fois pour la différenciation de la glie et des hémocytes. J'ai démontré que la cible directe de Gcm dans la glie, Repo, joue une large action pour réprimer le potentiel hématopoïétique de Gcm, le potentiel neuronal de la NSC et consolider le destin glial. J'ai donc proposé que Repo agisse comme le gardien du destin glial. Cette étude apporte un point de vue novateur sur le rôle crucial des gènes qui agissent directement en aval du gène maître déclenchant le processus de différenciation. Ce travail amène aussi de nouvelles perspectives concernant les mécanismes gouvernant la fonction immunitaire de la glie, comme par exemple, lors de la réparation du CNS suivant une blessure. Il serait intéressant d'étudier si Repo peut participer à ce processus en régulant positivement ou négativement la production de phagocytes.

Of glia and blood

Guillaume Trébuchet[1,2,3,4,]* and Angela Giangrande[1,2,3,4,]**

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France
[2]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France
[3]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France
[4]Université de Strasbourg, Illkirch, France

Keywords
Glial cells, hemocytes, Gcm, Repo, cell fate determination, *Drosophila*

***First author :**
Guillaume Trébuchet
trebuche@igbmc.fr

**** Corresponding author :**
Angela Giangrande
Phone: (33)388653381
Fax: (33)388653201
E-mail: angela@igbmc.fr

Abstract

Drosophila glia and hemocytes share the same fate determinant Glial cell deficient/Glial cell missing (Glide/Gcm) to differentiate. To get an insight into the molecular mechanisms underlying the acquisition of different identities with a single fate determinant, we investigated how the choice is regulated between the hemocyte and the glial fates. Here we firstly show that Gcm dosage is important for that choice, Gcm carrying a limited hematopoietic potential compared to its strong gliogenic potential. Then, gliogenesis being positively regulated by the neurogenic environment and negatively regulated by the mesodermal one, we show that the choice of a specific differentiation pathway is influenced by the cellular context. Finally, being necessary to consolidate and to maintain a specific fate, we highlight the key role of genes acting downstream of a fate determinant. Indeed, the homeotic genes *reversed polarity* (*repo*), a glial-specific Glide/Gcm direct target, is required to repress hemocyte and neuronal differentiation and to promote the terminal differentiation of glial cells.

Introduction

One of the most fascinating issues in biology is to understand how is cell diversity established and maintained in metazoans. Several transcription factors have been identified and found to trigger specific developmental programs, however, it has become clear that a single fate determinant can be required in several types of cells. While this strategy allows the generation of diversity with a limited number of determinants, it adds a further level of complexity in the dissection of cell-specific molecular pathways. The present challenge is therefore to unravel the impact of fate determinants in different lineages and the associated molecular networks. The genetic tool, the simple organization and the broad knowledge on its biology make *Drosophila* an exceptional model to investigate these issues *in vivo*, at cellular resolution.

Drosophila glia play multiple roles in the nervous system and control its homeostasis during development as well as in the adult. They insulate the central nervous system (CNS) upon forming the blood-brain barrier (BBB) and regulate neurotransmitter recycling, axon guidance or neural proliferation (Trébuchet and Giangrande, 2001). They also remodel the CNS through metamorphosis and in response to injury, thus acting as the resident macrophages (Kurant, 2011; Logan and Freeman, 2007). Outside the nervous system, blood cells called plasmatocytes derive from a specific mesodermal territory and later circulate in the hemolymph to phagocyte microbes and sculpt tissues during development (Meister and Lagueux, 2003). Hence, glia and blood display similar functions; in addition, they both require the Glial cells deficient/Glial cells missing transcription factor (Glide/Gcm, Gcm throughout the text, for the sake of simplicity) to differentiate (Soustelle and Giangrande, 2007a). One possibility is that the levels of Gcm discriminate between the glial and the blood fates, alternatively cell-specific molecular landscapes could be responsible for the process. These types of strategy are indeed necessary for the specification of other lineages (Bier, 1997; Prokop and Technau, 1994).

We here show that tissue-specific transcription factors and Gcm dosage are relevant to regulate the glia vs. blood fate choice. The process, however, is more complex than initially expected, likely due to the different potentials of the Gcm in gliogenesis and hematopoiesis. Gcm is necessary and sufficient to promote glial differentiation, acting as a genetic switch between neurons and glia in bipotent neural stem cells (NSC) (Akiyama et al., 1996; Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Kammerer and Giangrande, 2001; Ragone et al., 2001; Vincent et al., 1996). In

contrast, Gcm loss does not eliminate hematopoiesis and plasmatocytes are still formed from the bipotent precursors that also produce crystal cells, the second types of *Drosophila* hemocytes (Tepass et al., 1994). The mutant plasmatocytes, however, are non-functional. Thus, while Gcm plays a primary role in glia, its requirements in hemocytes seem less stringent. We therefore reasoned that the glial lineage may require a reinforcement pathway through glial-specific targets of the Gcm transcription factor. While fate determinant regulators, co-factors and dosage have been heavily investigated for their role in lineage specification, the impact of cell-specific genes acting downstream of the determinant is not well understood. Yet, these genes represent prime candidates for the maintenance of a stable fate, as they stay on throughout development and in ontogeny whereas in many cases determinants are only expressed transiently and at early stages.

Among the Gcm downstream genes, the well known direct target gene *reverse polarity* (*repo*) is restricted to glial lineages where it plays a critical role in their terminal differentiation (Halter et al., 1995; Xiong et al., 1994; Yuasa et al., 2003). We here show that Repo is sufficient to repress the hemocyte fate and that, in its absence, glial cells express hemocyte markers. Hence, Repo assists Gcm in the establishment/maintenance of the glial fate and is an active player of the molecular network that discriminates between distinct but related fates. Finally, suppressing the glial ground state induced by Repo reveals different immune potentials depending on the glial subtypes.

Our data illustrate a novel strategy allowing a single determinant to impact on different fates and generate diversity. Given the complexity of higher organism, it is very likely that this strategy is used in many other tissues and organs.

Results

Gcm conserves a strong gliogenic potential in hematopoietic lineages

Gcm is expressed and required in glia as well as in hemocytes (**Fig. S1A-H**) (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1998; Bernardoni et al., 1997; Jones et al., 1995; Lebestky et al., 2000). We therefore reasoned that, if the gliogenic and the hematopoietic fates depend on cell-specific factors, overexpression of Gcm in each territory of expression should only overactivate the fate specific to that territory. We thence expressed Gcm at high levels in the nervous system

and in the procephalic mesoderm (PM), which constitutes the hemocyte anlagen, and assessed whether glial markers can be induecd in the blood territory and viceversa.

To overexpress Gcm in the PM, we used the *gcm-Gal4* driver, which mimics the endogenous expression profile of *gcm*, and spatially restricted its action to hemocytes upon combining it with a transgene that expresses the Gal4 inhibitor Gal80 in glial cells (*repo-Gal80*) (Lee and Luo, 1999). Introducing the *UAS-CD8GFP* transgene in the *gcm-Gal4, repo-Gal80* background confirms that the GFP is detected in circulating hemocytes but excluded from glial cells (**Fig. S1I, J; Fig. 1A**). Glial differentiation was monitored by detecting Repo, a direct target of Gcm that is expressed in all glial cells but not in blood (Campbell et al., 1994; Halter et al., 1995; Jones, 2005; Xiong et al., 1994). For the sake of simplicity, we will call the "*gcm-Gal4, repo-Gal80; UAS-CD8GFP"* driver as the *gcm(hemo)* driver throughout the manuscript.

Gcm over-expression in the PM (*UAS-gcm* = *gcm* gain-of-function, *gcm* GOF) is able to induce Repo expression (**Fig. 1D-F'**), a phenotype that we quantified by RT-PCR (qRT-PCR) (**Fig. 1C**). In *gcm* GOF embryos, Repo is ectopically expressed in 20 % of the hemocytes (**Fig. 1G**). Using weak (*F18A*), strong (*M24A*) or very strong (*M24A; F18A*) *UAS-gcm* transgenes (**Fig. 1B, C**) revealed a significant correlation between the strength of *gcm* over-expression and the levels of induced *repo* transcripts. Therefore, *gcm* can activate *repo* expression in hemocytes and it does so in a dosage dependant manner. Interestingly, the cells that ectopically express Repo also express the Srp (Srp) hemocyte marker (Rehorn et al., 1996), at levels that are comparable to those found in wild type embryos (**Fig. 1L-M'**). The early expression of Srp in the PM, which even precedes that of Gcm, may explain the colocalization of Repo and Srp. We therefore used an additional, late, blood cell marker, Croquemort (Crq) (Franc et al., 1996; Franc et al., 1999), and confirmed its colocalization with Repo (**Fig. 1N, N'**). Finally, since *gcm* ectopic expression in the CNS completely and stably converts NSCs toward the glial fate (Flici et al., 2011), we labeled embryos with an antibody directed against a late glial-specific marker. The ectopic expression of Nazgul (von Hilchen et al., 2010) (strong *gcm* GOF) (**Fig. 1H-J'**) shows that *gcm* over-expression in the PM triggers advanced gliogenesis.

In sum, Gcm has a gliogenic potential in the hemocyte anlagen and the acquisition of the glial fate is not alternative to the hemocyte fate. This indicates that the cell-specific molecular environment is necessary but not sufficient to promote the fate choice.

Dosage dependency and cell-specific factors

The Gcm dosage dependent expression of Repo prompted us to ask whether glia differentiation requires higher Gcm levels than hematopoiesis in physiological conditions as well and checked whether presumptive glia express hemocyte markers in hypomorphic *gcm* embryos. The gcm^{34}mutation corresponds to an imprecise excision upon P mutagenesis on the gcm^{rA87} line (which carries a P element at the *gcm* locus) and results in low Gcm levels (Vincent et al., 1996). Neither gcm^{34} homozygous nor gcm^{34}*/Df(2L)132* transheterozygous animals (*Df(2L)132* completely deletes the gene (Kammerer and Giangrande, 2001)) show Srp ectopic expression in the ventral cord (**Fig. S2A-C**). This excludes mere dosage dependency for the establishment of glial vs. blood cell fates.

Based on these data, we hypothesized that Gcm has an autonomous gliogenic potential that is counteracted in the PM by extrinsic factors. If this were the case, increased levels of mesodermal-specific factors would prevent the ectopic gliogenesis induced by Gcm overexpression and their downregulation would induce the opposite phenotype. The basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor Twist (Twi) and the Zinc finger transcription factor Srp constitute major mesoderm and hemocyte determinants, respectively (Lebestky et al., 2000; Reuter, 1994; Thisse et al., 1988; Yin et al., 1997). Ectopic expression of Gcm throughout the mesoderm using the *twist-Gal4* (*twi-Gal4*) driver (Baylies and Bate, 1996) (**Fig. 2E**) induces ectopic gliogenesis. Co-expressing Gcm and Srp in that territory indeed reduces ectopic gliogenesis, as revealed by a decrease of Repo and Nazgul expression (**Fig. 2A-D**). Along the same line, ectopically expressing Gcm in embryos that miss one dose of Twi enhances the number of ectopic glial cells (**Fig. 2F, G**). Moreover, co-overexpressing Gcm and Twi using the *gcm(hemo)* driver completely abolishes ectopic *repo* expression (**Fig. 2H**). Thus, factors that are specifically expressed in the mesoderm inhibit the expression of Repo in that territory. Interestingly, the ectopic expression of Twi throughout the neurogenic regions induced by the *scrabrous-Gal4* (*sca-Gal4*) driver (Mlodzik et al., 1990), is sufficient to reduce the expression of endogenous Repo (**Fig. 2I-K**). Thus, the blood cell fate is positively influenced by the mesodermal environment and the glial fate can be negatively influenced by that environment.

Since the *repo* promoter contains four E boxes corresponding to putative Twi binding sites (TBSs) (**Fig. S3A**), of whom three are well conserved between twelve *Drosophila* species, and since Twi can act as a repressor (Wong et al., 2008), we investigated whether Twi directly

represses *repo*. If that were the case, the mutation of those site would allow Repo expression in the PM, the hemocyte anlagen. We generated transgenic lines carrying a *repo* transcriptional reporter transgese that expresses the GFP under the control of a 0.7 kb *repo* promoter, which contains wild-type or mutated TBSs. At least two lines were analyzed for each construct, so as to avoid possible positional effects. TBSs' mutagenesis does not lead to ectopic activation of the *repo* promoter in the PM (**Fig. S3B-E**), calling for an indirect role of Twi. Interestingly, the mutation of the E boxes leads to a striking decrease of GFP expression in glial cells, thus revealing the existence of a bHLH co-activator directly required for *repo* expression in the nervous system.

We next asked whether Gcm has hematopoietic potential in the CNS. Although it is known that Gcm ectopic expression driven by a heat shock promoter leads to an increased number of hemocytes closely associated to the ventral nerve cord (VNC), the origin of these ectopic hemocytes is not known (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997; Lebestky et al., 2000). We used the "*sca-Gal4*, *UAS-CD8GFP"* line and, as a control for Gcm activity, we followed the induction of ectopic gliogenesis using the Repo antibody. In these conditions, the Srp and Ush early hemocyte markers are induced in a very limited manner and are confined to the most lateral part of the neuroectoderm (**Fig. 3A-F'**). Again, the levels of Gcm ectopic expression correlate with the number of cells expressing Srp (**Fig. 3M**) or Ush ectopically (**Fig. 3N**). Interestingly, while Repo and Srp can colocalize when Gcm is ectopically expressed in the PM, very few cells expressing Srp and Ush ectopically also express Repo when Gcm is induced throughout the ventral cord (**Fig. 2A-F'**).

Thus, Gcm has a limited hematopoietic potential in the nervous system and the two cell fates (glia and blood) are almost exclusive in this territory.

repo is sufficient to repress hemocyte markers

The above data strongly suggest that in the VNC the glial fate dominates over the blood fate via cell-specific factors that repress hemocyte-specific genes. The most likely candidates are the pan-glial genes. Amongst them, the glial-specific homeodomain protein Repo represents a major gliogenic factor (Halter et al., 1995; Soustelle et al., 2002; Yuasa et al., 2003). The other panglial transcription factor, the BTB/POZ protein Tramtrack69 (Ttk69) (Bonchuk et al., 2011;

Harrison and Travers, 1990) is also expressed in hemocyte precursors (BDGP expression data: LD28689) and hence unlikely represses that fate.

First, we asked whether eliminating Repo facilitates the differentiation of ectopic blood cells in the nervous system. We analyzed Ush and Srp ectopic expression in *repo* null embryos (*repo* loss-of-function, *repo* LOF) that overexpress Gcm in the neurogenic region (weak *gcm* GOF). To follow the presumptive glial cells, we used the *repo-nuclearGFP* (*repo-nGFP*) transgene in which the GFP expression profile recapitulates the complete *repo* expression pattern (Jones, 2005; Laneve et al., 2012). Clearly, both Srp (**Fig. 3G-I'**) and Ush (**Fig. 3J-L'**) ectopic expressions are increased in these conditions and we quantified the number of presumptive glial cells ectopically expressing them (GFP/Srp or GFP/Ush double positive cells) (**Fig. 3O, P**). Thus, Repo represses two key hemocyte transcription factors in ectopic glial cells, indicating that Gcm does have a hematopoietic potential in the neuroectoderm.

Second, we asked whether Repo is sufficient to inhibit hemocyte differentiation by ectopically expressing it in hemocyte precursors using the *UAS-repo* transgene (Yuasa et al., 2003) driven by the *gcm*(*hemo*) driver (**Fig. 4** *repo* GOF)). In these embryos, hemocytes aggregate and their morphology and migration are obviously altered (**Fig. 4B, D, F, G**). We monitored the expression of early (Srp) and late (P1) (Kurucz et al., 2007) hemocyte markers and found that they are both severely down-regulated (**Fig. 4A-G'**). Srp is also expressed in the fat body, and such expression remains unchanged in the *repo* GOF animals (Hoshizaki et al., 1994) (**Fig. 4A, C**) showing that the hemocyte defects are specific and direct. Moreover, the presumptive hemocytes that still express Srp, do so at lower levels than wild-type hemocytes (see the 7 fold decrease of Srp labeling intensity in hemocytes (**Fig. 4E**).

Altogether, these data strongly suggest that Repo is sufficient to block hemocyte differentiation.

The *repo* LOF and GOF phenotypes prompted us to question the mode of action of Repo: how does it repress Srp expression? First we asked whether Repo represses Srp expression directly by using the transcriptional reporter *srp(hemo)-Gal4*, *UAS-CD8GFP*, which recapitulates the Srp expression profile in hemocytes *in vivo* (Bruckner et al., 2004) (**Fig. 4H, I**). The *psrp(hemo)-Gal4* and the *pUAST-GFP* plasmids were co-transfected in *Drosophila* S2 cells with increasing amounts of either the *pPac5C* construct (*Actin5C* promoter) constitutively expressing Repo (*actin5C* promoter) (Yuasa et al., 2003) or the *pPac5C* empty plasmid. Western blot

analyses revealed a significant correlation between the amounts of Repo and the reduced expression of the *srp* reporter (**Fig. 4J**). Thus, Repo represses *srp* transcription *in vitro*. We then asked whether Repo represses *srp* directly and mutagenized the only canonical Repo binding site CAATTA (Halter et al., 1995) carried by the *psrp(hemo)-Gal4* plasmid (**Fig. 4H; Fig. S4A**). Co-transfecting the Repo expression vector and the *psrp(hemo)-Gal4* or the *psrp(hemo)-Gal4ΔRBS* plasmid (**Fig. 4J**) triggers similar repression of the wild type and of the mutated constructs, indicating that, although Repo can repress *srp in vivo* and *in vitro*, its mode of action is likely to be indirect.

Repo is necessary to repress hemocyte transcription factors in glial cells

Given the Repo gain of function phenotype in the PM, we asked whether this factor also represses the hemocyte fate during glial cell development. To this purpose, we characterized the *repo* LOF phenotype in embryos that also carry the nuclear glial tracer *repo-nGFP*. First, the number of cells expressing the GFP is reduced by 30 % (**Fig. 5A**), due to decreased proliferation and to apoptosis (**Fig. 5B, C**). Glial death was scored upon labeling with anti-CM1, a nuclear marker that recognizes the activated Caspase-3 (Kurant et al., 2008; Shklyar et al., 2013) and anti-GFP (**Fig. 5D-H**). Second, early and late glial cell markers as Prospero, SP2637 and Nazgul (Choksi et al., 2006; von Hilchen et al., 2013; von Hilchen et al., 2010) are down-regulated (**Fig. S5A-F**).

In *repo* LOF embryos, the Draper and SIMU phagocytosis receptors that mediate clearing of neuronal apoptotic bodies (Doherty et al., 2009; Freeman et al., 2003; MacDonald et al., 2006) are also downregulated (**Fig. 5I-L**). In wild-type embryos, glial cell membranes completely enwrap apoptotic bodies, whereas in *repo* LOF embryos, these contacts are no longer established (**Fig. 5M-Q**), which we investigated by using the anti-CM1 antibody in mutant embryos that express a membrane-tethered *GFP* in glial cells (*repo-Gal4, UAS-CD8GFP)*. Thus, Repo affects several glial features, including their phagocytic potential.

Finally, we asked whether Repo represses the expression of hemocyte transcription factors during gliogenesis (**Fig. 6**). In *repo* LOF *repo-nGFP* embryos, 6 % of the presumptive glial cells express Srp and 30 % express Ush ectopically (**Fig. 6D-K** GFP/Srp and GFP/Ush double positive cells), revealing for the first time an hematopoietic potential in *Drosophila* embryonic glial cells. We then asked whether the fraction of glia displaying that potential

correspond to a specific subtype or whether it corresponds to random distribution. For this analysis, we subdivided the VNC in two parts along the Z axis: the ventral part, which contains cortex and surface associated glial cells, and the dorsal part, which mainly contains axon-associated glial cells (Ito et al., 1995) (**Fig. 6A-C'**). Co-labelling with anti-GFP and anti-Fas2, which in the VNC recognizes the three longitudinal fascicles (Santos et al., 2007) revealed that the dorsally located glial cells are those that express the hemocyte transcription factors in *repo* LOF embryos (**Fig. 6L, M**). Similar reuslts were obtained with a second neuronal marker, anti-HRP (**Fig. 6N, I**).

In order to determine whether glial cells were converted into mature hemocytes, we monitored for the expression of the hemocyte-specific phagocytosis receptor Croquemort (Crq) (Franc et al., 1999). However, none of the presumptive glial cells ectopically express this protein (**Fig. S6**), showing that *repo* LOF does not lead to the conversion of glial cells into mature and functional hemocytes.

In sum, Repo maintains glial identity and represses the expression of early hemocyte markers in specific glial cell populations.

Repo acts as the guardian of the glial fate

The *repo* LOF phenotype prompts us to question what happens in glial populations that do not express hemocyte features upon Repo loss?

As for the destiny and potential of the different glial cells, it is known that Repo can induce gliogenesis and inhibit the neuronal fate synergistically with Ttk69 when ectopically expressed in the neurogenic region (Giesen et al., 1997; Yuasa et al., 2003). We therefore asked whether Repo and/or Ttk69 also contribute to repress the neuronal fate during normal glial development. The Embryonic lethal abnormal vision (Elav) protein is specifically expressed in neurons of late wild-type embryos (**Fig. 7A, C**) (Berger et al., 2007; Yao and White, 1991). In *repo* LOF embryos, 20 % of the presumptive glial cells express Elav ectopically. This takes place both in the dorsal and the ventral parts of the VNC (**Fig. 7B, D**) and these cells do not co-express hemocyte markers (**data not shown**). In contrast, loss of the *ttk* gene (Xiong and Montell, 1993) does not on its own induce ectopic Elav labeling (**Fig. 7K**). Thus, the different glial populations have specific and alternative neuronal or hematopoietic potentials, which are both repressed by

Repo. Since Ttk69 alone has no effect and since it is expressed in all glia and hemocytes (BDGP expression data: LD28689), we reasoned that it may cooperate with Repo in the repression of the neuronal fate. Hence, we characterized *repo*, *ttk* double mutant embryos (*repo*, *ttk* LOF) and found that the number of presumptive glial cells decreases by 68 % compared to that observed in wild-type embryos (**Fig. S7**) whereas the percentage of ectopic neurons increase to 90 % (**Fig. 7K**) and that of ectopic hemocyte-like cells decreases compared to that observed in *repo* LOF embryos (1 % in *repo*, *ttk* LOF embryos; 6 % observed in *repo* LOF embryos) (**Fig. 7L**). Thus, Ttk69 contributes to repress neuronal differentiation by controlling the choice between the hemocyte and the neuronal fates in the embryos that do not express Repo.

Finally, we asked whether the hemocyte and the neuronal fates compete in *repo* LOF embryos by using the *elav* mutation (*elav* LOF), which affects neuronal differentiation (Robinow et al., 1988). In *elav; repo* LOF double mutant embryos, twice as many ectopic hemocytes were detected compared to those observed in *repo* LOF embryos (12 % of the presumptive glial cells; **Fig. 7L, Fig. S7**). Of note, removing Elav on its own does not have any effect.

In sum, Repo contributes to repress the neuronal and the hemocyte fates, which are mutually exclusive, hence performing a broad action to maintain the glial fate. Ttk69 contributes to repress the neuronal fate and Elav to induce it. Thus, the maintenance of the glial fate lays on a network of cell-specific factors of which Repo is a major orchestrator.

Repo does not repress the hemocyte-specific transcription factors after embryogenesis

Since Repo represses Srp expression in the embryo, we asked whether its inhibitory role in hematopoiesis is maintained at later stages. During pupal development, glial cells differentiate in the wing disc from sensory organ precursor cells (Giangrande et al., 1993) and line the two major nerves called L1 and L3. Because of *repo* embryonic lethality, a conditional knock-down (*repo* KD) was obtained upon crossing *UAS-repoRNAi* (Mummery-Widmer et al., 2009) and *repo-Gal4/UAS-GFP/tubulin-Gal80ts* flies (Lee and Luo, 1999). The ubiquitous expression of the thermosensitive Gal80 (Gal80ts) repressor allowed us to affect Repo after embryogenesis. White pupae (0 h after puparium formation (APF)) were shifted to the restrictive temperature (29°C) and wings were dissected at 24 h APF, when the full array of glial cells have differentiated (Aigouy et al., 2004a). To follow the presumptive glia and the down-regulation of Repo expression, we used anti-GFP and the anti-Repo antibodies, respectively. Although Repo is

severely down-regulated, no ectopic Srp was detected (**Fig. S8**). These data indicate that Repo is not able to repress Srp during post-embryonic development of peripheral glia. Because this glial subtype may not have a hematopoietic potential, we asked whether Repo represses Srp in the adult brains. These conditions also have the advantage that Gcm is no longer expressed by this stage. The conditional *repo* KD animals were let eclose then shifted at the restrictive temperature for one day. We could not detect any ectopic expression of Srp either, suggesting that *repo* represses Srp in a developmental context.

Discussion and perspectives

During development, key transcription factors are necessary to trigger, implement and maintain specific fates. Most of them, however, act in multiple lineages and cell-specific co-factors have been shown to discriminate between the different cell types. The *Drosophila* Gcm Zinc finger protein, for example, controls gliogenesis and hematopoiesis. We here show that Repo, a homeodomain transcription factor and a glial-specific target of Gcm, plays an active role in the fate choice between glia and blood. This highlights a novel strategy whereby a gene acting downstream to the fate determinant integrates cues from the environment and from the determinant itself to stably implement a specific cell identify.

Repo acts as the guardian of the glial fate

In most cases, fate specification depends on complex gene networks including multiple families of transcription factors and co-factors that control the expression/activity of the determinant (Furlong, 2004). For example, GATA transcription factors regulate the development of hematopoietic, neural, cardiac or reproductive tissues (Cantor and Orkin, 2005; Chlon and Crispino, 2012; Zaytouni et al., 2011). These factors interact with their dedicated Friend-of-GATA (FOG) co-factors, which modify the transcriptional regulation of their target genes, according to the tissue of expression (Cantor and Orkin, 2005). Fate determinants can also induce different fates according to their levels. For example, the nuclear gradient of Dorsal divides the gastrulating embryo into three main domains along the D/V axis (mesoderm, neuroectoderm and non-neural ectoderm) (Bier, 1997). After gastrulation, Twi differential expression throughout the mesoderm leads to mesoderm patterning (Baylies and Bate, 1996). A point that still remains

poorly understood is the role of downstream genes. While these genes are not required in the initial steps, they constitute ideal candidates for the consolidation of specific fates.

The *Drosophila* transcription factor Gcm is expressed and required for the differentiation of glia and blood, two cell types that act as scavengers within and outside the nervous system, hence sharing functional features The present study shows that both co-factors and gene dosage are at work in the differentiation of these two cell populations. First, two master transcription factors expressed upstream of Gcm in the PM, Twi and Srp (Baylies and Bate, 1996; Rehorn et al., 1996), promote hematopoiesis and inhibit the expression of the glial-specific gene *repo* in that territory (**Fig. 4K**). Second, Gcm levels must be tightly controlled to avoid gliogenesis in the hemocyte anlagen. In addition to these two processes, however, cell specification relies on a further level of regulation that depends on a Gcm target. The Repo glial-specific homeodomain containing transcription factor ensures the establishment of a stable glial fate in the ventral cord by repressing the hematopoietic potential of Gcm (**Fig. 7M**). To our knowledge, this is the first evidence for a molecule downstream of a determinant acting in lineage specification.

We propose that the different requirement of Gcm in blood and in glial cell specification accounts for the importance of Repo. The hemocyte fate is established by the expression of the Srp transcription factor whereas *gcm* is required for the production of functional and mature hemocytes (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997). In contrast, the glial fate strictly relies on Gcm, the only factor that is by itself necessary and sufficient to efficiently induce gliogenesis (Bernardoni et al., 1998; Flici et al., 2011; Jones et al., 1995; Soustelle et al., 2008b; Vincent et al., 1996). In line with the view that Gcm has a stronger impact on glia than on blood is the fact that the two fates can co-exist in the PM but rarely can do so in the neurogenic region. Thus, Repo maintains the glial fate (Flici et al., 2014) and assists in the discrimination between distinct but related lineages (see below).

Another transcription factor downstream to Gcm, Ttk69, is required for both glial and hemocyte fates. While Ttk69 does not display a mutant phenotype on its own, the number of ectopic neurons dramatically increases in *repo/ttk* double mutant embryos compared to that observed in *repo* simple mutant embryos. Thus, Repo promotes terminal glial cell differentiation, while repressing the hemocyte and the neuronal fates, the latter process being further supported by Ttk69.

Finally, the fate determinant works in a molecular network, in concert with its upstream and downstream genes in reinforcement loops that stabilize the different fates. HLH proneural proteins promote gliogenesis by controlling the expression of Gcm expression (Giangrande, 1995) and likely that of Repo as well, since mutating the consensus motifs for the proneural genes in the *repo* promoter severely affects it expression. Repo feeds back positively onto Gcm expression and remains expressed when the transient expression of Gcm has faded away. In the hemocyte anlagen, Repo expression is negatively controlled by the mesosdermal bHLH Twi protein. In that tissue, Srp is a target of Gcm and stays on in the mature hemocytes once Gcm is no longer detected either.

Altogether, our work sheds a new light on the mechanisms underlying lineage specification. While fate determinants have been regarded as master genes, they represent versatile tools that can also accomplish less primary functions during development. This enlarges the molecular arsenal that triggers a large variety of cell types with a relatively limited number of transcription factors.

Lack of Repo triggers different phenotypes in distinct glial subtypes

The glial cells of the embryonic VNC are subdivided in three main subtypes according to their morphology, position (surface, cortex and neuropile) (**Fig. 6A**) and function. Accordingly, they also differ by the combination of expressed markers (Beckervordersandforth et al., 2008; Ito et al., 1995). Glial cells associated to the CNS surface are large and flattened cells forming the BBB that isolates the nervous system from non-neuronal tissues (Auld et al., 1995). Glial cells located in the cortex are star-shaped and intermingle between neuronal bodies, their cytoplasmic projections contacting multiple synapses (Freeman et al., 2003). Finally, glial cells associated to the neuropile enwrap axons in a multi-layer sheath promoting the conduction of nerve impulses (Hidalgo and Booth, 2000; Sepp and Auld, 2003; Sepp et al., 2000). Thus, all glial cells express Repo, which provides a ground glial state, and respond to intrinsic and/or extrinsic cues to differentiate in distinct subtypes. It is unlikely that these cues are strictly lineage related, since, for example, neuropile glia are produced by different precursors. Subtype specification may arise through different mechanisms, including feed-forward loops controlled by temporal genes (Baumgardt et al., 2009; Baumgardt et al., 2007), positional cues or subtype-specific factors (De Iaco et al., 2006). Recent ChIP data reveal that Repo may contribute to the process as well as it

can directly activate subtype specific genes such as the Glutamine Synthetase 2 (GS2), which is expressed in neuropile glia (Kerr et al., 2014). Finally, the present work shows that *repo* mutant embryos fail to activate terminal differentiation markers such as Nazgul and Pros in neuropile glia, SP2637 in surface glia and the phagocytosis receptors Draper and SIMU in cortex glia.

Regardless of whether autonomous or non-autonomous mechanisms trigger glial subtype specification, the *repo* mutant phenotypes reveal rather different potentials. Axon-associated (or neuropile) glia are more prone to express hemocyte transcription factors than other glial subtypes. Although no macrophagic activity has been so far identified in these embryonic cells, it is worth recalling that in the adult *Drosophila* brain, axons associated glia phagocyte degenerating axons after brain injury (Doherty et al., 2009). In addition, after puparium formation, axon-associated glia of the mushroom body cooperate with cortex glia to control ecdysone-dependent axons pruning (Awasaki and Ito, 2004; Boulanger and Dura, 2014; Hakim et al., 2014). Hence, this type of glia displays a key role in response to developmental signals and to trauma. The expression of hemocyte transcription factors in embryonic neuropile glia lacking *repo* suggested that Repo could negatively regulate the immune function of these cells. However, the conditional KD of *repo* after embryogenesis does not lead to any glial cell conversion into hemocytes excluding this possibility. The phenotype observed during embryonic gliogenesis is likely a developmental phenotype which requires Gcm to activate the expression of hemocyte transcription factors.

In the embryonic CNS, several neurons undergo cell death, and their debris are cleared by glial cells that act as the resident macrophages (Kurant et al., 2008). This duty is mostly accomplished by cortex glia which express the phagocytosis receptors SIMU and Draper (Freeman et al., 2003; Shklyar et al., 2013). In *repo* mutant embryos, cortex glia are unable to phagocyte apoptotic bodies and downregulate the expression of SIMU and Draper. Moreover, ChIP experiment identified *simu* as a putative Repo direct target gene (Kerr et al., 2014). Altogether, these data clearly show the key of Repo for the macrophagic ability of cortex glia.

Of flies and vertebrates…

Drosophila and vertebrate glial cells share numerous functions controlling neuron homeostasis, recycling neurotransmitters and insulating axons (Freeman and Doherty, 2006). In sharp contrast, the transcriptional program triggering the first steps of gliogenesis is not evolutionarily conserved. In *Drosophila*, the Gcm transcription factor constitutes the major

regulatory gene and acts as a binary switch between neuron and glial cells. Although Gcm orthologs seem to conserve some amount of gliogenic potential (Buzanska et al., 2001; Iwasaki et al., 2003; Kim et al., 1998; Reifegerste et al., 1999; Soustelle et al., 2007), no equivalent molecular switch has been identified in vertebrates (Hitoshi et al., 2011). Moreover, vertebrate glial cells do not share the pan-glial transcription factors Repo and Ttk (Wakamatsu, 2004). These findings raise the question of the evolutionary link between vertebrate and *Drosophila* gliogenesis (Hartline, 2011).

While the hypothesis of an independent origin of vertebrate and invertebrate glia remains to be tested, the analysis of vertebrate and invertebrate glia has tremendously improved our understanding of the bases of nervous system regeneration. *Drosophila* glia indeed constitute an excellent model to investigate the mechanisms governing CNS repair following traumatic injury (Kato et al., 2011; Leyssen and Hassan, 2007). In this contest, and in light of recent data showing that mature astrocytes and oligodendrocytes can be reprogrammed into functional neurons to promote CNS regeneration (Guo et al., 2014; Heinrich et al., 2010; Su et al., 2014), it will also be interesting to study whether the loss of Repo and/or Ttk triggers glial cell conversion into neurons in the adult *Drosophila* injured CNS.

Materials and Methods

Flies and Genotypes

Flies were kept at 25 °C. w^{1118} was used as a control. *repo-nGFP* was used to drive nuclear GFP expression under the control of the 4.3 kb *repo* promoter, which recapitulates the full *repo* expression pattern (Jones, 2005; Laneve et al., 2012). gcm^{rA87} (Vincent et al., 1996) and gcm^{34} (Bernardoni et al., 1999) were used as *gcm* hypomorphic alleles carrying a *lacZ* insertion. The *Df(2L)132* (Kammerer and Giangrande, 2001) deletes the *gcm* locus and was used as a mutant null allele. $repo^{52}$, $repo^{84}$ (Halter et al., 1995; Xiong et al., 1994), twi^{1} (Castanon et al., 2001), $elav^{4}$ and ttk^{1e11} (Bloomington stock Center) are null alleles.

The *UAS/Gal4* system allowed cell-specific manipulation of gene expression. *srp(hemo)-Gal4* triggers expression in hemocytes (Bruckner et al., 2004), *sca-Gal4* throughout the neurogenic region (Bloomington stock Center), *twi-Gal4* (Baylies and Bate, 1996) throughout the mesoderm and *gcm-Gal4* (Soustelle and Giangrande, 2007b) combined to *repo-Gal80* (kindly

provided by B. Altenheim) throughout the hemocyte anlagen. *tubulin-Gal80ts* was used to temporally control Gal4 expression (Lee and Luo, 1999). Finally, *repo-Gal4* was used to drive gene expression in glial cells (Lee and Jones, 2005).

The following transgenes were also used: *UAS-mCD8GFP* (targeting GFP expression to the membrane), *UAS-GFP (*Bloomington Center); *UAS-srpNC* (Waltzer et al., 2002); *UAS-repo* (Yuasa et al., 2003); *UAS-repoRNAi* (VDRC stock center: $repo^{GD4145}$); *UAS-twi* (Baylies and Bate, 1996)*; UAS-gcm(F18A)* (one *UAS-gcm* transgene = weak *gcm* over-expression), *UAS-gcm(RS1)* (one *UAS-gcm* transgene = medium *gcm* over-expression) and *UAS-gcm(M24A)* (two *UAS-gcm* transgenes = strong *gcm* over-expression) (Bernardoni et al., 1998). The combination of *UAS-gcm(M24A)* and *UAS-gcm(F18A)* provided a very strong *gcm* overexpression.

The lines carrying the transgenes *repo(0.7kb)-nGFP* et *repo(0.7kbΔTBS)-nGFP* were obtained by classical germline transformation (Rubin and Spradling, 1982).

Immunohistochemistry

Egg collections were done on yeasted apple juice agar plates. Dechorionated embryos were fixed by incubation in 4% formaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized with 0.3 % Triton-x100, blocked by 0.5% Blocking Reagent (Roche) in PBS-T for 1 h and labeled overnight at 4 ^{o}C with the following antibodies: rabbit anti-Repo (1/10) and rat anti-Elav (1/200) (DHSB); guinea pig anti-Repo (1/1000), guinea pig anti-Nazgul, (1/200) and rabbit anti-SP2637 (1/500) (kindly provided by B. Altenhein) (von Hilchen et al., 2010); rabbit anti-Draper (kindly provided by M. Logan) (Logan et al., 2012); rabbit anti-SIMU (1/500) (kindly provided by E. Kurant) (Kurant et al., 2008); mouse anti-Ush (1/1000) (made in IGBMC) (Cubadda et al., 1997); rabbit anti-Srp (1/1000) (kindly provided by R. Reuter) (Petersen et al., 1999; Sam et al., 1996); mouse anti-P1 (1/10) (kindly provided by E. Kurucz) (Kurucz et al., 2007); rabbit anti-Crq (1/500) (kindly provided by J.L Dimarcq and J. Hoffmann) (Franc et al., 1996); mouse anti-Fas2 (1/100) (kindly provided by C.S. Goodman) (Grenningloh et al., 1991); rabbit anti-HRP (1/500) and rabbit anti-βGal (1/500) (Cappel); rabbit anti-CM1 (1/500) and chicken anti-GFP (1/1000) (Abcam); mouse anti-βGal (1/200) (Sigma); anti-PH3 (Ser10) (1/500) (Cell signalling).

The secondary antibodies were FITC-, Cy3 or Cy5 conjugated (1/400, Jackson). Images were taken with the SP2 Leica confocal microscope and processed using ImageJ, Adobe Photoshop CS5 and Adobe Illustrator CS5. For the measurement of Srp staining intensity per

hemocyte, embryos were scanned over 40 μm with space of 0.5 μm between each section. For each hemocyte, Srp staining intensity was measured with the same surface of selection and on the section characterized by the brightest Srp staining.

Wings dissection and immunolabeling were performed as described previously (Aigouy et al., 2008; Aigouy et al., 2004b; Soustelle et al., 2008).

Molecular cloning and directed mutagenesis

In order to build the mutated *psrp(hemo)-Gal4ΔRBS* plasmid, the PCR product containing the mutated Repo binding site was amplified in several steps from the plasmid *psrp(hemo)-Gal4* (kindly provided by K. Bruckner) using the following oligonucleotides:

5' GAGAGGTACCCAGCGGGAGCAACAGGATC 3'

5' CAGTTTCTCAGCCAGCCCCCCATAAGCCACCATCAG 3'

5' GTCAAAGAGTCGGTCGGGGGGTATTCGGTGGTAGTC 3'

5' GAGAGGTACCTATGGGATCCGTGCTGGGG 3'

The mutated PCR product was cloned into the *psrp(hemo)-Gal4* plasmid between the KpnI restriction sites, thus replacing the wild-type fragment.

In order to build the *repo(0.7kb)-nGFP* plasmid, a fragment of the *repo* promoter was amplified by PCR from genomic DNA using the following oligonucleotides:

5' GAGAGGTACCGAAATATTTTCATATGGGTTTTTTAAG 3'

5' GAGAGCTAGCCACTATATTTCCATATGCACTTATGTATG 3'

The PCR product was then cloned into the *pH-Stinger* (Barolo et al., 2004) vector between Nhe1 and Kpn1 restriction sites.

In order to build the mutated *repo(0.7kbΔTBS)-nGFP* plasmid, the PCR product containing the mutated TBSs was amplified in several steps from the *repo(0.7kb)-nGFP* plasmid using the following oligonucleotides:

5' GAGAGGTACCGAAATATTTTCAAAAAGGTTTTTTAAG 3'

5' CGATTGCAATGCCCACATAATTCGGCAGC 3'

5' GCTGCCGAATTATGTGGGCATTGCAATCG 3'

5' GTTCGTCCAACAAAAATGACGATGAAG 3'

5' CTTCATCGTCATTTTTGTTGGACGAAC 3'

5' GAGAGCTAGCCACTATATTTCTTTTTGCACTTATGTATG 3'

The PCR product was then cloned into the *pH-Stinger* vector between Nhe1 and Kpn1 restriction sites.

Co-transfection assay

Drosophila S2 cells were grown in Schneider medium (Fisher Scientific) complemented with 10% heat inactivated Foetal Calf Serum and 0.5% Penicillin/Streptomicine. 6 x 10^6 cells were cultured in six well culture dish 12 h prior transfection. 5 µg of total plasmid mix were transfected using the Effectene Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The *psrp(hemo)-Gal4* plasmid provided as a *srp* transcriptional reporter (Bruckner et al., 2004) upon using the *pUAS-GFP* plasmid to indirectly monitor Gal4 expression. The *pPac5C-repo* plasmid was used for Repo expression (Yuasa et al., 2003) and *pPac5C-lacZ* as a transfection control. The *pPac5C* plasmid was used to equilibrate the amount of transfected DNA. Cells were harvested 24 h after transfection in Tris-HCl 25 mM pH 7.9, 400 mM KCl, 10 % glycerol and total proteins were extracted by three freezing-thawing steps. Protein expression was detected from protein lysate according to standard Western Blot procedure. The following primary antibodies were used: mouse anti-βGal (1/2500, Sigma), rabbit anti-GFP (1/5000, Molecular Probes), mouse anti-Repo (1/20, DHSB). Mouse anti-HRP and rabbit anti-HRP (1/5000, Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies.

Reverse Transcription and qRT-PCR

Total RNA was purified from stage 5-11 embryos by TriReagent (MRC). 1 µg of purified RNA was reverse transcribed by SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen) using oligodT primers (5 µM). mRNAs were analyzed by quantitative PCR (qPCR) using Syber Green (Roche) Master mix, the machine Roche LightCycler480 and the following oligonucleotides :

repo forward : 5' AAGCAGCAGCAAGAAGAAGG 3'

repo reverse : 5' ATACGGAGCACGTTCAAAGG 3'

actin5C forward : 5' GCAGCAACTTCTTCGTCACA 3'

actin5C reverse : 5' CTTAGCTCAGCCTCGCCACT 3'

For each gene, the mRNA levels were automatically calculated (LightCycler480 Software, release 1.5.0) by calibration to gene-specific standard curves generated on input

cDNAs. Collected values, derived from three amplification reactions, each performed in three independent experiments, were normalized to *actin5C* mRNA amounts.

Statistics

All the experiments were performed in at least three biological replicates. Statistical relevance was assigned calculating means, standard errors and analyzed using the Student's T-test (* = $p > 0.05$; ** = $p > 0.01$; *** = $p > 0.005$).

Acknowledgments

We thank B. Altenheim, K. Brückner, M. Crozatier, L. Waltzer, M. Logan, E. Kurant, R. Reuter, E. Kurucz, J.L Dimarcq, J. Hoffmann, C.S. Goodman, the DHSB and the Bloomington Stock Center for reagents and flies. We thank C. Diebold, C. Delaporte, M. Pezze and fly, imaging and antibody facilities for technical assistance. Work was supported by INSERM, CNRS, UDS, LabEX, Hôpital de Strasbourg, ARC, INCA and ANR. Guillaume Trébuchet was funded by the French governmental PhD fellowship MRT and by La Ligue contre le Cancer.

References

Aigouy, B., Lepelletier, L., and Giangrande, A. (2008). Glial chain migration requires pioneer cells. J Neurosci *28*, 11635-11641.

Aigouy, B., Van de Bor, V., Boeglin, M., and Giangrande, A. (2004a). Time-lapse and cell ablation reveal the role of cell interactions in fly glia migration and proliferation. Development *131*, 5127-5138.

Aigouy, B., Van de Bor, V., Boeglin, M., and Giangrande, A. (2004b). Time-lapse and cell ablation reveal the role of cell interactions in fly glia migration and proliferation. Development *131*, 5127-5138.

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*, 14912-14916.

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

Auld, V.J., Fetter, R.D., Broadie, K., and Goodman, C.S. (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in Drosophila. Cell *81*, 757-767.
Awasaki, T., and Ito, K. (2004). Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during Drosophila metamorphosis. Curr Biol *14*, 668-677.
Barolo, S., Castro, B., and Posakony, J.W. (2004). New Drosophila transgenic reporters: insulated P-element vectors expressing fast-maturing RFP. BioTechniques *36*, 436-440, 442.
Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Diaz-Benjumea, F.J., and Thor, S. (2009). Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. Cell *139*, 969-982.
Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., and Thor, S. (2007). Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. PLoS Biol *5*, e37.
Baylies, M.K., and Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in Drosophila. Science *272*, 1481-1484.
Beckervordersandforth, R.M., Rickert, C., Altenhein, B., and Technau, G.M. (2008). Subtypes of glial cells in the Drosophila embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. Mech Dev *125*, 542-557.
Berger, C., Renner, S., Luer, K., and Technau, G.M. (2007). The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the Drosophila embryonic CNS. Dev Dyn *236*, 3562-3568.
Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J.L., and Giangrande, A. (1999). Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. Dev Biol *216*, 265-275.
Bernardoni, R., Miller, A.A., and Giangrande, A. (1998). Glial differentiation does not require a neural ground state. Development *125*, 3189-3200.
Bernardoni, R., Vivancos, V., and Giangrande, A. (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. Dev Biol *191*, 118-130.
Bier, E. (1997). Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction. Cell *89*, 681-684.
Bonchuk, A., Denisov, S., Georgiev, P., and Maksimenko, O. (2011). Drosophila BTB/POZ domains of "ttk group" can form multimers and selectively interact with each other. Journal of molecular biology *412*, 423-436.
Boulanger, A., and Dura, J.M. (2014). Nuclear receptors and Drosophila neuronal remodeling. Biochimica et biophysica acta.
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.
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. Journal of neuroscience research *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*, 2957-2966.
Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. Seminars in cell & developmental biology *16*, 117-128.
Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., and Baylies, M.K. (2001). Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during Drosophila mesoderm development. Development *128*, 3145-3159.
Chlon, T.M., and Crispino, J.D. (2012). Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. Development *139*, 3905-3916.
Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., and Brand, A.H. (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in Drosophila neural stem cells. Dev Cell *11*, 775-789.

Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R.P., Bourouis, M., Ramain, P., Gelbart, W., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). u-shaped encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes achaete and scute during the formation of bristles in Drosophila. Genes Dev *11*, 3083-3095.
De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C., and Giangrande, A. (2006). Huckebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. EMBO J *25*, 244-254.
Doherty, J., Logan, M.A., Tasdemir, O.E., and Freeman, M.R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult Drosophila brain. J Neurosci *29*, 4768-4781.
Flici, H., Erkosar, B., Komonyi, O., Karatas, O.F., Laneve, P., and Giangrande, A. (2011). Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia. Development *138*, 4167-4178.
Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity *4*, 431-443.
Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. Science *284*, 1991-1994.
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*, 567-580.
Freeman, M.R., and Doherty, J. (2006). Glial cell biology in Drosophila and vertebrates. Trends Neurosci *29*, 82-90.
Furlong, E.E. (2004). Integrating transcriptional and signalling networks during muscle development. Current opinion in genetics & development *14*, 343-350.
Giangrande, A., Murray, M.A., and Palka, J. (1993). Development and organization of glial cells in the peripheral nervous system of Drosophila melanogaster. Development *117*, 895-904.
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*, 2307-2316.
Grenningloh, G., Rehm, E.J., and Goodman, C.S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in Drosophila: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. Cell *67*, 45-57.
Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014). In Vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. Cell stem cell *14*, 188-202.
Hakim, Y., Yaniv, S.P., and Schuldiner, O. (2014). Astrocytes play a key role in Drosophila mushroom body axon pruning. PloS one *9*, e86178.
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*, 317-332.
Harrison, S.D., and Travers, A.A. (1990). The tramtrack gene encodes a Drosophila finger protein that interacts with the ftz transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. EMBO J *9*, 207-216.
Hartline, D.K. (2011). The evolutionary origins of glia. Glia *59*, 1215-1236.
Heinrich, C., Blum, R., Gascon, S., Masserdotti, G., Tripathi, P., Sanchez, R., Tiedt, S., Schroeder, T., Gotz, M., and Berninger, B. (2010). Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. PLoS Biol *8*, e1000373.
Hidalgo, A., and Booth, G.E. (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the Drosophila embryonic CNS. Development *127*, 393-402.
Hitoshi, S., Ishino, Y., Kumar, A., Jasmine, S., Tanaka, K.F., Kondo, T., Kato, S., Hosoya, T., Hotta, Y., and Ikenaka, K. (2011). Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active DNA demethylation and induce neural stem cells. Nat Neurosci *14*, 957-964.

Hoshizaki, D.K., Blackburn, T., Price, C., Ghosh, M., Miles, K., Ragucci, M., and Sweis, R. (1994). Embryonic fat-cell lineage in Drosophila melanogaster. Development *120*, 2489-2499.
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*, 1025-1036.
Ito, K., Urban, J., and Technau, G. (1995). Distribution, classification, and development ofDrosophila glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. Roux's Arch Dev Biol *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*, 6027-6035.
Jones, B.W. (2005). Transcriptional control of glial cell development in Drosophila. Dev Biol *278*, 265-273.
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*, 1013-1023.
Kammerer, M., and Giangrande, A. (2001). Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. EMBO J *20*, 4664-4673.
Kato, K., Forero, M.G., Fenton, J.C., and Hidalgo, A. (2011). The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by pros-notch and pros-NFκB feedback. PLoS Biol *9*.
Kerr, K.S., Fuentes-Medel, Y., Brewer, C., Barria, R., Ashley, J., Abruzzi, K.C., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O.E., Freeman, M.R., and Budnik, V. (2014). Glial wingless/Wnt regulates glutamate receptor clustering and synaptic physiology at the Drosophila neuromuscular junction. J Neurosci *34*, 2910-2920.
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*, 12364-12369.
Kurant, E. (2011). Keeping the CNS clear: glial phagocytic functions in Drosophila. Glia *59*, 1304-1311.
Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D., and Gaul, U. (2008). Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. Cell *133*, 498-509.
Kurucz, E., Vaczi, B., Markus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsamboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., and Ando, I. (2007). Definition of Drosophila hemocyte subsets by cell-type specific antigens. Acta biologica Hungarica *58 Suppl*, 95-111.
Laneve, P., Delaporte, C., Trebuchet, G., Komonyi, O., Flici, H., Popkova, A., D'Agostino, G., Taglini, F., Kerekes, I., and Giangrande, A. (2012). The Gcm/Glide molecular and cellular pathway: new actors and new lineages. Dev Biol *375*, 65-78.
Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. Science *288*, 146-149.
Lee, B.P., and Jones, B.W. (2005). Transcriptional regulation of the Drosophila glial gene repo. Mech Dev *122*, 849-862.
Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron *22*, 451-461.
Leyssen, M., and Hassan, B.A. (2007). A fruitfly's guide to keeping the brain wired. EMBO reports *8*, 46-50.
Logan, M.A., and Freeman, M.R. (2007). The scoop on the fly brain: glial engulfment functions in Drosophila. Neuron glia biology *3*, 63-74.
Logan, M.A., Hackett, R., Doherty, J., Sheehan, A., Speese, S.D., and Freeman, M.R. (2012). Negative regulation of glial engulfment activity by Draper terminates glial responses to axon injury. Nat Neurosci *15*, 722-730.
MacDonald, J.M., Beach, M.G., Porpiglia, E., Sheehan, A.E., Watts, R.J., and Freeman, M.R. (2006). The Drosophila cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. Neuron *50*, 869-881.
Meister, M., and Lagueux, M. (2003). Drosophila blood cells. Cellular microbiology *5*, 573-580.

Mlodzik, M., Baker, N.E., and Rubin, G.M. (1990). Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in Drosophila. Genes Dev *4*, 1848-1861.
Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B.J., and Knoblich, J.A. (2009). Genome-wide analysis of Notch signalling in Drosophila by transgenic RNAi. Nature *458*, 987-992.
Petersen, U.M., Kadalayil, L., Rehorn, K.P., Hoshizaki, D.K., Reuter, R., and Engstrom, Y. (1999). Serpent regulates Drosophila immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. EMBO J *18*, 4013-4022.
Prokop, A., and Technau, G.M. (1994). Early tagma-specific commitment of Drosophila CNS progenitor NB1-1. Development *120*, 2567-2578.
Ragone, G., Bernardoni, R., and Giangrande, A. (2001). A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 6-4T. Dev Biol *235*, 74-85.
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*, 4023-4031.
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*, 141-150.
Reuter, R. (1994). The gene serpent has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the Drosophila gut. Development *120*, 1123-1135.
Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.M., and White, K. (1988). The elav gene product of Drosophila, required in neurons, has three RNP consensus motifs. Science *242*, 1570-1572.
Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. Science *218*, 348-353.
Sam, S., Leise, W., and Hoshizaki, D.K. (1996). The serpent gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. Mech Dev *60*, 197-205.
Santos, J.G., Vomel, M., Struck, R., Homberg, U., Nassel, D.R., and Wegener, C. (2007). Neuroarchitecture of peptidergic systems in the larval ventral ganglion of Drosophila melanogaster. PloS one *2*, e695.
Sepp, K.J., and Auld, V.J. (2003). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for Drosophila peripheral nervous system development. J Neurosci *23*, 8221-8230.
Sepp, K.J., Schulte, J., and Auld, V.J. (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in Drosophila melanogaster. Glia *30*, 122-133.
Shklyar, B., Levy-Adam, F., Mishnaevski, K., and Kurant, E. (2013). Caspase activity is required for engulfment of apoptotic cells. Mol Cell Biol *33*, 3191-3201.
Soustelle, L., Aigouy, B., Asensio, M.L., and Giangrande, A. (2008). UV laser mediated cell selective destruction by confocal microscopy. Neural Dev *3*, 11.
Soustelle, L., Besson, M.T., Rival, T., and Birman, S. (2002). Terminal glial differentiation involves regulated expression of the excitatory amino acid transporters in the Drosophila embryonic CNS. Dev Biol *248*, 294-306.
Soustelle, L., and Giangrande, A. (2007a). Glial differentiation and the Gcm pathway. Neuron glia biology *3*, 5-16.
Soustelle, L., and Giangrande, A. (2007b). Novel gcm-dependent lineages in the postembryonic nervous system of Drosophila melanogaster. Dev Dyn *236*, 2101-2108.
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*, 4521-4532.
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*, 625-634.
Su, Z., Niu, W., Liu, M.L., Zou, Y., and Zhang, C.L. (2014). In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. Nature communications *5*, 3338.

Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., and Perrin-Schmitt, F. (1988). Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos. EMBO J *7*, 2175-2183.
Trébuchet, G., and Giangrande, A. (2001). Glial Cells in Neural Development. In eLS (John Wiley & Sons, Ltd).
Vincent, S., Vonesch, J.L., and Giangrande, A. (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. Development *122*, 131-139.
von Hilchen, C.M., Bustos, A.E., Giangrande, A., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2013). Predetermined embryonic glial cells form the distinct glial sheaths of the Drosophila peripheral nervous system. Development *140*, 3657-3668.
von Hilchen, C.M., Hein, I., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the Drosophila embryo. Development *137*, 1251-1262.
Wakamatsu, Y. (2004). Understanding glial differentiation in vertebrate nervous system development. The Tohoku journal of experimental medicine *203*, 233-240.
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*, 5477-5486.
Wong, M.C., Castanon, I., and Baylies, M.K. (2008). Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis. Dev Biol *317*, 417-429.
Xiong, W.C., and Montell, C. (1993). tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the Drosophila eye. Genes Dev *7*, 1085-1096.
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*, 981-994.
Yao, K.M., and White, K. (1991). Organizational analysis of elav gene and functional analysis of ELAV protein of Drosophila melanogaster and Drosophila virilis. Mol Cell Biol *11*, 2994-3000.
Yin, Z., Xu, X.L., and Frasch, M. (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. Development *124*, 4971-4982.
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*, 2419-2428.
Zaytouni, T., Efimenko, E.E., and Tevosian, S.G. (2011). GATA transcription factors in the developing reproductive system. Advances in genetics *76*, 93-134.

A

gcm-Gal4: hemocytes + glia

gcm(hemo)-Gal4: hemocytes

B

UAS-gcm strains	Strength
F18A	weak
RS1	medium
M24A	strong
M24A F18A	very strong

C

gcm GOF

WT | weak | strong | very strong

repo / actin mRNA relative quantification

0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0

***, p = 0.006

*, p = 0.010

NS, p = 0.09

n = 3

driver : *gcm(hemo)-Gal4*

Wild-type | ***gcm* GOF (strong)** (*gcm(hemo) > gcm*)

gcm(hemo) > CD8GFP / Nazgul / Repo

D, E, F, D', E', F', H, I, J, H', I', J'

G

gcm GOF

WT | (strong)

% of Repo positive hemocytes

30, 20, 10, 0

***, n = 4, p = 4*10-4

K

% of Nazgul positive hemocytes

75, 50, 25, 0

***, n = 3, p = 6*10-4

driver : *gcm(hemo)-Gal4*

L

gcm GOF

WT | (strong)

Srp staining intensity per hemocyte

100, 80, 60, 40, 20, 0

NS, n = 50, p = 0.2

driver : *gcm(hemo)-Gal4*

***gcm* GOF (strong)** (*gcm(hemo) > gcm*)

gcm(hemo) > CD8GFP / Srp / Repo

gcm(hemo) > CD8GFP / Crq / Repo

M, M', N, N'

Figure 1: Gcm conserves a strong gliogenic potential in hemocyte precursors.

(**A**) Schematic showing *gcm-Gal4* and *gcm(hemo)-Gal4* expression territories. (**B**) Table showing the strength of the *UAS-gcm* transgenic lines used in this study. (**C**) *repo/actin* mRNA relative quantification by qRT-PCR from stage 5-11 of *gcm(hemo*) (wild-type), *gcm(hemo)* > *gcm* (weak, strong and very strong *gcm* GOF) embryos. (**D-F', H-J'**) Immunolabeling on wild-type and *gcm(hemo*) > *gcm(strong)* embryos, lateral views anterior to the left. *gcm(hemo*) > *CD8GFP* was used to monitor hemocytes. In this and in the other pictures, confocal projections are shown for images with low magnification and confocal sections are shown for the high magnification of the insets, except if indicated differently. (**D-F'**) Stage 14, GFP (green) and Repo (blue) labeling. (**H-J'**) stage 16, GFP (green) and Nazgul (red) labeling. Brackets indicate hemocyte territory. (**F, F', J, J'**) High magnification of the insets shown in (**E', I'**) Arrowheads indicate ectopic glial marker labeling in hemocytes overexpressing *gcm*. Note that the yellow color observed in (**H'**) is an artifact created by the projection (oval). (**G, K**) Quantitative analyses in embryos of the above genotypes. Percentage of hemocytes expressing Repo (**G**) and Nazgul (**K**). In this and in the other graphs, n indicates the number of embryos analyzed for each genotype, except if indicated differently. (**L**) Srp labeling intensity per individual hemocyte, measured by ImageJ, as described in the materials and methods, in wild-type and strong *gcm* GOF embryos. n indicates the number of hemocytes analyzed for each genotype. (**M-N'**) Confocal sections of *gcm(hemo*) > *gcm* (strong *gcm* GOF) stage 16 embryos, GFP (green), Repo (blue) and Srp (red) (**M, M'**) or Crq (red) (**N, N'**) labeling. Hemocytes are indicated by asterisks, those that express Repo by arrowheads. Note that Repo ectopic expression does not affect Srp or Crq expression. Scale bar: 100 µm.

gcm GOF (strong)
(twi > gcm)
gcm GOF (strong) , srp GOF
(twi > srp, gcm)
Repo
Nazgul
A
B
C
D
Dorsal
Ventral
Stage 6
E
ms
sca-Gal4 : vne
twi-Gal4 : ms + mec
vne
mec
gcm GOF (medium)
(twi > gcm)
gcm GOF (medium), twist LOF
(twi > gcm, twi +/-)
F
G
1 : WT
2 : gcm GOF (medium)
3 : gcm GOF (medium), twi GOF
H
NS
***
p = 2*10-3
n = 3
repo / actin mRNA relative quantification
driver : gcm(hemo)-Gal4
Wild-type
twi GOF
(sca > twi)
I
J
WT
twi GOF
K
p = 2*10-6
Repo potive cell number
driver : sca-Gal4

Figure 2: Twi and Srp negatively regulate Repo expression.

(**A-D, F, G, I, J**) Immunolabeling on stage 14 embryos, ventral views. (**A-D**) *twi* > *gcm* (strong *gcm* GOF) and *twi* > *srp, gcm* (strong *gcm* GOF, *srp* GOF) embryos. Repo (**A, B**) and Nazgul (**C, D**) labeling. Note that in embryos expressing ectopically Gcm, Nazgul is absent from the longitundinal glial cells (**C**). This phenotype most probably results from Gcm mesectodermal expression which, in turn, triggers severe commissural defects (Bernardoni et al., 1997). Gcm and Srp co-expression partially rescues this phenotype (**D**) providing an other evidence that Srp represses gliogenesis. (**E**) Schematic showing *twi-Gal4* and *sca-Gal4* expression territories. (**H**) *repo/actin* mRNA relative quantifications by qRT-PCR on RNA extracts from wild type, *gcm(hemo)* > *gcm* (medium *gcm* GOF) and *gcm(hemo)* > *gcm, twi* (medium *gcm* GOF, *twi* LOF) stage 5-11 embryos. (**F, G**) *twi* > *gcm* (medium *gcm* GOF) and *twi* > *gcm,* twi^{1}/ + embryos (medium *gcm* GOF, *twi* LOF), Repo labeling. (**I, J**) Wild-type and *sca* > *twi* embryos (*twi* GOF), Repo labeling. (**K**) Glial cell number (= Repo positive cells) per 6 segments in wild-type and *sca>twi* (*twi* GOF) embryos. Scale bar: 100 µm.

1 : WT ; **2** : *gcm* GOF (weak) ; **3** : *gcm* GOF (strong) ; **4** : *gcm* GOF (weak) ; **5** : *gcm* GOF (weak), *repo* LOF
driver : *sca-Gal4*

Figure 3: Repo represses Gcm limited hematopoietic potential in the neuroectoderm.

(**A-F'**) Immunolabeling on wild-type, *sca* > *gcm* (weak and strong *gcm* GOF) stage 14 embryos. *sca* > *CD8GFP* was used to monitor the territory of *gcm* ectopic expression. GFP (green), Repo (blue) and Srp (red) (**A-C'**) or Ush (**D-F'**) labeling. (**A-C'**) Lateral view. (**D-F'**) Ventral view. The dashed lines indicate the midline. (**C, C', F, F'**) High magnification of the insets shown in (**B, E**), ovals indicate ectopic GFP and Srp (**C, C'**) or Ush (**F, F'**) double positive cells. Few cells co-express GFP, Ush and Repo (arrowheads). (**M, N**) Quantitative analyses in embryos of the above genotypes. Number of GFP/Srp (**M**) or GFP/Ush (**N**) double positive cells per hemisegment. (**G-L'**) Immunolabeling on *sca* > *gcm* (weak *gcm GOF*) in wild-type or in *repo* mutant (*repo* LOF) stage 14 embryos that also carry the *repo-nGFP* transgene to monitor presumptive glial cells. The dashed lines indicate the borders of the VNC. GFP (green) and Srp (red) (**G-I'**) or Ush (red) (**J-L'**) labeling. (**I, I', L, L'**) High magnification of the insets shown in (**H, K**). Arrowheads indicate ectopic GFP/Srp (**I, I'**) or GFP/Ush (**L, L'**) double positive cells. (**O, P**) Quantitative analyses in embryos of the above genotypes. Number of GFP/Srp (**O**) or GFP/Ush (**P**) double positive cells per hemisegment. Scale bar: 100 μm. n indicates the number of hemisegment analyzed for each genotypes.

Wild-type
repo GOF (gcm(hemo) > repo)
gcm(hemo) > CD8GFP / Srp
A
B
C
D
Wild-type
repo GOF
(gcm(hemo) > repo)
E
WT
repo GOF
Srp staining intensity per hemocyte
100
80
60
40
20
0
***
n = 50
p = 6*10-23
driver : gcm(hemo)-Gal4
gcm(hemo) > CD8GFP / P1
F
G
F'
G'
H
RBS
srp(hemo)
Gal4
KpnI
KpnI
srp(hemo) > CD8GFP
I
J
srp (hemo) > GFP
pPac5C-repo 0 1 2 3
β-Gal
Repo
GFP
GFP / β-Gal quantification
120
80
40
0
***
p = 3*10-4
n = 3
K
Srp / Twi
Gcm
Repo
Srp / Ush
Hemocyte

Figure 4: Repo can repress hemocyte differentiation.

(**A-D, F-G'**) Immunolabeling on wild-type and *gcm(hemo)* > *repo* (*repo* GOF) stage 16 embryos. *gcm(hemo)* > *CD8GFP* was used to monitor hemocytes. GFP and Srp (**A-D**) or P1 (**F-G'**) labeling. Arrows indicate the fat body. (**B, D**) High magnifications of the insets shown in (**A, C**). (**E**) Srp labeling intensity measured by ImageJ in wild-type and in *repo* GOF embryos as described in the materials and methods. (**H**) Schematics of the *srp(hemo)-Gal4* transgene (Bruckner et al., 2004). *srp(hemo)-Gal4* contains the Gal4 coding sequence under the control of the regulatory sequences that drive Srp expression in hemocytes and that carry one RBS flanked by two KpnI restriction sites. (**I**) *srp(hemo)* > *CD8GFP* stage 16 embryo, GFP labeling. (**J**) Western blot performed on protein extracts coming from co-transfection assays. S2 cells were co-transfected with *psrp(hemo)-Gal4, pUAST-GFP* and increasing amount of *pPac5C-repo* (0 to 3 μg). *pPac5C-lacZ* was used as a transfection control. The histogram represents GFP/β-Gal relative quantifications. The amounts of transfected Repo were also verified. **K**) Schematic representing the cascade of transcription factors which govern hemocyte differentiation. n indicates the number of co-transfection assays. Scale bar: 100 μm.

WT
repo LOF
A
***
400
300
200
100
0
p = 9*10-4
n = 3
repo-nGFP positive cells
B
**
6
4
2
0
p = 6*10-3
n = 3
repo-nGFP + PH3 positive cells
C
***
12
8
4
0
p = 4*10-4
n = 3
repo-nGFP + CM1 positive cells
Wild-type
repo LOF (repo -/-)
CM1 / repo-nGFP
D
E
F
G
H
Wild-type
repo LOF (repo -/-)
SIMU
Draper
I
J
K
L
Wild-type
repo LOF (repo -/-)
CM1 / repo > CD8GFP
M
N
O
P
Q

Figure 5: Repo is required for cell clearance in the embryonic CNS.

(**A-C**) Graphs showing the number of presumptive glia (GFP positives cells) (**A**), that of presumptive glia undergoing proliferation (GFP/PH3 double positive cells) (**B**) or apoptosis (GFP/CM1 double positive cells) (**C**), present in 6 segments of wild-type and *repo* mutant (*repo* LOF) stage 15 embryos (except stage 14 in (**B**)), which also carry the *repo-nGFP* transgene to monitor the presumptive glial cells. (**D-H**) GFP and CM1 labeling on embryos of the above genotypes. (**F-H**) High magnification of the inset shown in (**E**). Arrowheads indicate glial cells undergoing apoptosis. (**I-L**) SIMU (**I, J**) or Draper (**K, L**) labeling to visualize the expression of phagocytosis receptors. (**M-Q**) Wild-type and *repo* mutant embryos also carrying the *repo > CD8GFP* transgene, which targets GFP expression to glial cell membranes. GFP and CM1 labeling. (**O-Q**) High magnification of the inset shown in (**M**). In wild-type embryos, glial cells enwrap apoptotic bodies (arrowheads). Scale bar: 50 μm.

Glial cells associated to : surface (), cortex () and axons ()
A
Dorsal
Ventral
Wild-type
repo LOF (repo -/-)
repo-nGFP / Fas2
B
C
B'
C'
repo-nGFP / Srp
D
E
F
D'
E'
F'
repo-nGFP + Srp positive cells
WT
LOF
G
6 %
**
n = 3
p = 0.009
0 %
repo-nGFP / Ush
H
I
J
H'
I'
J'
repo-nGFP + Ush positive cells
K
30 %
***
n = 3
p = 4*10-4
1 %
repo-nGFP / Srp / Fas2
L
M
repo-nGFP / Ush / HRP
N
O

Figure 6: Repo is required to repress hemocyte transcription factors in developing glia.

(**A**) Schematic representation of a transversal section of the VNC from a mature embryo (Trébuchet and Giangrande, 2001). Glial cell subtypes are defined according to their localization: surface (blue), cortex (red) and axons (green) (Beckervordersandforth et al., 2008; Ito et al., 1995). The ventral part of the VNC contains mostly surface and cortex associated glial cells, whereas the dorsal part contains mostly axons associated glial cells. (**B-F', H-J', L-O**) Immunolabeling on wild-type and *repo* mutant (*repo* LOF) stage 15 embryos carrying the *repo-nGFP* transgene. The analyses were performed upon subdividing the VNC in a ventral and in a dorsal part, according to the schematics shown in (**A**). GFP (green) and Fas2 (gray) (**B-C'**), Srp (**D-F'**) or Ush (**H-J'**) labeling. (**L, M**) GFP (green), Srp (red) and Fas2 (gray) labeling. (**F, G**), GFP (green), Ush (red) and HRP (gray) labeling. (**F, F', J, J'**) High magnification of the insets shown in (**E, J**). Arrowheads indicate presumptive glia which ectopically express hemocyte transcription factors. Dashed lines indicate the midline. Scale bar: 100 μm. (**G, K**) Quantitative analyses in embryos of the above genotypes. Number and percentage of GFP/Srp (**G**) or GFP/Ush (**K**) double positive cells per 6 segments.

repo-nGFP / Elav
Wild-type
repo LOF (repo -/-)
Dorsal
Ventral
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
WT
repo LOF
repo LOF tk LOF
tk LOF
repo LOF elav LOF
elav LOF
repo-nGFP + Elav positive cells
150
100
50
0
***
p = 8*10-5
90 %
***
p = 10-4
20 %
n = 3
0 %
0 %
0 %
0 %
L
repo-nGFP + Srp positive cells
30
20
10
0
*
p = 0.03
*
p = 0.01
**
p = 0.009
12 %
6 %
n = 3
1 %
0 %
0 %
0 %
M
Repo
Ttk69
Elav
Glia
Blood
Neuron

Figure 7: Repo represses both hemocyte and neuronal differentiation.

Wild-type and *repo* mutant (*repo* LOF) stage 15 embryos, ventral view. The *repo-nGFP* transgene was used to monitor presumptive glial cells. VNC analyses were divided in the ventral and the dorsal parts. (**A-J**) Embryos labeled with GFP (green) and Elav (gray). (**E-G, H-J**) High magnification of the insets shown in (**B, D**). Arrowheads indicate ectopic GFP/Elav double positive cells. (**K, L**) Graph showing the number and the percentage of GFP and Elav double positive cells (**K**) or GFP and Srp double positive cells (**L**) per 6 segments in several combination of *repo* (*repo* LOF), *ttk* (*ttk* LOF) and *elav* (*elav* LOF) simple or double mutant embryos. Scale bar: 100 μm. **M**) Schematic representing the interplay between Repo, Ttk69 and Elav for cell fate specification in the embryonic CNS.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary figures

Figure S1: *gcm* and *gcm(hemo)* driver expression profiles

(**A-H**) Immunolabeling on gcm^{rA87} stage 16 embryos, ventral views. The gcm^{rA87} line carries a *P-lacZ* insertion in which β-gal recapitulates the *gcm* expression profile. (**A-D**) β-gal (*gcm:* green), P1 (plasmatocytes: red) and Repo (glia: blue) labeling. (**E-H**) High magnification of the inset shown in (**A-D**). β-Gal is detected in plasmactocytes (arrowheads), in glia (arrows) and in tendon cells (oval) (Soustelle et al., 2004). Unless specified, panels show embryonic ventral views, anterior to the left. (**I, J**) *gcm-Gal4, repo-Gal80* (*gcm(hemo)*) driven expression monitored with the *UAS-CD8GFP* transgene. Stage 16 embryos, GFP (green) and Repo (blue) labeling. (**J**) Lateral view. Region defined by the dashed line indicates the CNS. Note that GFP expression is excluded from glia. Scale bar: 100 μm.

Figure S2: Gcm dosage and cell fate choice in the VNC

Confocal projections of stage 15 embryos of the following genotypes: *gcm*^{34}/+ (**A**), *gcm*^{34}/*gcm*^{34} (**B**) and *gcm*^{34}/*Df(2L)132* (**C**) (*gcm* LOF) labeled for β-Gal (green), Srp (red) and Elav (gray) expression. The *gcm*^{34} line contains part of the *P-lacZ* insertion that allows monitoring of *gcm* expression. β-Gal/Srp double positive cells (yellow, asterisks) are located outside the VNC (dashed line) and label the circulating hemocytes. Scale bar: 50 µm.

Figure S3: Role of E-boxes carried by *repo* promoter

(**A**) Schematics of the 4,3kb *repo* promoter that recapitulates the complete *repo* expression pattern (Lee and Jones, 2005). 11 GBSs (red) and 4 TBSs (yellow) are present, 0 indicates the *repo* transcription start site. The following restriction sites are indicated: E=EcoRI; Sa=Sal1; B=BamH1; S=Spe1; X=Xho1. (**B-E**) GFP labeling on embryos carrying the *repo(0.7kb)-nGFP* (**B, D**) or *repo(0.7kbΔTBSs)-nGFP* (**C, E**) trangenes. Scale bar: 100 µm.

Figure S4: Repo represses indirectly *srp*.

(**A**) Schematics of the *srp(hemo)ΔRBS-Gal4* transgene. (**B**) Western blot performed on protein extracts coming from co-transfection assays. S2 cells were co-transfected with *psrp(hemo)-Gal4,* wild-type (WT) or mutated (ΔRBS), *pUAST-GFP* and 2 µg of *pPac5C-repo*. *pPac5C-lacZ* was used as a transfection control. The histograms represent GFP/β-Gal relative quantifications. The amounts of transfected Repo were also verified.

Figure S5: Repo is required for glial cell differentiation.

Immunolabeling of wild-type and *repo* mutant (*repo* LOF) stage 15 embryos. (**A, B**) SP2637 (**C, D**), Nazgul (**E, F**) or Prospero labeling. Scale bar: 50 µm.

Figure S6: Repo does not repress Crq in developing glial cells.

Immunolabeling on wild-type and *repo* mutant (*repo* LOF) stage 15 embryos carrying the *repo-nGFP* transgene. GFP (green) and Crq (red) labeling. Scale bar: 100 µm

Figure S7: Quantification of the mutant phenotypes

Number of presumptive glial cells (*repo-nGFP*) per 6 segments in *repo* (*repo* LOF), *ttk* (*ttk* LOF) and *elav* (*elav* LOF) simple or double mutant embryos.

Figure S8: Repo does not repress Srp in post-embryonic peripheral glial cells.

Immunolabeling of wild-type and *repo* knock-down (KD or *repo* LOF) wings. KD were performed using the *repo* > *repoRNAi* line carrying the *tubulin-Gal80ts* transgene and the *UAS GFP* transgene, used to monitor glial cells. (**A, B**) GFP (green), Srp (red) and Repo (blue) labeling at 28 h APF. (**C-F**). High magnification of the inset shown in (**B**). Scale bar: 100 µm.

Figure 39 : Carte génomique de Repo

Le promoteur de *repo* d'une taille de 4.3 kb contient onze GBSs (rouge), trois RBSs (bleu) et quatre TBSs (jaune). Il récapitule le territoire d'expression complet de *repo* **(Lee and Jones, 2005)**. Ce promoteur, sauvage ou muté pour les TBSs (*ΔTBS*), a été cloné en amont de la GFP pour construire les rapporteurs transcriptionnels *repo(4.3kb)-GFP* et *repo(4.3kbΔTBS)-GFP*. Des rapporteurs transcriptionnels plus courts, *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kbΔTBS)-GFP,* ont également été générés. L'échelle représente la position en kb par rapport au site d'initiation de la transcription. Les sites de restrictions sont indiqués : E=EcoRI ; Sa=Sal1 ; B=BamH1 ; S=Spe1 ;X=Xho1. Le diagramme représente le taux de conservation de la séquence à travers douze espèces de drosophile (UCSC genome browser).

II. RESULTATS ADDITIONNELS 1 : ETUDE DE LA REGULATION DE *REPO*

II.A. Construction de rapporteurs transcriptionnels de *repo*

L'expression de Repo est négativement régulée par l'environnement mésodermal, en particulier par les facteurs Twi et Srp (**Publication 2, Fig. S3**). Puisque Twi peut agir comme un répresseur, l'hypothèse que Twi puisse réprimer directement *repo* a été émise. Pour étudier cela, différents rapporteurs transcriptionnels de *repo* ont été construits. Le promoteur de *repo*, d'une taille de 4.3 kb (**Fig. 39**), récapitule le territoire d'expression complet de *repo* **(Lee and Jones, 2005)**. Il contient notamment quatre boites E, dont trois sont conservées dans l'évolution, qui correspondent à des sites putatifs de fixation pour la protéine Twi (TBSs).

Le promoteur de *repo* d'une taille de 4.3 kb, a été cloné en amont en amont de la GFP dans le vecteur *pH-Stinger* par Sara BERZSENYI pour construire le rapporteur transcriptionnel *repo(4.3kb)-GFP* **(Fig. 39) (Laneve et al., 2012)**. J'ai moi même muté par mutagénèse dirigée les quatre TBSs présents sur le promoteur de *repo* pour générer le rapporteur muté *repo(4.3kbΔTBS)-GFP* correspondant. Des rapporteurs transcriptionnels plus courts, contenant un fragment de promoteur de *repo* d'une taille de 0.7 kb, portant des sites TBSs mutés ou non **(Fig. 39)**, ont également été construits en collaboration avec Maria PEZZE, une étudiante en Master 2 que j'ai supervisée.

II.B. Twi et Srp ne répriment pas directement *repo in* vitro.

L'hypothèse de répression a été testée dans les cellules S2 par des expériences de co-transfection (**Fig. 40**). Les cellules sont transfectées par le rapporteur *repo(4.3kb)-GFP* (**Fig. 40B**). Comme prévu, la co-transfection des cellules par le vecteur d'expression de Repo déclenche une activation du rapporteur. Après co-transfection des cellules par un vecteur d'expression de Twi (en plus du vecteur d'expression de Repo), une répression significative du rapporteur est mise en évidence. Lors de toutes les expériences de co-transfection que j'ai effectuées, la quantité de plasmide est équilibrée entre les puits avec le vecteur d'expression vide pour assurer l'absence d'effets aspécifiques liés à la titration des plamides. Twi peut donc spécifiquement réprimer *repo* dans les cellules S2.

Figure 40 : Etude de la régulation de *repo* par Twi et Srp *in vitro*

A) Retard de migration électrophorétique (EMSA). Un oligonucléotide radiomarqué double brin correspondant au TBS1 de *repo* (**Fig. 39**) sauvage (TBS) ou muté (ΔTBS) a été incubé avec des quantités croissantes (0 à 2 µg) de protéine Twi-GST purifiée. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, un retard de migration est observé uniquement pour l'oligonucléotide de type sauvage. B,C,E,F) Analyse par western blot d'extraits protéiques provenant de cellules co-transfectées par les rapporteurs *repo(4,3kb)-GFP* ou *repo(4,3kbΔTBS)-GFP* . Les rapporteurs sont activés par co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de Repo (sauf B, C, F puit n°1). Les cellules sont, en plus, co-transfectées avec 1 à 3 µg d' un vecteur d'expression de Twi (B,C, puits n°3-5) ou Srp (F, puits n°3-5). L'efficacité de transfection est contrôlée par co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de la β-Gal. Les histogrammes représentent les quantifications relatives GFP/β-Gal correspondantes mesurées avec le logiciel ImageJ. D) RT-PCR montrant l'expression des gènes *actin* et *twi* dans un extrait d'ARN issu de cellules non transfectées (UN)

Pour discriminer entre un mode d'action direct ou indirect, l'expérience a été reproduite en utilisant le rapporteur muté *repo(4.3kbΔTBSs)-GFP* (**Fig. 40C**). Bien que les mutations des TBSs abolissent la fixation de la protéine Twi sur le promoteur de *repo* (**Fig. 40A**), elles ne lèvent pas la répression transcriptionnelle (**Fig. 40C**). Twi agit donc vraisemblablement de manière indirecte pour réprimer *repo*. Cependant, l'expression de Repo permet d'activer de manière plus importante le rapporteur muté par rapport au rapporteur sauvage (**Fig. 40E**) et l'expression endogène de Twi a pu être détectée dans les cellules S2 (**Fig. 40E**). Ces résultats suggèrent aussi une contribution directe de Twi dans la répression de Repo.

Puisque *repo* est aussi réprimé par Srp *in vivo*, le mode d'action de Srp sur *repo* a aussi été testé dans les cellules S2. Les expériences de co-transfection n'ont pas pu mettre en évidence une répression significative du rapporteur *repo(4.3kb)-GFP* par Srp (**Fig. 40D**). Srp nécessite probablement des cofacteurs absents des cellules S2 pour réprimer *repo*. En conclusion, aucune répression directe de *repo* par Srp et Twi n'a pus être mise en évidence.

II.C. Etude du rôle des boites E dans la régulation de *repo in vivo*.

Twist ne semble pas réprimer directement *repo*. Pour déterminer le rôle des boîtes E dans la régulation de Repo, des animaux transgéniques correspondant aux rapporteurs de *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kbΔTBSs)-GFP* ont été générés par la technicienne Claude DELAPORTE qui effectue les transgénèses de manière routinière au laboratoire. L'analyse du territoire d'expression du transgène *repo(0.7kb)-GFP* révèle qu'il est activé dans la glie au niveau des PGs et des CBGs mais pas dans les LGs (**Fig. 41A**). La mutation des TBSs ne conduit pas à une expression ectopique du transgène dans les hémocytes confirmant l'absence d'une répression directe par Twi dans ce territoire. En revanche, dans les embryons *repo(0.7kbΔTBSs)-GFP*, la GFP est détectée dans la glie à une intensité plus faible (**Fig. 41B**). Au moins deux souches de chaque génotype ont été analysées excluant la possibilité d'un effet de position. Ces résultats indiquent que les boites E mutées contribuent positivement à l'expression de *repo* dans la glie.

Figure 41 : Etude du rôle des boites E dans la régulation de *repo in vivo*

Vue ventrale d'embryons au stade 13. Marquage GFP effectué sur des embryons portant les transgènes *repo(0.7kb)-GFP* (A) ou *repo(0.7kbΔTBSs)-GFP* (B). Barre d'échelle : 100 µm.

II.D. Discussion et perspectives

Dans les cas où un gène maître est partagé entre plusieurs territoires, la spécification du processus de différenciation repose souvent sur une combinaison de plusieurs familles de facteurs de transcription agissant en synergie **(Furlong, 2004)**. Ainsi, l'environnement moléculaire contribue à la spécification cellulaire **(Berger et al., 2005a; Berger et al., 2007; Prokop and Technau, 1994)**. Durant mon travail de thèse, j'ai montré que deux gènes maîtres exprimés en amont de Gcm, *twi* et *srp* **(Baylies and Bate, 1996; Rehorn et al., 1996)**, peuvent réprimer la gliogénèse. J'ai également mis en évidence que des facteurs de type bHLH sont directement requis pour l'expression de *repo* dans la glie. L'expression *repo* est donc négativement régulée par l'environnement mésodermal et positivement régulée par l'environnement neurogénique.

Dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer si Srp et Twi sont absolument nécessaires pour réprimer *repo* dans le mésoderme procéphalique. Une étude récente a mis en évidence que Twi, qui est requis pour la spécification de la plupart des tissus mésodermals **(Thisse et al., 1988)**, n'est pas absolument déterminant pour la spécification des hémocytes **(Spahn et al., 2014)**. Il serait donc intéressant de déterminer si la perte de Twi conduit à une induction de Repo ou du transgène *repo(4.3kb)-GFP* dans les précurseurs hémocytaires.

D'un autre côté, l'expression de Srp est absolument requise pour la détermination des précurseurs hémocytaires **(Lebestky et al., 2000)**. Pour déterminer si Srp est nécessaire pour réprimer Repo dans les hémocytes, l'analyse d'embryons mutants nuls pour le gène *srp* est donc impossible. Durant le développement du système nerveux, nous savons que l'expression de Repo reste activée dans les cellules gliales et qu'elle est nécessaire pour la spécification de la glie. A l'instar de l'expression de Repo, l'expression de Srp est aussi maintenue dans les hémocytes. Il serait donc intéressant d'effectuer un knock-down conditionnel de *srp* dans ce territoire.

Il serait aussi intéressant d'identifier le(s) régulateur(s) positif(s) de l'expression de *repo* dans la glie. Les meilleurs candidats pour s'ancrer aux boîtes E du promoteur de *repo* sont les facteurs bHLH proneuraux déjà connus pour promouvoir la gliogénèse **(Giangrande, 1995)**. Leur mode d'action sur l'expression de *repo* pourrait être approfondi. Par exemple, nous attendons que, dans les tissus mésodermals, la co-expression des membres du complexe Achaete

Scute **(Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1988)** et de Gcm conduise à une augmentation de la gliogénèse ectopique par rapport à l'expression de Gcm seul.

Mes travaux ont clairement mis en évidence un mode d'action indirect de Twi sur l'expression de *repo*, cependant, les études que j'ai effectuées *in vitro* suggèrent aussi une contribution directe de Twi : 1) L'analyse *in silico* du promoteur de *repo* avec le logiciel RSAT **(Thomas-Chollier et al., 2008)** prédit la présence d'un cluster de quatre TBSs conservé au cours de l'évolution 2) Twi est capable de se fixer directement sur ces TBSs. 3) La mutation des TBSs de *repo* conduit à une induction transcriptionnelle dans les cellules S2, cellules exprimant Twi de manière endogène. Pour explorer d'avantage la contribution directe de Twi sur la répression de *rep*o, il serait intéressant de reproduire les expériences de co-transfection sur des cellules dans lesquelles l'expression de Twi aurait été préalablement réduite par une approche RNAi. Après co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de Repo, une induction équivalente des rapporteurs *repo(4.3kb)-GFP* et *repo(4.3kbΔTBSs)-GFP* démontrerait une contribution directe de Twi tandis qu'une induction plus importante du rapporteur muté confirmerait un mode d'action essentiellement indirect.

Le mode d'action de Srp sur *repo* reste également indéterminé. L'absence de répression de *repo* par Srp *in vitro* montre que Srp agit probablement de manière indirecte sur *repo* ou que Srp nécessite des cofacteurs absents des cellules S2. Nous savons que Srp peut agir avec son cofacteur dédié Ush pour réprimer la différenciation des cellules à cristaux **(Lebestky et al., 2000)**. L'hypothèse d'une répression de Repo par le dimère Srp/Ush pourrait être testée *in vitro* et *in vivo*.

III. RESULTATS ADDITIONNELS 2 : RECHERCHE DE NOUVELLES CIBLES DIRECTES DE GCM DANS LES HEMOCYTES

Une des clés pour comprendre comment le facteur de transcription Gcm peut agir de manière différente dans plusieurs tissus consiste à comprendre comment les cibles de Gcm sont régulées. Pour étudier ce mécanisme, les cibles directes de Gcm doivent être identifiées. Bien que de nombreuses cibles directes de Gcm aient été identifiées dans la glie, comme le gène homéotique *repo*, aucune n'a encore été clairement démontrée dans le territoire hématopoïétique. Les seules données disponibles concernant les gènes agissant en aval de Gcm dans les hémocytes proviennent de cribles effectués à l'échelle du génome. Il s'agit d'analyses bioinformatiques ou de cribles basés sur l'étude d'embryons avec gain ou perte de fonction pour *gcm* **(Altenhein et al., 2006; Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003)**. Ces cribles ont identifié des gènes dont l'expression est régulée par Gcm, cependant, ces méthodes ne permettent pas nécessairement l'identification des cibles directes. J'ai donc entrepris l'identification de nouvelles cibles directes de Gcm dans les hémocytes.

III.A. Le crible Dam-ID

Pour identifier les cibles putatives directes de Gcm, un crible Dam-ID a été effectué au laboratoire par Anna POPKOVA. Comme une ChIP, le Dam-ID est une méthode permettant d'identifier les loci fixés par une protéine d'intérêt à l'échelle du génome **(Southall and Brand, 2007; van Steensel et al., 2001)**. Cette technique est basée sur le faible taux de méthylation de l'ADN génomique de la drosophile et l'utilisation d'une ADN méthyltransférase (Dam) fusionnée au facteur de transcription d'intérêt. La protéine Dam-Gcm va ainsi méthyler les séquences GATC à proximité des sites de fixation de Gcm. Cette technique a permis d'identifier 1042 cibles putatives directes de Gcm caractérisées par un taux de fausses découvertes (FDR) inférieur à 10^{-3}. Parmi elles, l'analyse d'ontologie des gènes a mis en évidence 26 candidats impliqués dans des processus du système immunitaire. Ils codent pour des facteurs de transcription (*ush, zfh1, pannier*), des membres de la voie JAK/STAT (*STAT92E*) ou de la voie Notch (*notch*, *serrate*), des récepteurs de la phagocytose (*crq*) ou des protéines impliquées dans la migration des hémocytes (*singed, pvf3*).

Figure 42: Gcm peut directement activer *STAT92E in vitro*

A) Carte génomique du locus identifié par le crible Dam-ID correspondant au gène S*TAT92E* (UCSC genome browser) et cartographie des fragments d'ADN correspondant aux rapporteurs *STAT92E(meso)-GFP, STAT92E(2-4)-GFP* et *STAT92E(ΔGBSs)-GFP*. Les GBSs sont indiqués en rouge. B-D) Les cellules S2 ont été transfectées par les rapporteurs *STAT92E(meso)-GFP (B), STAT92E(2-4)-GFP* (C, D : deuxième et troisième puits) ou *STAT92E(ΔGBSs)-GFP* (D : quatrième et cinquième puits) et co-tranfectées avec des quantités croissantes d'un vecteurs d'expression de Gcm-FLAG (un ou deux µg). L'efficacité de la transfection est contrôlée par co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de la β-Gal. L'expression de la β-Gal, de la GFP et de Gcm-FLAG dans les extraits protéiques a été analysée par western blot. UN : cellules non transfectées; 0 : Cellules transfectées par un vecteur d'expression vide. Les histogrammes représentent la quantification de relative de la GFP normalisée par la β-Gal.

III.B. Validation du crible Dam-ID *in vitro* :

STAT92E est une cible de choix pour la validation du crible Dam-ID car, parmi les deux pics de méthylation répertoriés pour ce gène, l'un est localisé dans le promoteur proximal et associé avec trois GBSs (GBSs2-4) **(Fig. 42A)**.

J'ai donc étudié le rôle de Gcm sur la régulation transcriptionnelle de *STAT92E* dans les cellules S2. Un fragment du promoteur proximal de *STAT92E*, d'une taille de 0.6 kb et contenant les trois GBSs (GBSs2-4), a été cloné dans le vecteur *pH-Stinger* en amont de la séquence codante de la GFP pour construire le rapporteur transcriptionnel *STAT92E(2-4)-GFP*. La mutagénèse des trois GBSs a permis de construire le rapporteur muté *STAT92E(2-4)ΔGBSs-GFP* **(Fig. 42A)**. Enfin, le rapporteur transcriptionnel *STAT92E(meso)-GFP*, contenant un GBS (GBS5) a été utilisé comme contrôle négatif . Ce rapporteur récapitule l'expression de *STAT92E* dans les territoires issus du mésoderme, **(Liu et al., 2009)**.

Les cellules ont été transfectées avec les rapporteurs *STAT92E(meso)-GFP* ou *STAT92E(2-4)-GFP*. La cotransfection des cellules avec des concentrations croissantes du vecteur d'expression de *Gcm-FLAG* induit significativement l'expression de *STAT92E(2-4)-GFP* mais pas celle de *STAT92E(meso)-GFP* **(Fig. 42B,C)**. Gcm peut donc spécifiquement activer la transcription de *STAT92E* à travers le promoteur proximal de ce gène. La mutation des trois GBSs abolit complètement l'activation transcriptionnelle de *STAT92E* par Gcm **(Fig. 42C)**. Gcm peut donc directement activer STAT92E dans les cellules S2. Ce résultat démontre la validité du crible Dam-ID qui peut ainsi être utilisé pour l'identification d'autres cibles directes de Gcm.

Figure 43 : Gcm peut activer l'expression de Singed dans les cellules S2. Expériences de cotransfection. Les cellules S2 de drosophiles ont été cotransfectées par un vecteur d'expression de Gcm-FLAG en quantité croissante (de 1 à 3 µg). L'efficacité de la transfection est contrôlée par co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de la β-Gal. UN : cellules non transfectées ; 0 : Cellules transfectées par un vecteur d'expression vide. L'expression de la β-Gal, de la GFP, de Gcm-FLAG et de Singed dans les extraits protéiques des cellules co-transfectées a été analysée par western blot. L'histogramme représente la quantification relative de Singed normalisée par l'actine.

Figure 44 : Gcm est requis pour l'expression de Singed dans les hémocytes

Embryons sauvages ou *Df(2L)132* (*gcm* LOF), stade 13, vue dorsale. Les embryons *Df(2L)132* contiennent une délétion du locus contenant *gcm1*/*gcm2* (*gcm* LOF).

III.C. *singed,* une nouvelle cible directe de Gcm dans les hémocytes

III.C.1. Gcm active Singed

Parmi les 26 cibles putatives directes de Gcm identifiées par Dam-ID, un anticorps est disponible au laboratoire pour six d'entres elles (Pannier, Ush, Crq, Zfh1, Singed et Pvf3). Pour déterminer si Gcm peut activer ces cibles, j'ai transfecté des cellules S2 avec des quantités croissantes d'un vecteur d'expression de Gcm et analysé les extraits protéiques par western blot après 48 h. L'induction d'expression a été détectée uniquement pour la protéine Singed **(Fig. 43)**. Gcm peut donc activer Singed *in vitro*. L'activation des autres cibles nécessite probablement des cofacteurs absents dans les cellules S2 ou une configuration spécifique de la chromatine. *singed* code pour une protéine de type fascine requise pour la migration des hémocytes embryonnaires **(Zanet et al., 2009b)**. De manière intéressante, l'expression de *singed* suit l'expression de *gcm* dans les hémocytes et des animaux mutants pour *gcm* montrent des défauts dans leur migration **(Bernardoni et al., 1997)**. Ces données laissent supposer un rôle de Gcm pour l'expression de *singed in vivo*. J'ai analysé le territoire d'expression de Singed dans des embryons *Df(2L)132,* mutants pour *gcm1/gcm*2 **(Kammerer and Giangrande, 2001)**. La perte des facteurs Gcm1/Gcm2 conduit clairement à une perte de l'expression de Singed dans les hémocytes **(Fig. 44)**. Les facteurs de type Gcm sont donc nécessaires pour l'activation de Singed dans les hémocytes et régulent probablement la migration des hémocytes par l'intermédiaire de cette protéine.

III.C.2. Etude de la régulation transcriptionnelle de *singed*

III.C.2.a. Etude in vitro

J'ai étudié la régulation transcriptionnelle de *singed* en utilisant des rapporteurs transcriptionnels. Deux pics de méthylation ont été détectés par Dam-ID dans le locus de *singed*. Le premier est localisé à environ 4.5 kb en amont du premier site d'initiation de la transcription. Le second se situe en aval au sein du premier intron **(Fig. 45A)**. Chaque pic est associé à deux GBSs vérifiés expérimentalement **(Miller et al., 1998; Ragone et al., 2003)**.

Figure 45 : Gcm peut activer *singed in vitro*. A) Carte génomique du locus identifié par le crible Dam-ID et correspondant au gène *singed* (UCSC genome browser) et cartographie des fragments d'ADN correspondant aux rapporteurs *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*. Les GBSs sont indiqués en rouge. B) Les cellules S2 ont été co-transfectées par *singed(2-3)-GFP* ou *singed(6-7)-GFP* et un vecteur d'expression de Gcm-FLAG en quantité croissante (de 1 à 3 µg). L'efficacité de la transfection est contrôlée par co-transfection des cellules avec un vecteur d'expression de la β-Gal. L'expression de la β-Gal, de la GFP et de Gcm-FLAG a été analysée dans les extraits protéiques des cellules co-transfectées par western blot. UN : cellules non transfectées ; 0 : Cellules transfectées par un vecteur d'expression vide. L'histogramme représente la quantification de relative de GFP normalisée par la β-Gal.

Pour déterminer si Gcm peut activer la transcription de *singed* par l'intermédiaire de ces sites, des rapporteurs transcriptionnels de *singed* ont été générés. Pour cela, des fragments de promoteurs de 118 et 382 pb, contenant chacun une paire de GBSs, ont été isolés et clonés en amont de la GFP dans le vecteur *pH-Stinger* pour générer les rapporteurs correspondants, *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*. Après co-tranfection de ces rapporteurs avec des concentrations croissantes d'un vecteur d'expression de Gcm, seul le rapporteur *singed(6-7)-GFP* est activé dans les cellules S2 **(Fig. 45B)**. Gcm peut donc activer la transcription de *singed* par l'intermédiaire d'un enhancer transcriptionnel spécifique localisé dans l'intron de ce gène.

III.C.2.b. Etude in vivo

Pour étudier la régulation transcriptionnelle de *singed* par Gcm *in vivo*, une souche transgénique portant un autre rapporteur transcriptionnel de *singed*, *singed(hemo)-lacZ*, a été utilisée (gentiment fourni par le S. PLAZA). *singed(hemo)-lacZ* contient un fragment d'environ 0.5 kb du gène *singed* (*singed(hemo)*) inséré en amont de la séquence codante de la β-Gal. *singed(hemo)* contient les mêmes GBSs que le rapporteur rapporteur *singed(6-7)-GFP* **(communication personnelle)**. Dans les embryons *singed(hemo)-lacZ*, la β-Gal est spécifiquement exprimée dans les hémocytes (**Fig. 46**). L'expression ectopique de Gcm dans la région neurogénique induit une expression ectopique de *singed(hemo)-lacZ* (**Fig. 46**). J'ai ainsi mis en évidence que Gcm peut activer l'expression du transgène *singed(hemo)-lacZ* dans la région neurogénique *in vivo*. En parallèle, l'équipe du Dr. PLAZA a montré que la mutagénèse des GBSs présents abolit l'expression du rapporteur dans les hémocytes **(donnée non publiée, Dr. PLAZA)**. L'ensemble de ces données montre que le fragment *singed(hemo)* constitue donc un enhancer transcriptionnel hémocytaire directement activé par Gcm.

Figure 46 : Gcm peut activer singed dans le territoire neurogénique.

Embryon sauvage (A,D,G) ou *sca>gcm(M24A)* (*gcm* GOF) (B,E,H). Le transgène *singed(hemo)-lacZ* a été utilisé pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *singed*. Projections confocales d'embryons marqués par Repo et la β-Gal, stade 14, vue ventrale. C,F,I) Haute résolution de l'embryon représenté en B,E,H. La ligne pointillée délimite le territoire d'expression ectopique de *singed(hemo)-lacZ*. Barre d'échelle : 100 µm.

III.D. Repo réprime *singed* dans une sous-population de cellules gliales.

Une cible directe de Gcm dans les hémocytes, *singed*, a été d'abord mise en évidence par le crible Dam-ID puis vérifiée expérimentalement *in vivo* et *in vitro*. De manière intéressante, l'expression du transgène *singed(hemo)-lacZ,* dont l'expression dépend directement de Gcm, n'est pas activée dans la glie. Pour déterminer si *repo* réprime *singed* dans la glie, j'ai analysé l'expression de *singed(hemo)-lacZ* dans des animaux sauvages ou mutants pour le gène *repo* (*repo* LOF) (**Fig. 47, A-H**). La glie présomptive est visualisée en suivant l'expression du transgène *repo-nGFP*. La perte de *repo* induit l'expression ectopique de *singed(hemo)-lacZ* dans une sous-population de cellules gliales présomptives localisées ventralement. Ce phénotype n'est jamais observé dans les cellules gliales associées au neuropile, les mêmes qui expriment ectopiquement les facteurs de transcription hémocytaires Srp et Ush après la perte de *repo*. En outre, aucune cellule gliale présomptive ne coexprime *singed(hemo)-lacZ* et le marqueur pan-neuronal Elav excluant la possibilité d'une conversion neuronale (**Fig. 47, I-L**). Les cellules gliales présomptives exprimant ectopiquement *singed(hemo)-lacZ* constituent donc un sous-type indépendant de cellules gliales. Selon leur position à la surface ventrale de la VNC, ces cellules constituent vraisemblablement une sous-population de SPGs présomptives. En conclusion, la perte de *repo* conduit à l'activation de différents marqueurs hémocytaires ou neuronaux dans différentes population de cellules gliales.

III.E. Discussion et perspectives

Le facteur de transcription Gcm constitue un déterminant clé de l'identité cellulaire. Gcm est exprimé dans les NCSs où il constitue le gène maître pour la production de cellules gliales, cellules impliquées dans le développement du système nerveux et la maintenance des fonctions neurologiques (**Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996**). Durant la gliogénèse, ce facteur de transcription agit comme un interrupteur moléculaire entre le destin glial et le destin neuronal de la cellule. Gcm agit alors à travers ses cibles directes qui sont impliquées dans la différenciation terminale de la glie et la répression du destin neuronal (**Akiyama et al., 1996; Lee and Jones, 2005; Yuasa et al., 2003**).

Figure 47 : Repo réprime *singed* dans une sous-population de cellules gliales.

Embryons sauvages (A,C) ou mutants (B,D-G,I-L) pour le gène *repo* (*repo* LOF). Le transgène *repo-nGFP* a été utilisé pour visualiser les cellules gliales présomptives et le transgène *singed(hemo)-lacZ* pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *singed*. L'étude de la VNC a été divisée en deux parties : la partie dorsale et la partie ventrale (**voir publication 2, Fig. S7**). La ligne pointillée indique la ligne médiane. Projections confocales d'embryons marqués avec la GFP, la β-Gal et Elav. E-F) Haute résolution de l'embryon montré en D, section confocale. Un marquage β-Gal ectopique est observé dans les embryons *repo* LOF (têtes de flèches). H) Histogramme représentant le nombre de cellules exprimant à la fois la GFP et la β-Gal des embryons sauvages ou *repo* LOF par six segments. Les pourcentages indiqués représentent la proportion totale de cellules par rapport au nombre total de cellules gliales. Barre d'échelle : 100 µm.

Durant le développement précoce de l'embryon, Gcm est aussi exprimé dans les précurseurs des hémocytes ou il déclenche la différenciation des plasmatocytes, macrophages circulants dans l'hémolymphe **(Bernardoni et al., 1997)**. Contrairement à son rôle dans la gliogénèse, le rôle précis de Gcm dans les précurseurs hémocytaires reste mal compris et les cibles directes de Gcm dans les hémocytes n'ont pas encore été nécessairement mises en évidence. En réalité, les connaissances actuelles reposant sur des cribles ayant identifiés des gènes positivement ou négativement régulés par Gcm **(Altenhein et al., 2006; Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003)**. Au vus de l'excellente conservation des bases moléculaires de l'hématopoïèse dans l'évolution **(Evans et al., 2003; Lebestky et al., 2000)**, il est important d'identifier les cibles directes de Gcm dans les hémocytes.

Le crible Dam-ID **(Southall and Brand, 2007)** effectué par le Dr. Anna POPKOVA au laboratoire a permis d'identifier pour la première fois les cibles putatives directes de Gcm. Parmi ces cibles, la première que j'ai validée *in vitro* est le gène *STAT92E*. Ce gène est connu pour jouer un rôle majeur dans l'homéostasie des hémocytes, l'hyperactivation de la voie JAK/STAT conduisant à la formation de tumeurs mélanotiques **(Ekas et al., 2010)**. De manière intéressante, un rôle de *gcm* comme régulateur négatif de la voie JAK/STAT a été mis en évidence au laboratoire. En outre, la perte de fonction de *gcm* par une approche « dominant négatif » induit également la formation de tumeurs mélanotiques **(Jacques et al., 2009)**. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de la régulation transcriptionnelle de STAT92E *in vivo*. Pour cela, des souches transgéniques portant les rapporteurs transcriptionnels sauvages (*STAT92E-GFP*) et mutés pour les sites GBSs (*STAT92E(ΔGBSs)-GFP*) pourraient être générées. Si Gcm est nécessaire à l'activation de *STAT92E* dans les hémocytes, nous attendons que la mutation des GBSs abolisse l'expression de la GFP dans le mésoderme procéphalique.

Ma recherche des cibles directes de Gcm dans les hémocytes a aussi permis la validation de *singed* comme telle. De manière intéressante, la perte de fonction de *gcm* conduit à des défauts migratoires des hémocytes **(Bernardoni et al., 1997)**, un phénotype similaire à ce qui est observé après la perte de fonction de *singed* **(Zanet et al., 2009b)**. Puisque Gcm active directement *singed* dans les hémocytes, Gcm régule probablement la migration de ces cellules à travers *singed*. Pour vérifier cela, *singed* pourrait être surexprimé dans les hémocytes d'animaux mutants nuls pour *gcm1/gcm2*. Si *singed* agit en aval de *gcm*, nous attendons une complémentation du phénotype migratoire. Une complémentation totale révèlerait le rôle majeur

l'interaction entre *gcm* et *singed* dans la migration des hémocytes tandis qu'une complémentation partielle impliquerait l'existence d'autres facteurs agissant en aval de *gcm*.

Durant mon travail de thèse, j'ai aussi tenté de valider d'autres cibles putatives directes de Gcm identifiées dans le crible Dam-ID : les gènes *srp*, *ush* et *crq*. Pour cela, des petits rapporteurs transcriptionnels contenant des fragments de promoteur de ces gènes, localisés au niveau du pic de méthylation et contenant au moins un GBS, ont été construits. Aucune activation transcriptionnelle de ces rapporteurs par Gcm n'a pu être mise en évidence dans les cellules S2. Ces données suggèrent que, pour activer directement ces gènes, Gcm nécessite des cofacteurs absents des cellules S2. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation transcriptionnelle de ces gènes d'autres types de cellules comme les cellules Kc 167 **(Echalier and Ohanessian, 1969)**.

Repo est un facteur clé pour la consolidation du destin glial et la différenciation tardive de la glie. Il est également nécessaire pour réprimer le destin neuronal et le destin hémocytaire durant la gliogénèse (**publication 2, Fig. 7**). Les embryons mutants pour le gène *rep*o montrent une expression ectopique du marqueur hémocytaire *singed(hemo)-lacZ* dans une sous-population de cellules gliales localisée à la surface de la VNC. Repo est donc nécessaire pour réprimer au moins une cible directe de Gcm, spécifique des hémocytes, durant la gliogénèse. La perte de *repo* conduit aussi à l'expression ectopique des facteurs de transcription hémocytaires Srp et Ush la glie associée au neuropile (**publication 2, Fig. 6**) et à l'expression ectopique du marqueur neuronal Elav dans la glie associée au cortex et au neuropile (**publication 2, Fig. 7**). Ainsi, les embryons mutants pour le gène *repo* révèlent différents potentiels dans différents sous-types de glie **(Beckervordersandforth et al., 2008; Ito et al., 1995)**. Pour mieux comprendre ces différents potentiels, il serait très intéressant de caractériser l'ensemble de ces phénotypes à une résolution cellulaire. Puisque la perte de *repo* conduit à des défauts dans le positionnement des cellules gliales ainsi qu'à une perte des marqueurs de lignage au niveau protéique, une meilleure caractérisation des phénotypes pourrait être obtenue par l'utilisation de rapporteurs transcriptionnels pour visualiser précisément les différents sous-types de glie **(Beckervordersandforth et al., 2008; Ito et al., 1995)**.

Il serait également intéressant de déterminer le mode d'action de *repo* sur *singed*. Dans le but de déterminer les sites putatifs de fixation de Repo à l'échelle du génome, des expériences de ChIP-seq sont actuellement en cours au laboratoire. Une fois le(s) RBS(s) putatif(s) identifié(s), la régulation transcriptionnelle de *singed* par Repo pourrait être étudiée dans les cellules S2 par des expériences de co-transfection. Pour cela, des rapporteurs transcriptionnels de *singed*, mutés ou non pour le(s) RBS(s) putatif(s) seraient construits puis co-transfectés dans les cellules S2 avec un vecteur d'expression de Repo.

Publication 3 :

The gcm/glide molecular pathway : new actors and new lineages.

IV. THE GCM/GLIDE MOLECULAR PATHWAY : NEW ACTORS AND NEW LINEAGES. RÉSUMÉ DE LA PUBLICATION

IV.A. Contexte scientifique général

Le facteur de transcription Gcm constitue un déterminant de l'identité cellulaire dans différents tissus. Durant le développement du système nerveux embryonnaire, il agit comme un interrupteur moléculaire entre neurones et cellules gliales. Il joue également un rôle clé dans d'autres territoires tels que les précurseurs hématopoïétiques ou les cellules de tendons.

Le dosage de Gcm est un paramètre clé qui doit être précisément contrôlé pour permettre l'établissement d'un programme de différenciation spécifique. Au sein du système nerveux, le contrôle du niveau d'expression de *gcm* permet la production du nombre approprié de neurones ou de cellules gliales requis pour l'élaboration d'un système nerveux fonctionnel. Aussi, la surexpression de Gcm dans les hémocytes conduit à une gliogénèse ectopique dans ce territoire.

gcm est ainsi précisément régulé, et ce, par un contrôle combinatoire à tous les niveaux de l'expression du gène. Une combinaison de facteurs de transcription contrôle d'abord la transcription initiale de *gcm* selon les axes A/P, D/V et temporel. Gcm peut aussi s'autoréguler en présence de cofacteurs spécifiques. Enfin, le contrôle post-transcriptionnel est basé sur l'instabilité intrinsèque de l'ARNm de *gcm* et de la protéine correspondante. La demi-vie de la protéine Gcm est en particulier contrôlée par un mécanisme de dégradation via son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome.

Ces résultats soulèvent la nécessité d'outils permettant l'étude de Gcm au niveau protéique. L'impossibilité de produire des anticorps stables et spécifiques a longtemps freiné la caractérisation de la protéine Gcm *in vitro* et *in vivo*. Jusqu'à présent, l'expression de la protéine Gcm, sa régulation et ses partenaires étaient étudiés indirectement par l'utilisation de rapporteurs transcriptionnels ou de systèmes couplés. Pour contourner ce problème, nous avons développé une stratégie basée sur le marquage de Gcm par un épitope FLAG pour visualiser cette protéine *in vitro* et *in vivo*.

IV.B. Résultats

IV.B.1. Caractérisation de la protéine Gcm-FLAG

Pour permettre la détection de la protéine Gcm, celle-ci a été marquée par l'épitope FLAG à l'extrémité C-terminale. La protéine recombinante Gcm-FLAG peut être alors facilement analysée par western blot ou visualisée par immunofluorescence. Elle peut être également facilement immunoprécipitée pour permettre l'identification de nouveaux partenaires. Nous avons aussi caractérisé l'activité de la protéine Gcm-FLAG de plusieurs manières. 1) Gcm-FLAG active les rapporteurs transcriptionnels de *repo* et de *gcm*, cibles directes connues de Gcm (**Fig. 1A**); 2) La transfection d'un vecteur d'expression de Gcm ou de Gcm-FLAG active le rapporteur transcriptionnel *repo(4.3kb)-GFP* avec la même efficacité (**Fig. 1B**); 3) L'expression ectopique de la protéine Gcm-FLAG dans la région neurogénique conduit à une gliogénèse ectopique (**Fig. 2**). Ces résultats démontrent que la protéine Gcm-FLAG est fonctionnelle *in vivo* et *in vitro* et qu'elle agit avec la même efficacité que la protéine Gcm sauvage.

IV.B.2. Génération et caractérisation des souches transgéniques *gcm-FLAG*^{BAC}

Une analyse physiologique de *gcm* requiert la présence de l'intégralité de son unité transcriptionnelle sous le contrôle de son propre promoteur. Puisque *gcm* a la propriété d'avoir une régulation transcriptionnelle complexe, une région chromosomique de 36.5 kb contenant le locus de *gcm* a été recombinée dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) pour construire les souches transgénique *gcm*^{BAC} et *gcm-FLAG*^{BAC} (**Fig. 3C**). A l'état homozygote, les souches *gcm*^{BAC} et *gcm-FLAG*^{BAC} sont capables de sauver la létalité des souches mutantes pour *gcm* (**Fig. 3B, D, E ; Table1**). Ces données indiquent que les transgènes *gcm*^{BAC} et *gcm-FLAG*^{BAC} sont pleinement fonctionnels *in vivo*.

La génération des souches *gcm-FLAG*^{BAC} permet pour la première fois la caractérisation du territoire d'expression de Gcm au niveau protéique. Des embryons mutants pour *gcm* et portant le transgène *gcm-FLAG*^{BAC} à l'état homozygote ont été immunomarqués avec un anticorps anti-FLAG (**Fig. 4**). L'expression transitoire de Gcm-FLAG a été détectée dans tous les territoires d'expression embryonnaires connus de Gcm : les cellules gliales, les hémocytes et

les cellules de tendons. Ces nouvelles données complètent parfaitement les connaissances actuelles sur l'activité de Gcm.

L'expression transitoire de Gcm-FLAG a en plus été mise en évidence dans des territoires encore non caractérisés (**Fig. 5**). Comme ce qui avait été démontré durant le développement post-embryonnaire, l'expression de Gcm-FLAG a été détectée dans quelques neurones au niveau du cerveau. Gcm-FLAG a aussi été détectée dans deux clusters bilatéraux de cellules localisés dans la région céphalique ainsi que dans des clusters composés de trois ou quatre cellules localisés dorsolatéralement. Ces derniers sont systématiquement présents dans six segments. Leur présence est par contre variable dans les segments thoraciques. De part leur localisation stéréotypée, ces derniers correspondent à des cellules péritrachéales.

IV.B.3. Gcm est exprimé et requis dans les cellules péritrachéales

J'ai moi-même exploré le rôle de Gcm dans les cellules péritrachéales. A cause de leurs fonctions dans l'ecdysis et le processus de mue chez les insectes, les cellules péritrachéales ont été précisément caractérisées chez la larve. La morphologie de ces cellules a pu être visualisée au troisième stade larvaire par l'utilisation de la souche *gcm-Gal4; UAS-mCD8GFP*, ainsi dirigeant l'expression de la GFP au niveau de leurs membranes. Trois cellules, fermement associées à la trachée, expriment *gcm* à chaque hémisegment (**Fig. 6A-D**). L'une d'entre-elle montre une arborescence élaborée de ses protrusions cytoplasmiques. La morphologie de cette dernière est similaire à celle des cellules Inka identifiées chez les insectes *Manduca sexta* et *Bombyx mori*. Les cellules Inka sont des cellules neurosécrétrices localisées le long du système respiratoire. Dans une cellule de chaque cluster péritrachéal, l'expression de *gcm* colocalise avec deux marqueurs des cellules Inka : PHM (Peptidylglycine α–Hydrolylating Monoaxygénase), une enzyme d'amidation requise pour la synthèse des neuropeptides amidés, et DIMMED, un facteur de transcription de type bHLH requis pour la différenciation des cellules peptidergiques (**Fig. 6E-F**). *gcm* est donc exprimé dans trois cellules péritrachéales par hémisegment dont la cellule Inka.

Pour étudier le rôle de *gcm* dans le développement des cellules péritrachéales, plusieurs combinaisons d'allèles hypomorphes et nuls de *gcm* ont été analysées et une corrélation a été observée entre le dosage de *gcm* et le nombre de cellules Inka et péritrachéales (**Fig. 7**). En

conclusion, Gcm est exprimé et requis dans un nouveau type de cellules neurosécrétrices indispensables pour initier le signal hormonal déclenchant le phénomène de mue chez les insectes.

IV.B.3. Gcm et le métabolisme des miRNAs

En plus d'apporter de nouvelles informations sur son territoire d'expression, la protéine Gcm marquée par l'épitope FLAG constitue un nouvel outil pour l'étude des mécanismes contrôlant l'expression de Gcm au niveau post-transcriptionnel. Nous avons démontré que Gcm peut être directement régulé par miR-279, un miRNA critique pour le développement du système nerveux (**Fig. 8, 9**). 1) La surexpression de miR-279 dans le territoire neurogénique d'embryons *gcm-FLAG*^{BAC} conduit à une diminution de l'expression de la protéine Gcm-FLAG. 2) Dans des cellules S2 transfectées par un vecteur d'expression de Gcm-FLAG contenant la région non traduite en 3' (3' UTR) de *gcm*, l'expression de la protéine Gcm-FLAG diminue après cotransfection par un vecteur d'expression de miR279. 3) La mutation du site de fixation de miR279 lève cette répression. miR279 est donc un régulateur négatif de Gcm, cependant, le rôle de miR279 dans la gliogénèse reste incompris. De manière intéressante, plusieurs autres acteurs du métabolisme des miRNAs ont été identifiés comme des cibles de Gcm. J'ai moi-même mis en évidence que *gcm* peut activer le miRNA miR-1 dans les hémocytes embryonnaires. Gcm peut également activer aussi bien *in vivo* que *in vitro* la protéine Argonaute-1 (Ago-1), protéine clé de la biosynthèse et de la fonction des miRNA. Puisque la protéine Ago1 est exprimée de manière ubiquitaire dans l'embryon, Gcm pourrait ainsi constituer un nouveau type de contrôle cellule-spécifique du métabolisme de miRNA.

IV.C. Conclusion

Gcm constitue un gène clé dans plusieurs processus de différenciation cellulaire. En se basant sur l'utilisation d'une protéine marquée par un épitope FLAG et la technologie du BAC, des souches transgéniques *gcm-FLAG*^{BAC} ont été générées. La construction des souches *gcm-FLAG*^{BAC} ouvre un nouveau champ de recherche sur l'étude des régulations post-

transcriptionnelles de Gcm et leurs rôles dans les voies de différenciation impliquant ce facteur de transcription. Typiquement, nous avons aussi mis en évidence un lien étroit entre Gcm et le métabolisme des miRNAs : pendant qu'AGO-1 et miR-1 sont des cibles de Gcm, Gcm est négativement régulé par miR-279. Nous avons démontré que la protéine Gcm-FLAG peut être efficacement immunoprécipitée. De futurs travaux viseront à identifier les partenaires protéiques et nucléiques de Gcm et leurs rôles dans les processus de différenciation impliquant Gcm.

L'analyse des souches transgéniques *gcm-FLAG*^{BAC} nous a permis de révéler pour la première fois la dynamique du territoire d'expression de Gcm au niveau protéique. J'ai moi-même découvert un nouveau rôle de Gcm dans la différenciation des cellules péritrachéales et en particulier des cellules de type Inka. Ces cellules jouent un rôle particulier dans l'ecdysis, un processus permettant à l'organisme de se débarrasser de son ancienne cuticule à travers des séries de contractions. Ce phénomène est initié par une cascade hormonale complexe. Localisées le long du système respiratoire, les cellules Inka sécrètent l'ETH (Ecdysis-Triggering Hormone) tandis que les neurones ventromédials (VM), dans le système nerveux central (CNS), relâchent en retour l'EH (Eclosion Hormone). De manière surprenante, bien que Gcm semble exprimé de manière transitoire dans les cellules péritrachéales embryonnaires, l'expression des transgènes *gcm-Gal4; UAS-mCD8GFP* reste détectable dans ces cellules jusqu'au troisième stade larvaire. Cette expression tardive ne peut s'expliquer par la stabilité intrinsèque de la GFP. Il serait donc intéressant de rechercher un rôle de Gcm dans les cellules péritrachéales aux stades larvaires. Par exemple, un knock-down conditionnel de Gcm dans les cellules péritrachéales pourrait nous indiquer si Gcm est requis pour la régulation de l'ecdysis ou pour la production d'ETH aux stades larvaire.

Developmental Biology 375 (2013) 65–78

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

Evolution of Developmental Control Mechanisms

The Gcm/Glide molecular and cellular pathway: New actors and new lineages

Pietro Laneve, Claude Delaporte, Guillaume Trebuchet, Orban Komonyi [1], Hakima Flici, Anna Popkova [2], Giuseppe D'Agostino, Francesca Taglini [3], Irene Kerekes, Angela Giangrande *

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67404, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 October 2012
Received in revised form
18 November 2012
Accepted 14 December 2012
Available online 28 December 2012

Keywords:
Drosophila melanogaster
Gcm/Glide
FLAG-tagging
*AGO*1
MicroRNAs
Peritracheal cells
BAC recombineering

ABSTRACT

In *Drosophila*, the transcription factor Gcm/Glide plays a key role in cell fate determination and cellular differentiation. In light of its crucial biological impact, major efforts have been put for analyzing its properties as master regulator, from both structural and functional points of view. However, the lack of efficient antibodies specific to the Gcm/Glide protein precluded thorough analyses of its regulation and activity *in vivo*.

In order to relieve such restraints, we designed an epitope-tagging approach to "FLAG"-recognize and analyze the functional protein both *in vitro* (exogenous Gcm/Glide) and *in vivo* (endogenous protein).

We here (i) reveal a tight interconnection between the small RNA and the Gcm/Glide pathways. *AGO*1 and *miR*-1 are Gcm/Glide targets whereas *miR-279* negatively controls Gcm/Glide expression (ii) identify a novel cell population, peritracheal cells, expressing and requiring Gcm/Glide. Peritracheal cells are non-neuronal neurosecretory cells that are essential in ecdysis.

In addition to emphasizing the importance of following the distribution and the activity of endogenous proteins *in vivo*, this study provides new insights and a novel frame to understand the Gcm/Glide biology.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The differentiation of the Nervous System (NS) relies on the coordinated expression of cell-specific transcription factors that allocate distinct fates during development. In *Drosophila*, the Gcm/Glide gene (*gcm* in the following text) codes for a potent transcription factor of the Zinc finger family that is expressed in the glial lineages (reviewed in Trebuchet and Giangrande, 2012). Its role is to dictate the choice between neurons and glia in multipotent neural precursors, as most glia are converted into neurons in animals lacking the *gcm* gene (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996; Miller et al., 1998; Flici et al., 2011). Moreover, its threshold levels are sufficient to promote gliogenesis when ectopically expressed within and outside the neurogenic region. Finally, *gcm* is required in additional cell types, including postembryonic neuronal subpopulations (Yoshida et al., 2005; Chotard et al., 2005; Colonques et al., 2007; Soustelle and Giangrande, 2007a; Soustelle et al., 2007), tendons (Soustelle et al., 2004) and blood cells (Bernardoni et al., 1997; Alfonso and Jones, 2002; Bataillé et al., 2005; Jacques et al., 2009).

Gcm requires a tight, multi-layered modulation of its activity, exerted through (i) a fine transcriptional control which benefits from a modular organization of the *gcm* promoter, where distinct factors act in a spatio-temporal specific fashion (Jones et al., 2004; Ragone et al., 2003), (ii) an asymmetric segregation of *gcm* RNA between neural precursor daughter cells, thus committed to be neuron or glia, (Akiyama-Oda et al., 1999; Bernardoni et al., 1999; Ragone et al., 2001), (iii) a short-lasting activity. This last feature relies on the intrinsic instability of both *gcm* RNA (Soustelle et al., 2008) and protein (Akiyama et al., 1996; Miller et al., 1998; Yang et al., 2005). In particular, Gcm protein degradation has been recently pointed out as a crucial post-translational process: mutations in the proteasome affect Gcm kinetics and, as a consequence, glial proliferation (Ho et al., 2009). Moreover, different cofactors modulate Gcm activity (Jacques et al., 2009; De Iaco et al., 2006; Popkova et al., in press). Altogether, these observations stress the importance of following Gcm expression at the protein level.

* Corresponding author. Fax: +33 388653201.
E-mail address: angela@igbmc.fr (A. Giangrande).
[1] Present Address: Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UPR 9022, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France.
[2] Present Address: Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR-5203, U661, Universités de Montpellier 1, Montpellier, F-34094, France.
[3] Present Address: Wellcome Trust Centre for Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, United Kingdom.

0012-1606/$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.014

These reasons, together with the accumulating evidence that post-translational regulation plays an essential role in signaling cascades, made it ineluctable to set up approaches for detecting Gcm. The high inefficiency of the α-Gcm antibodies, prompted us to design an alternative, epitope-tagging based strategy to visualize the Gcm protein *in vivo* and *in vitro*. We also develop a flagged BAC transgenic stock (Venken et al., 2006; Bischof et al., 2007) fully rescuing the *gcm* mutation and allowing us to characterize unexplored aspects of the Gcm pathway.

We first validate that the FLAG-Gcm fusion is active. We provide the embryonic developmental profile of the transiently expressed Gcm protein and we identify peritracheal cells, a component of the neurosecretory system involved in ecdysis, as a novel cell type expressing and requiring Gcm. Finally, we reveal *gcm*/Gcm post-transcriptional regulation via the microRNA *miR*-279 and show that the Gcm protein affects the miRNA pathway, controlling the expression of *AGO*1 and *miR*-1.

In sum, the present work explores new aspects of a pathway that is essential in several developmental processes and opens novel perspectives in the field.

Material and methods

Flies and Genotypes

Flies were kept at 25 °C, w^{1118} was used as a wild-type (*WT*) strain. The gcm^{26}/*CyO, twist-lacZ* allele, the gcm^{rA87} enhancer trap line (carrying a *lacZ* insertion into the *gcm* promoter) and the point mutant gcm^{N7-4}/*CyO, twist-lacZ* are described in (Vincent et al., 1996) gcm^{34}/*CyO, twist-lacZ* was used as a hypomorphic allele (Bernardoni et al., 1997). The *Df*(2*L*)132/*CyO, twist-lacZ* strain (carrying a large deletion encompassing the *gcm* and *gcm*2 loci (Lane and Kalderon, 1993)) is described in Kammerer and Giangrande (2001).

The *UAS–gcm* (*M24A*) line was used for ectopic expression of two doses of *gcm* (Bernardoni et al., 1998) and the *UAS–miR*-279 line (gift of E. Lai, (Cayirlioglu et al., 2008)) for overexpression *sca-Gal*4 was used as a driver in the neurogenic territories, *gcm–Gal*4 as a driver in all *gcm*-expressing lineages, *hs-Gal*4 as a ubiquitous, inducible driver (heat shock experiments were performed like in Flici et al. 2011). All the drivers were from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. *UAS–mCD8GFP* (targeting GFP to the membrane), UAS-*luc*ORF$^{WTluc3'UTR}$ and UAS-*luc*ORF$^{WTgcm3'UTR}$ were utilized as reporters. Luc-based flies are described in (Soustelle et al., 2008). The rescued stocks are: gcm^{26}/gcm^{26}; gcm^{BAC}/gcm^{BAC} and gcm^{26}/gcm^{26}; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/*TM*6, *Tb*. Furthermore a double homozygous strain was established: *Df*(2*L*)132/*Df*(2*L*)132; gcm^{BAC}/gcm^{BAC}.

The following genotypes were used in the rescue tests: gcm^{N7-4}/*CyO, twi-lacZ*; $gcm^{BAC}/+$ was crossed with *Df(2L)132/CyO, twist-lacZ*; $gcm^{BAC}/+$ and gcm^{N7-4}/*CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}/+$ was crossed with *Df(2L)132/CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}/+$. gcm^{26}/*CyO, twist-lacZ*; $gcm^{BAC}/+$ was crossed with *Df(2L)132/CyO, twist-lacZ*; $gcm^{BAC}/+$ and gcm^{26}/gcm^{26}; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/*TM6, Tb was* crossed with *Df(2L)132/CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}/gcm\text{–}FLAG^{BAC}$.

UAS–gcm–FLAG flies were generated by classic germline transformation, gcm^{BAC} and $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ flies by targeted transgenesis into the ZH-attP-68E genomic site (III chromosome), according to Bischof et al. (2007).

Oligonucleotides

All the oligonucleotides employed are listed in Supplementary Table 1.

Plasmids

The *pUAST–gcm–FLAG* construct is described in (Jacques et al., 2009).

*pPac*5*c–miR*-279. A region encoding for *miR*-279 was amplified through oligonucleotides (oligos) *miR*-279 *clon* 100 *FW* and *miR*-279 *clon* 100 *RV* from a genomic DNA template and cloned into the *pPac*5*c* expression vector. The construct was then modified removing the *Actin* termination signal from the backbone of *pPac*5*c* by restriction enzyme digestion. A similar procedure was used for cloning *miR*-286, using the oligos *miR*-286 *clon* 100 *FW* and *miR*-286 *clon* 100 *RV*.

*pPac*5*c–gcm–FLAG*/3′*UTR*. The 3′UTR of *gcm* was amplified from genomic DNA with the oligos *gcm* 3′*UTR Kpn FW* and *gcm* 3′*UTR Not RV*, and cloned downstream to the FLAG cassette of the *pPac*5*c–gcm–FLAG* vector (Ho et al., 2009). A mutant version of *pPac*5*c–gcm–FLAG*/3′*UTR* construct (*pPac*5*c–gcm–FLAG*/3′*UTR mut*) was derived by inverse PCR with oligos *gcm* 3′*UTR mut FW* and *gcm* 3′*UTR mut RV*.

4.3 kb *repo–RFP*. A fragment of 4.3 kb of the *repo* promoter (Jones et al., 2004) was digested from the *pCasper-hs-lacZ* plasmid (gift of B.W. Jones) and subcloned into the *pRed*and *pGreen-H-pelican* vector (KpnI-NotI restriction). A GFP reporter was derived similarly (4.3 kb *repo–RFP*).

6 kb *gcm–Gal*4.6 kb of the *gcm* upstream region were isolated from a recombinant phage (Sorrentino and Giangrande, unpublished data) and cloned in the *pCasper-Gal*4 vector (see Ragone et al., 2003).

Cell culture and transfections

Schneider's 2 (S2) cells were grown at a density comprised between 3 and $10*10^6$ cells/ml in Schneider's conditioned medium, complemented with 10% heat inactivated Fetal Calf Serum and 0.5% Penicillin/Streptomicine.

1–3 μg of total DNA mix was transfected using the Effectene Kit (Qiagen), according to manifacturer's instructions. 0.5–1 μg of *Actin-Gal*4 construct (*pBSK-Actin-Gal*4) was utilized as inducer of the UAS-mediated gene expression. *pUAST–gcm–FLAG* was used for Gcm–FLAG ectopic expression, *pUAST–gcm* (Bernardoni et al., 1997), for WT Gcm overexpression and *pUAST–eGFP* or *pPac*5*C-lacZ* as transfection controls. Cells were harvested at specific timepoints in Lysis Buffer for extract preparation (see below).

Western blot assay

Protein expression was detected from 10 to 20 μg of total protein lysate (extracted by freezing-thawing cell pellets in 400 mM KCl, 25 mM Tris HCl, pH 7.9, 10% glycerol) by using the following primary antibodies: mouse-α-FLAG (F3165, Sigma Aldrich, 1:5000 working dilution), rabbit-α–GFP (A-11122, Molecular Probes, 1:2000) rabbit-α-actin (A2066 Sigma Aldrich, 1:5000), mouse-α-β-Gal (G-4644 Sigma Aldrich, 1:1000), rabbit-α–AGO1 (ab5070, Abcam 1:2000). Donkey-α-mouse HRP and goat-α-rabbit HRP (Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies (1:10000). 200 μg of embryonic extracts (produced from the crosses *sca-Gal*4/+;$gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/*UAS–mCD8GFP* X *UAS–miR*-279 and *sca-Gal*4/+; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/*UAS–mCD8GFP* X w^{1118}, as a control) were fractionated on gradient acrylamide gels (Invitrogen) and Gcm–FLAG was detected by using 1:500 diluted F3165 antibody.

Immunocytochemistry (ICC), Immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization

S2 cells (seeded onto coverslips), dechorionated embryos or manually dissected tracheae from third instar larvae were fixed in

4% formaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized with 0.3% Triton-x 100, blocked by 0.5% Blocking Reagent (Roche) in PBST for 1 h and labeled overnight at 4 °C with the following antibodies: rabbit-α-FLAG antibody (ab1162 Abcam, 1:5000) previously pre-absorbed on S2 cells, chicken-α-GFP antibody (ab13970 Abcam, 1:5000), mouse-α-Repo (8D12, DSHB 1:50) and rat-α-Elav (7E8A10 DSHB, 1:100), mouse α-β-Gal (G4644 Sigma Aldrich, 1:200), rabbit α-DIMMED (1/750) and rabbit α–PHM (1/750) (these two latter, kindly provided by P.H.Taghert). Secondary antibodies were FITC-, Cy3-, Cy5-conjugated (1:500, Jackson ImmunoResearch). Nuclei were counterstained with DAPI.

In situ hybridization assays on embryos (genotyped through the *CyO, twist-lacZ* balancer) were done as in (Bernardoni et al., 1997), using a DIG-*gcm* RNA probe (1:100).

Imaging and cell counting

Images were taken with SP5 Leica confocal microscopes and processed using ImageJ, Adobe Photoshop CS3 and Adobe Illustrator CS5. Imaris software was used to generate 3D reconstructions.

Northern blot assay

1–2 μg of denatured total RNA were loaded onto 10% Acrylamide: Bis-Acrylamide gel in 1 × MOPS buffer, blotted onto XL nitrocellulose membrane and crosslinked by 2 h-heating at 60 °C in 0.16 M l-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC), 0.15 M 1-Methylimidazole. Filters were pre-hybridized in 2 × SSC, 1% SDS and hybridized overnight in the same solution in the presence of terminally ^{32}P-labeled *antisense miR*-279, *antisense miR*-1 or *antisense 5s rRNA* primers. Filters were washed into 0.1 × SSC, 0.2% SDS and revealed by autoradiography or by Typhoon imager (Amersham Pharmacia) acquisition.

Reverse transcription and qPCR

In vivo Luc assay: stage 11 embryos were collected from *sca-Gal4/+*; *Luc-gcm 3′UTR/UAS-mCD8GFP* X *UAS-miR-279* (or X w^{1118}) crosses and from *sca-Gal4/+*; *Luc-WT 3′UTR/UAS-mCD8GFP* X *UAS-miR-279* (or *X* w^{1118}) crosses.

Endogenous *gcm* expression analysis: stage 12 embryos were collected from *sca-Gal4/+; gcm–FLAG^{BAC}/UAS–mCD8GFP* X *UAS–miR*-279 cross and from *sca-Gal4/+; gcm–FLAG^{BAC}/UAS–mCD8GFP* X w^{1118} cross (as a control).

1 μg of total RNA was extracted, retrotranscribed and qPCR amplified with Luciferase specific (*Ffly FW* and *Ffly RV*) or FLAG specific (*gcm F3 and FLAG qPCR RV*) oligos, according to Flici et al. (2011). Collected values, derived from three amplification reactions, each performed on three independent experiments, were normalized to mCD8GFP amount (oligos *mCD8GFP FW* and *mCD8GFP RV*).

Statistics

Experiments were performed in at least three biological replicates. Statistical relevance was assigned calculating means and standard errors and analyzed using Student's t-test.

Results and discussion

Multi-faceted analysis of Gcm–FLAG expression and activity in cultured cells

Over the years, several laboratories attempted to generate specific and efficient antibodies against Gcm (Jones et al., 1995; Bernardoni et al., 1997; Ho et al., 2009); however, none of them allows a stable and reproducible detection of Gcm protein, neither *in vitro* nor *in vivo*. Knowing that threshold Gcm levels are key for establishing specific developmental programs, such a technological limitation largely impaired the full characterization of the Gcm pathway, such as Gcm expression, regulation, and interactions. At the present time, these properties are addressed at the RNA level, or by monitoring promoter-driven reporters and/or *gcm* downstream target genes, as indirect readouts. To fill this gap, we took advantage of the epitope-tagging strategy and produced a construct as well as a transgenic line carrying a Gcm–GFP fusion, to follow expression *in vitro* and in living animals. Since the fusion turned to be inactive in cells and in animals (Delanoue and Giangrande, unpublished data), we focused on a smaller peptide, the FLAG tag (Einhauer and Jungbauer, 2001), recombined to the C-terminal part of the Gcm Open Reading Frame (ORF) and assayed the fusion for its activity.

First, we performed co-transfection analyses in S2 cells using a *pPac5c* construct (*actin5c* promoter, constitutively expressing Gcm–FLAG [Ho et al., 2009]) together with transcriptional reporters. In a first assay, we used a 6 kb *gcm–Gal4* construct that contains the Gal4 coding sequences fused to 6 kb of the *gcm* promoter (Ragone et al., 2003), known to be activated by Gcm itself due to the presence of multiple Gcm Binding Sites [GBSs, Akiyama et al., 1996; Miller et al., 1998]. Gcm–FLAG activity on the 6 kb *gcm* promoter (Fig. 1A, left histogram) was followed by measuring the expression of a co-transfected reporter that carries the GFP gene fused to the Gal4-responsive element Upstream Activating Sequence (UAS; Giniger et al., 1985; Fischer et al., 1988).

In a further independent assay, we used a *repo–RFP* construct (4.3 kb *repo–RFP*) containing 4.3 kb of the *reversed polarity* (*repo*, Campbell et al., 1994; Xiong et al., 1994; Halter et al. 1995) promoter cloned upstream to the Red Fluorescent Protein (RFP) ORF *repo* constitutes a major direct target gene of Gcm expressed in all lateral glia (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996) and its 4.3 kb promoter contains eleven active GBSs (Lee and Jones, 2005). The number of RFP-expressing cells was quantified in the presence/absence of the Gcm–FLAG (Fig. 1A, right histogram).

In agreement with the well-documented role of Gcm as a transcriptional activator, the Gcm–FLAG induces the expression of both reporters.

We then used a more versatile, *pUAST* expression vector-based construct (Brand and Perrimon, 1993; construct map in Supplementary Fig. 1A) allowing for inducible transgene expression (Jacques et al., 2009).

The pUAST–gcm–FLAG construct was initially analyzed in S2 cell transfection assays. Its Actin driver (*Act-Gal4*)-promoted kinetics of expression is shown in Fig. 1C: Gcm–FLAG protein levels persist along a timeframe of 96 h, a peak of expression occurring 48 h after transfection.

ICC performed 48 h after transfection, corresponding to Gcm–FLAG maximum accumulation time-point, revealed its localization in cell nuclei (Fig. 1D).

Gcm–FLAG activity was then assessed by transfection assays exploiting a *repo-GFP* reporter in which the GFP is cloned downstream of the *repo* promoter fragment (4.3 kb *repo–GFP*) and Western blot analyses revealed a correlation between the amount of Gcm–FLAG and the induced reporter expression (Fig. 1B, lanes *UAS–gcm–FLAG*). To test the transactivation potential of the flagged construct, we compared its activity to that of the WT one upon using increasing amounts of vectors: both tagged and native Gcm activate transcription (Fig. 1B, parallel lanes *UAS–gcm–FLAG* and *UAS–WT gcm*).

Finally, we tested the ectopically expressed Gcm–FLAG in an immuno precipitation (IP) assay, directed by a α–FLAG antibody

Fig. 1. Structure, expression and activity of the Gcm–FLAG fusion protein. (A) Induction of *gcm* (left: 6 kb *gcm–Gal4* > *UAS-GFP*) and *repo* (right: 4.3 kb *repo–RFP*) promoters mediated by the *UAS-gcm–FLAG* expression vector. The left histogram shows the mean of three Western blot assays, measuring the amount of GFP protein normalized against that of β-Gal, used as transfection efficiency control. The right histogram shows the mean count of three immunolabeling assays, where the number of RFP(+)/GFP(+) cells was quantified and normalized against the total number of GFP(+) cells, used as transfection control. (B) Immunoblot analysis of GFP expression profile under the control of the 4.3 kb *repo* promoter, 72 h after the transfection of increasing amounts of *UAS–WT gcm* or *UAS–gcm–FLAG* (indicated above each lane, $\gamma = \mu g$), together with the *Act–Gal4* driver. Extracts from untransfected cells (Un) or transfected with the empty vector (E) were analyzed as negative controls. Actin and β-Gal were used as loading and transfection controls, respectively. (C) Western blot kinetic analysis of Gcm–FLAG expression in S2 cells. Specific time-points are indicated above each lane. Extracts from untransfected cells (Un) or transfected for 48 h with the empty vector (E) were used as negative controls. Actin signal was used as a loading control. (D) Immunolabeling of transfected S2 cells (white arrows) showing a Gcm–FLAG (red) and GFP (green, transfection control) expressing cell. DAPI labels nuclei.

Fig. 2. Characterization of overexpressed Gcm–FLAG in embryos. (A) Expression profile of Gcm–FLAG during development in *sca-Gal4* > *UAS–gcm–FLAG* embryos. Developmental stages are indicated above each lane. Extracts from a mixed population of *WT* embryos were analyzed in parallel as a negative control (lane *sca-Gal4* > w^{1118}). Actin signal was used as a loading standard. (B, C) Confocal projections (40 μm, containing the whole top to bottom detectable signal) showing the profile of FLAG (red) and Repo (green) expression in control (*sca-Gal4* > w^{1118}) and *sca-Gal4* > *UAS–gcm–FLAG* embryos, at the indicated embryonic stages.

and we showed that the Gcm–FLAG can be targeted in IP from total cell extracts (Supplementary Fig. 1B).

Expression and function of Gcm–FLAG in vivo

Based on the *in vitro* data, we generated *UAS–gcm–FLAG* transgenic flies and tested the transgene expression in embryos upon crossing with the pan-neural driver *scabrous-Gal4* (*sca-Gal4*, Mlodzik et al., 1990). The profile reported in Fig. 2A shows peak levels between stages 9 and 15. In parallel, and complementary to what already done in cells, protein extracts prepared from this embryonic population were subjected to a α-FLAG-driven IP assay, showing that, in animals as well, Gcm–FLAG can be efficiently immunoprecipitated (Supplementary Fig. 1C).

Gcm expression was also revealed by IHC in stage 11 and 16*sca* > *UAS–gcm–FLAG* embryos (Fig. 2B, C) and we confirmed

Fig. 3. Design of the gcm^{BAC} constructs and rescue of the *gcm* phenotype. (A) Schematics showing the *gcm* transcription unit and the *gcm* null mutant alleles employed for the rescue analysis, gcm^{26} and gcm^{N7-4}. (B) Repo protein (white arrows) and *gcm* mRNA expression in gcm^{26} embryos, genotyped through the *CyO, twist-lacZ* balancer (stages are indicated in each panel). (C) Representation of the *gcm* locus and strategy used to produce the *WT* gcm^{BAC} as well as the *gcm–FLAG*^{BAC} transgenic lines. Briefly, native (LA and RA) or tagged (LA1LA2) *gcm*-flanking genomic fragments were amplified from a BAC template (BACR24A22) with oligos *LA AscI* and *LA BamHI* (LA fragment), *LA AscI*, *LA*1 *BamHI* 2*xFLAG*, *LA*2 *BamHI*and *LA*2 *NotI* (LA1LA2 fragment) and *RA BamHI* or *RA NotI* and *RA PacI* (RA fragment). Once cloned in the vector, they were recombined with the same *BAC* (details in Venken et al., 2006). The *p[ACMAN]wild-type gcm* and *p[ACMAN]gcm–FLAG* constructs were finally injected into *ZH-attP-68E* flies, bearing a docking site (3L–68E) on the III chromosome (Bischof et al., 2007). D) Confocal projections showing Repo (green) and Elav (gray) expression in stage 16 gcm^{26};gcm^{BAC} embryos from the stable stock. (E) Developmental pattern of *gcm* RNA expression in embryos of the same genotype. Note that the profile reflects that of the endogenous gene (Bernardoni et al., 1997). (F) Diagram of the chromosomal region encompassing the *gcm* locus. The region spanned by the deficiency *Df*(2*L*)132 is shown: besides *gcm* and *gcm*2 (black triangles), fifteen more genes (in gray) are eliminated by the deficiency, according to FlyBase database (http://flybase.org/). The position of the genomic fragment contained in the gcm^{BAC} constructs (*WT* and *FLAG*) is reported below.

the ability of the Gcm–FLAG fusion protein to induce the expression of its direct target *repo* (compare Fig. 2B and C, last panels).

When Gcm–FLAG overexpression starts, few cells express the glial marker Repo. Later on, since *sca*-driven expression is transient, Gcm–FLAG is no longer detectable in the nervous system, whereas Repo expression persists (Fig. 2C), demonstrating that Gcm–FLAG is fully functional *in vivo*. Altogether these data conclusively show that FLAG-tagging allows qualitative and quantitative visualization of an active Gcm protein in glial precursors not yet expressing its downstream target genes.

BAC based transgenic lines fully rescue the gcm null mutation

Compared to the *UAS/Gal4* system, a more physiological *in vivo* analysis relies on the expression of the entire transcription unit under the control of its own promoter. Since *gcm* has a complex and large regulatory region (Ragone et al., 2003; Jones et al., 2004) we recombined a chromosomal region of 36.5 kb containing the *gcm* locus into a conditionally amplifiable bacterial artificial chromosome (BAC) vector (*P*[*acman*] vector) (Venken et al., 2006), to raise targeted transgenic stocks (called gcm^{BAC}, Fig. 3C, left pathway). For all the subsequent analyses, we used an insert on the third chromosome at the 68E genomic site (Bischof et al., 2007).

To assess whether the gcm^{BAC} transgene fully reproduces the profile and the features of the endogenous *gcm* gene, we analyzed its rescue potential over a null *gcm* allele, the most stringent and physiological parameter of functionality. We crossed gcm^{26} animals carrying a deletion that spans the whole *gcm* transcript (Vincent et al., 1996; Kammerer and Giangrande, 2001; Ragone et al., 2003; Ho et al., 2009 and Fig. 3A and B) with the gcm^{BAC} line and obtained full rescue of the embryonic lethality, allowing us to build a stable double homozygous gcm^{26}/gcm^{BAC} strain. Furthermore, the gcm^{BAC} allows the full recovery of *repo* (Fig. 3D) and *gcm* RNA (Fig. 3E) expression, demonstrating that possible viable phenotypes associated with the *gcm* loss of function mutation are also rescued (Fig. 3B).

Few glial cells differentiate in *gcm* null animals (white triangles in Fig. 3B), due to the expression of *gcm*2 (Kammerer and Giangrande, 2001; see Fig. 3F). This *gcm* homolog gene has a very limited gliogenic potential and *gcm*2 null mutations are viable (Alfonso and Jones, 2002). We nevertheless confirmed the rescue potential of the gcm^{BAC} over transheterozygous $gcm^{26}/Df(2L)132$ animals (quantitative data in Table 1A) bearing a large deficiency that eliminates both *gcm* and *gcm*2 (Lane and Kalderon, 1993) (Fig. 3F). We also confirmed the rescue potential of the gcm^{BAC} over a transheterozygous combination carrying the deficiency and a second null *gcm* allele, gcm^{N7-4}, which carries a point mutation that abolishes DNA binding (Vincent et al., 1996; Fig. 3A) (see Table 1B for quantitative data).

Finally, a stable homozygous stock was successfully produced carrying the *Df*(2*L*)132 deficiency and the gcm^{BAC}. However, for future studies, we recommend using the gcm^{26}; gcm^{BAC} stock or animals that carry the gcm^{BAC} and are transheterozygous for a *gcm* null allele and *Df*(2*L*)132, because this large deficiency removes fifteen more transcription units (Fig. 3F), which in homozygous conditions may trigger defects that do not depend on *gcm*. Indeed the *Df*(2*L*)132; gcm^{BAC} stock is rather weak (poorly viable).

The functionality of the WT BAC prompted us to produce a stock ($gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ flies) carrying a FLAG-tagged variant of the BAC construct (Fig. 3C, right pathway) at the same genomic site, to follow the Gcm protein *in vivo*. As the gcm^{BAC}, the *tagged-gcm* BAC rescues the lethality and the glial phenotypes associated with the *gcm* loss-of-function mutation (Supplementary Fig. 2). As for the WT BAC, we built a stable stock bearing the $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ and the gcm^{26} null allele (gcm^{26}; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$). In addition, we obtained rescue with the two transheterozygous combinations $gcm^{26}/Df(2L)132$ and $gcm^{N7-4}/Df(2L)132$, which parallels the rescue obtained with the gcm^{BAC} (see Table 1A and B, respectively).

All these data confirm that the gcm^{BAC}-based lines completely rescue the *gcm* null mutation and indicate that the $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ stock is suitable for following the embryonic pattern of Gcm expression (Fig. 4). Using the α–FLAG antibody, we detected expression in all the territories known to express *gcm*: the developing embryonic nerve cord (Fig. 4B D), the hemocyte precursors (panels 4A, S, T) and the tendon cells (panel U). In all cases, Gcm expression is transient (see below), allowing us to demonstrate for the first time the dynamic feature of the Gcm protein, a behavior that could not be revealed by the use of sensors and enhancer trap lines. We focused on glia, the most characterized *gcm*-dependent cell population, and verified that FLAG expression (panels A–F and M) precedes that of its target Repo, which becomes detectable by stage 11 (panels G–L; compare panels 4B and 4H and panel N). At subsequent stages, the two proteins are co-expressed (panels 4C, D panels 4I, J and panels 4O, P) (stages 12, 13) and later on Repo persists (attesting proper glial differentiation), whereas the FLAG labeling fades away (panels 4E, F panels 4K, L and panels Q, R).

Thus, the $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ fully functional construct complements the current visualization of Gcm activity. Moreover, optimal and transient expression of RNA and protein are key elements of the Gcm pathway (Ragone et al., 2001; Soustelle et al., 2008;

Table 1
gcm^{BAC} and $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$ rescue the lethality of *Df*(2*L*)132 flies transheterozygous for *gcm* null alleles.

	Rescued adults (% of $gcm^{26}/Df(2L)132$)		
	Found	**Expected**	**Total #**
A			
gcm^{26}/*CyO, twist-lacZ*; gcm^{BAC}/+ X *Df*(2*L*)132/ *CyO, twist-lacZ*; gcm^{BAC}/+	30	27	113
gcm^{26}/gcm^{26}; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/*TM6, Tb* X *Df*(2*L*)132/ *CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/ $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$	35	33	71
	Rescued adults (% of $gcm^{N7\text{-}4}/Df(2L)132$)		
	Found	**Expected**	**Total #**
B			
gcm^{N7-4}/*CyO, twist-lacZ*; gcm^{BAC}/+ X *Df*(2*L*)132/*CyO, twist-lacZ*; gcm^{BAC}/+	25	27	165
gcm^{N7-4}/*CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/+ X *Df*(2*L*)132/*CyO, twist-lacZ*; $gcm\text{–}FLAG^{BAC}$/+	31	27	159

Fig. 4. Profile of Gcm–FLAG expression during embryogenesis. (A–R) Confocal projections showing Gcm–FLAG (red, panels A–F) or Repo (green, panels G–L) expression in developing embryos (stages indicated in each panel). Merged images are shown in panels M–R and are magnified in insets. The merged panels highlight the transient expression of Gcm–FLAG and the delay between its expression and that of Repo, which stays on until the end of embryogenesis. (S, T) Early embryonic expression of Gcm–FLAG. Arrow points to expression in the procephalic mesoderm. As already noted for the RNA (Bernardoni et al., 1997), the Gcm protein is expressed in a cluster of cells from which one Longitudinal Glioblast will subsequently emerge (inset). (U) Gcm–FLAG expression in tendon cells. Notched arrows indicate stripes of tendon cells in every segment.

Ho et al., 2009; Popkova et al., 2012). Finally, this study represents, to our knowledge, the first instance of a fully functional *gcm–FLAG*^{BAC} derivative.

Novel profile patterns: Gcm is expressed and required in peritracheal cells

The *gcm–FLAG*^{BAC} construct reflects the expression profile of the endogenous protein, allowing us to study the Gcm pathway in physiological condition (Fig. 4) and to highlight previously uncharacterized Gcm distribution patterns.

Within the central nervous system (CNS), the embryonic brain (stage 16) shows Gcm expression in the expected glial lineages (Fig. 5D, E), Gcm only expression (open arrowhead) and Gcm–Repo co-expression (open arrow) likely corresponding to different stages of glial differentiation. In addition, Gcm is present in few Elav(+) cells, displaying a previously uncovered expression of Gcm in specific neurons of the embryonic brain (star in Fig. 5E). This parallels the identification of Gcm(+) neurons found at later stages (Yoshida et al., 2005; Chotard et al., 2005; Soustelle and Giangrande 2007a; Soustelle et al., 2007). Furthermore, two Gcm (+) symmetric cell clusters are present in the cephalic region (Fig. 5A and B). These clusters, of yet unknown identity, are described in the Supplementary Text, Supplementary Fig. 3 and Supplementary Movie 1.

Supplementary material related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.014.

Outside the embryonic NS, Gcm was found transiently expressed in reiterated and symmetric cell clusters located dorsolaterally. Each cluster is composed of four cells; six clusters are in the abdomen (one for each hemisegment), one to three in

Fig. 5. Identification of novel Gcm expression profiles using the *gcm–FLAG* BAC. (A) FLAG (red), Repo (green) and Elav (blue) labeling in stage 13 embryos. Inset in (B) shows a magnification of the cephalic cell cluster expressing Gcm. Magnification of dorsal (arrowheads) reiterated clusters of cells is reported in inset (C) (peritracheal cells, see in the text and Figs. 8 and 9). (D) FLAG, Repo and Elav labeling in late embryonic brain. In panel (E), magnification showing Gcm–FLAG[+] (open triangle), Repo[+] (arrowheads), Repo[+]/Gcm–FLAG[+] (open arrows) and Elav[+]/Gcm–FLAG[+] (star) cells.

the thoracic hemisegments (not visible in all the specimens) and one in the head region (Fig.5A,C). ISH confirmed at the RNA level the same expression pattern (white triangles in Supplementary Fig. 3A, right panel). By the position, these clusters may correspond to the peritracheal cells (PTs) (Hartenstein and Jan, 1992 and Fig. 6A). The origin and the lineage of PTs are not known, however they are not part of the tracheal epithelium and seem to originate from the mesoderm. In *Drosophila*, they have been mostly investigated in the larva, where one cell per hemisegment has been described to secrete the ecdysis-triggering hormone (ETH), thereby activating the endocrine system that controls ecdysis behavior (O'Brien and Taghert, 1998; Ewer, 2005) (Fig. 6G). This peptidergic, non-neuronal cell, also called INKA cell, sends many cytoplasmic processes along the respiratory system (Zitnan et al., 1996) and expresses the DIMMED bHLH transcription factor that is considered as a master gene for the differentiation of peptidergic cells (Hewes et al., 2003).One cell per embryonic cluster coexpresses Gcm and DIMMED, therefore corresponding to the INKA cell (Fig. 7A). This allows us to unambiguously identify these embryonic Gcm(+) cells as peritracheal cells.

We confirmed that the *gcm–Gal4;UAS-mCD8GFP* strain expresses the GFP in embryonic (data not shown) and larval (Fig. 6B) peritracheal cell clusters, which allowed us to characterize their morphology. Each larval cluster is composed of three cells strictly and stereotypically associated to the tracheal system. One cell shows a complex morphology, extending several cytoplasmic processes, whereas the two other cells are less elaborated, adjacent to the branch-point from which the transverse tracheal connective leaves the main longitudinal trachea (Fig. 6B,C). The three cells seem to establish contacts with each other (Fig. 6D and Movie 1).

Supplementary material related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.014.

To assess the peptidergic properties of the Gcm(+) cells, dissected tracheae were labeled using two antibodies directed against neurosecretory cell markers expressed in the INKA cells: DIMMED and its direct target, the amidating enzyme peptidylglycine α-hydroxylating mono-oxygenase (PHM), which is required for the processing of amidated neuropeptide (Park et al., 2008). Colocalization between DIMMED or PHM and GFP immunolabeling (Fig. 6E, F, last panels) reveals that, Gcm is expressed in the INKA cell and in two other PT cells (Fig. 6G) (open arrowheads in Fig. 6E, F). Thus, Gcm is expressed in several cell populations with different origins (hemocytes and peritracheal cells: mesoderm; tendon cells, neurons and glia: ectoderm) and functions (nervous system, muscle contraction, immunity).

Given the pivotal role of Gcm in the development of all the tissues in which it is expressed (Soustelle and Giangrande, 2007b), we analyzed peritracheal cell differentiation in *gcm* embryos. We took advantage of an embryonic lethal and hypomorphic allele, gcm^{34}, which corresponds to an imprecise excision of the original P element and in which the *lacZ* labeling recapitulates the profile of *gcm* expression (Bernardoni et al., 1997), to follow the fate of the presumptive peritracheal cells. Stage 16 embryos were immunolabeled using α-DIMMED and α-β-Gal antibodies. In gcm^{34} loss-of-function embryos (Fig. 7B), the INKA cell is no longer detectable in more than 50% of the cases (48 segments, 4 embryos), whereas the other *lacZ*(+)PTs are still visible (Fig. 7D,E). This phenotype could be interpreted in two ways: Gcm controls the overall pathway of INKA cell differentiation or more specifically regulates the expression of DIMMED, the major factor required for the neurosecretory function. Since no evidence for DIMMED as a *gcm*-regulated gene emerged from previous transcriptome (Altenhein et al., 2006) or from the DAM ID screen (see below), and given the early role of Gcm, the first hypothesis seems more reliable. Moreover, the same quantitative

Fig. 6. Characterization of peritracheal cells. (A) Dorsolateral view of stage 16 *gcm*^{rA87} embryos showing β-Gal expression in cell clusters closely associated to the trachea at the abdominal transverse connectives (peritracheal cells, see text and Fig. 8G). The *β*-Gal protein stability of *gcm*^{rA87}embryos allows us to trace the cells that associate with developing tracheas and that transiently express the Gcm–FLAG. (B) Overview of the PTs from *gcm > UAS–mCD8GFP* third instar larvae under fluorescent microscope. Six symmetric cell clusters expressing *gcm* are found closely associated with the tracheal branching node (arrowheads). Location and morphology are shown in panels C and D. (C) High magnification of one cell cluster. The transmission light view (gray) reveals that the PT cells are arranged in a stereotyped manner, one cell being localized on the main trachea, whereas the other two are on transverse connections. (D) Double labeling with DAPI (gray) in the nucleus and GFP in the cytoplasm reveals the presence of three cells in close contact. One cell displays more elaborated cytoplasmic projections (asterisk) than the others (open arrowheads). (E, F) Cytoplasmic co-localization (asterisk) between GFP and the peritracheal marker DIMMED (red, panel D) or PHM (red, panel E) reveals that the elaborated PT is the secretory INKA cell. The other two cells are DIMMED/PHM[-](open arrowheads). DAPI is in gray. (G) Schematics of PT cell organization within the tracheal system of third instar larvae. Tracheal trunks (TT) and transverse connections (TC) are in violet, cells expressing both Gcm and peritracheal markers are in yellow (INKA cells), whereas cells expressing exclusively Gcm are in green.

analysis on the stronger *gcm*^{34}/*Df*(2*L*)132 allelic combination shed further light on the mutant phenotype. In this background, no DIMMED labeling was observed at all and the number of the other peritracheal cells decrease as well, by more than 50% (Fig. 7D, E). Furthermore, segments completely devoid of labeling were also detected, indicating that the other peritracheal cells also require Gcm (Fig. 7C, E). Due to lack of independent markers, we cannot use stronger mutant backgrounds; however, our data clearly show that all peritracheal cells require Gcm and that INKA cells are more sensitive to Gcm dosage than the others.

Thus, *gcm* is expressed and required in a novel cell type that is essential for ecdysis, the neurosecretory peritracheal cells.

Post-transcriptional regulation of gcm

The pivotal role of Gcm in orchestrating cell fate specification involves a stringent regulation of its pathway, where multi-level control mechanisms converge. The FLAG-tagged Gcm tool constitutes a useful sensor to characterize post-transcriptional regulatory events.

First, since several bands appear on Western Blots revealing the Gcm–FLAG product (Fig. 1C) and the GCMa vertebrate protein is regulated by phosphorylation, which seems to affect its activity and stability (Schreiber et al., 1997; Chang et al., 2005; Knerr et al., 2005; Yang et al., 2005; Chiang et al., 2009; Yasui et al. 2012),

Fig. 7. Gcm is required in peritracheal cells. (A–C) gcm^{34} heterozygous (panel A, *WT*),gcm^{34} homozygous (panel B) or $gcm^{34}/Df(2L)132$ transheterozygous (panel C) stage 16 embryos, labeled using α-β-Gal and α–DIMMED antibodies. Note that the gcm^{34} allele represents an imprecise excision upon the mobilization of the P element contained in the gcm^{rA87} line. In the *WT* embryo (A), one PT cluster is located at each abdominal hemisegment. Each clusters is composed by four cells (circle): three PTs express only Gcm, and one INKA cell expressing both Gcm and DIMMED. Other Gcm(+) cells, tendons (dashed circle) and hemocytes/glia (open arrowheads), are also visualized. In gcm^{34} loss-of-function animals (B), the INKA cell cannot be detected in most PT clusters, whereas the other peritracheal cells remain detectable, revealing that *gcm* is required in the INKA cells. Note that, in the $gcm^{34}/Df(2L)132$ mutant background, the entire labeled cluster is absent in two segments (panel C, asterisks). (D, E) Quantitative analysis of INKA cell (histogram D) and PT cell (histogram E) number in stage 16 embryos, in gcm^{34}/gcm^{34} (34/34) and $gcm^{34}/Df(2L)132$ (34/*Df*) mutant backgrounds.

we searched for putative Gcm phosphorylation sites *in silico* and found several (http://gps.biocuckoo.org/). We then incubated cell extracts overexpressing Gcm–FLAG (*Act-Gal*4), with calf intestine phosphatase (CIP) prior to SDS-PAGE and observed a diminished band number and density (Supplementary Fig. 5A, compare lanes − and +), thus validating the Gcm phosphorylation prediction. Future studies will assess whether phosphorylation contributes to Gcm stability/activity.

Second, miRNAs are endogenously expressed noncoding RNAs that represent key post-transcriptional regulators of gene expression (Flynt and Lai, 2008; Kloosterman and Plasterk, 2006; Chawla and Sokol, 2011; Dai et al., 2012). An online search for miRNAs predicted to target the *gcm* 3′UTR by miRanda (http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl), TargetScan (http://genes.mit.edu/targetscan.test/ucsc.html) and microCosm (http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/) databases indicated *miR*-279/286/996 as the main family of putative effector miRNAs. *miR*-279, the most characterized member in *Drosophila*, was initially described for suppressing the formation of heterotopic olfactory neurons (Cayirlioglu et al., 2008) and as a component of a complex regulatory circuit orchestrated by the pleiotropic transcription factor Prospero (Pros)(Hartl et al., 2011). Finally, it was also shown to regulate the JAK/STAT pathway, driving rest: activity rhythms (Luo and Sehgal, 2012) and modulating the response to morphogen gradients (Yoon et al., 2011).

To verify a possible role of *miR*-279, we developed a sensor construct in which the 3'UTR of *gcm* (Fig. 8B) was inserted downstream to the FLAG-encoding cassette (Fig. 8A, right schematic). Such construct (or its site-specific mutant derivative) was co-transfected in S2 cells along with a vector (Fig. 8A, left schematic) efficiently over-expressing the miRNA by mean of an *Act-Gal*4 driver (Fig. 8C, lane 2).

Western blot analysis demonstrates a specific downregulation exerted by *miR*-279 on *gcm* (Fig. 8E, compare lanes 3 and 4). Such modulation, abolished in a construct carrying a mutant target site (Fig. 8D, compare lanes 5 and 6), is specifically mediated by the *gcm* 3'UTR. Interestingly, ectopic expression of *miR*-286 (Fig. 8D lane 1), a second member of the *miR*-279 family, diverging from *mir*-279 at the level of its 3′ sequence, failed to silence Gcm–FLAG (Fig. 8F). Since the 3′ region of microRNAs is known to play a role in the specificity of microRNA-target recognition (Brennecke et al., 2005; Bartel, 2009), this accounts for the selectivity of *gcm* post-translational control by *miR*-279 *in vitro*.

Finally, we provide two *in vivo* evidence for miRNA-mediated *gcm* regulation: (i) *miR*-279 was co-expressed in the embryonic neural territory (*sca-Gal*4 driver) in the presence of a *Luciferase* (*Luc*) reporter carrying its own 3′UTR or the *gcm* 3′UTR. By qRT-PCR analysis, a specific downregulation mediated by *miR*-279 on *Luc* RNA expression was detected only in the latter case (Fig. 8G), which parallels the *in vitro* data (ii), an analogous gain-of-function strategy was used to analyze the expression of the endogenous *gcm* ($gcm–FLAG^{BAC}$) in the presence or in the absence of overexpressed *miR*-279 at RNA and protein level by qRT-PCR (Fig. 8H) and Western blot (Fig. 8I), respectively. Both approaches show a negative effect, thus validating *miR*-279 for targeting *gcm in vivo* in neurogenic territories. In sum, we identify *miR*-279 as a negative modulator of *gcm* both in cell cultures and in embryos. We then asked the *in vivo* relevance of *miR*-279 on the gliogenic Gcm-dependent pathway. Interestingly, when *miR*-279 was overexpressed (*sca-Gal*4) in hypomorphic *gcm* animals that contain reduced number of glia, we expected to observe a further decrease of glial cell number but found the opposite result, and this was obtained upon using two allelic combinations (Supplementary Fig. 5B). Thus, further regulatory steps compensate for the effects on *gcm*, thereby highlighting the complex network linked to small RNAs.

Gcm activates endogenous target genes associated to the small RNA pathway

Prompted by the above results, we asked whether the interplay between Gcm and small RNA metabolism is more pervasive than emerged to date, upon establishing the role of Gcm in this

Fig. 8. Regulation of Gcm–FLAG expression by *miR*-279. (A) Schematics of the *pPac5c–miR*-279 (left) and *pPac5c–gcm–FLAG/3′UTR* (right) constructs. Regulatory regions are represented as white boxes, expressed regions as gray (untranslated) or black (translated) boxes. (B) *gcm* 3′UTR region containing the predicted *miR*-279 target site (red). The annealed residues between the *miR* and the 3'UTR are reported. The binding site was deleted in the 3′UTR mutant derivative. (C) Northern blot analysis of *miR*-279 expression in S2 cells: endogenous (lane Un) and overexpressed species (lanes1 and 2, bearing or not the polyA site, respectively) upon transfection with two different constructs. The second one was obtained by cloning a genomic cassette encompassing the pri-miRNA in a *Drosophila* expression vector deprived of transcriptional termination signals. This reduces the occurrence of polyadenylated miRNA molecules that are targeted to degradation (Ballarino et al., 2009), and results in much stronger miRNA expression compared to a similar vector that maintains the transcriptional termination signal. 5s rRNA was used as loading control. (D) Northern blot detection of *miR*-286 ectopic expression in S2 cells: endogenous (lane Un) and overexpressed RNAs (lane *miR*-286) are shown. 5s rRNA indicates the loading. (E) Western blot analysis of Gcm–FLAG expression upon cotransfection of the *miR*-279 construct 2, lacking the polyadenylation site (lanes 3 and 5) and of the *pPac5c–gcm–FLAG/3′UTR* vector carrying the WT 3'UTR sequences (*WT UTR*, lanes 3 and 4) or a mutated sequence that abolishes *miR*-279 recognition (*mut UTR*, lanes 5 and 6). A scramble microRNA (*ctrl*) was used to test for specificity (lanes 4 and 6). GFP levels were used for calibrating transfection efficiencies. (F) Western blot analysis of Gcm–FLAG expression (from the WT *pPac5c–gcm–FLAG/3′UTR* construct) upon transfection of the *miR*-286 expressing vector (lane 2) A scramble microRNA (*ctrl*) was used as a control (lane 1). Transfection efficiencies were checked through GFP levels. (G) qRT-PCR analysis of the expression of a *Luc* reporter carrying a native 3′UTR (*UAS–UTR Luc*) or fused to *gcm* 3′UTR (*UAS–UTR gcm*) in the absence (white bars) or in the presence (black bars) of *miR*-279, overexpressed by the *sca* driver. mCD8GFP was used as internal control. (H) qRT-PCR analysis of BAC-derived *gcm–FLAG* mRNA expression in the absence (white bar) or in the presence (black bar) of *miR*-279, overexpressed with the *sca-Gal*4 driver. mCD8GFP was used as internal control. (I) Western blot analysis of endogenous Gcm–FLAG expression, using the *gcm–FLAG*^{BAC} transgenic line. Same conditions as in (H).

pathway *miR*-1 was identified in an *in vivo* DAM ID screen (van Steensel and Henikoff, 2000; Choksi et al., 2006) for Gcm direct targets (Popkova, Southall, Brand and Giangrande, in preparation) and several GBSs were identified in the region upstream to the *miR*-1 transcription unit (Supplementary Fig. 6a and Supplementary Table 2). We evaluated *miR*-1 expression *in vivo* upon *hs-Gal*4 driven Gcm activation and found an up-regulation (Fig. 9F). *miR*-1 is a potent regulator of differentiation in tissues of mesodermal origin (Sokol and Ambros, 2005; Biemar et al., 2005), where Gcm plays a crucial role for the development of blood cells (Bernardoni et al., 1997; Alfonso and Jones, 2002; Bataillé et al., 2005, Jacques et al., 2009). We therefore used the *gcm–Gal*4 driver to overexpress Gcm and, to restrict the effects to the hemocyte precursor anlagen, we analyzed embryonic stages 5–9, when gliogenesis still has to start. We indeed confirmed an increase of *miR*-1 levels (Fig. 9G) and no effect was detected when Gcm expression was triggered by the *sca-Gal*4 driver (Supplementary Fig. 6B). Interestingly, other miRNAs were identified as potential targets in the DAM ID screen; however their expression did not increase upon Gcm forced expression with any of the used drivers. This further validates the data obtained with *miR*-1 and suggests that the other miRNAs may work at different developmental stages. Finally, constitutive expression of Gcm in S2 cells, where *miR*-1 is not endogenously expressed, does not induce *miR*-1expression (Supplementary Fig. 6C), likely due to the absence of appropriate co-activators. Overall, these data call for a cell-specific role of Gcm. Future studies will dissect the role of *miR*-1 in the Gcm pathways.

Finally, the DAM ID screen also identified *Argonaute* 1 (*AGO*1)and an *in silico* inspection revealed the occurrence of several predicted GBSs mapping upstream to the *AGO*1 transcription unit (Supplementary Fig. 7A and Supplementary Table 3). AGO1 a member of the Argonaute/PIWI protein family, involved in small RNA-mediated gene regulation (Farazi et al., 2008). In *Drosophila*, AGO1 plays a specific role in miRNA biogenesis and function: it directs the unwinding of the intermediate duplex RNA generated during microRNA biosynthetic pathway and it selects one strand as mature microRNA loaded into the RISC (RNA-induced silencing complex) effector complex (Tomari et al., 2007; Förstemann et al., 2007). AGO1 is broadly expressed in the embryo as well as in the imaginal discs and this, combined with the well known pleiotropic roles exerted by microRNA, accounts for its involvement in multiple developmental pathways (Kataoka et al., 2001). Interestingly, a genetic screen over a sensitized *gcm* background identified *AGO*1 as a putative interactor of *gcm* (Popkova et al., 2012).

In short, the *Drosophila* notum carries a fixed number of sensory organs called bristles. $gcm^{Pyx}/+$ flies ectopically express *gcm* in the larval notum, which triggers the differentiation of supernumerary bristles (Van De Bor et al., 2002). $gcm^{Pyx}/+$ females show, in average, 18,5 bristles instead of the 11/hemi-notum typical of WT animals. This phenotype constituted the readout to identify putative *gcm* interacting genes in a dosage sensitive screen. The *AGO*1 mutation acts as a suppressor of the gcm^{Pyx} phenotype in double heterozygous conditions (genotype: $gcm^{Pyx}/AGO1^{08121}$), showing a positive genetic interaction with *gcm* (Supplementary Fig. 7B).

A microarray profiling (Altenhein et al., 2006) also suggested *AGO*1 as a possible Gcm target in the neurogenic territories; however its upregulation upon Gcm forced expression as well as in *gcm* loss of function mutations made unclear the role of Gcm. We therefore expressed (*Act-Gal*4 driver) Gcm or its tagged derivative in S2 cells, in which AGO1 is endogenously expressed, and found that this induces *AGO*1 accumulation (Fig. 9A), reflecting and following the temporal accumulation of Gcm–FLAG itself (compare to Fig. 1C). To further corroborate these data, we transfected increasing amounts of the Gcm–FLAG-expressing construct and analyzed the amount of *AGO*1 at the time-points of Gcm–FLAG highest expression (48–72 h after transfection). This revealed a clear correlation between the quantity of Gcm–FLAG and the expression of *AGO*1 (Fig. 9C). Furthermore, to exclude any unspecific influence of the FLAG epitope on target recognition, we performed the same assay employing an untagged version of Gcm (Fig. 9B and D). Finally, we verified

Fig. 9. Analysis of AGO1 expression upon Gcm overexpression. (A, B) Expression profile of AGO1 over time, upon transfection of *UAS–gcm–FLAG* (A) or *UAS–WT gcm* (B) in S2 cells. Specific time-points are indicated above each lane. Extracts from untransfected cells (Un) or transfected for 48 h with the empty vector (E) were analyzed in parallel as controls. Actin signal was used as a loading control in these and in the other panels. (C, D) Expression levels of AGO1 at 72 h after transfection of S2 cells with increasing amounts of *UAS–gcm–FLAG* (panel C) or *UAS–WT gcm* (panel D). Transfected amounts of expressing plasmids are indicated above each lane ($\gamma = \mu g$). Extracts from cells transfected with the empty vector (E) were analyzed in parallel as negative controls. (E) Expression of AGO1 in embryos overexpressing Gcm (*hs-Gal*4 > *UAS–gcm*) upon heat shock (lanes +). Extracts from un-shocked embryos are in lanes (−). Actin levels were used as a control. (F) Northern blot analysis of *miR*-1 expression upon *hs-Gal*4 driven Gcm ubiquitous overexpression. Details like in panel 2E. 5s rRNA was used as calibrator. (G) Northern blot detection of *miR*-1 expression levels upon *gcm–Gal*4 mediated Gcm ectopic expression (lane *gcm–Gal*4 > *UAS–Gcm*). *gcm–Gal*4 > w^{1118} embryos were used as control. Loading was calibrated through 5s rRNA.

*AGO*1 as a Gcm target *in vivo*: we expressed the *UAS–gcm* transgene under the control of the heat-shock (hs) inducible driver *hs-Gal*4 in *Drosophila* embryos: the Western blot in Fig. 9E demonstrates a clear up-regulation of AGO1 upon Gcm ectopic expression (lanes *hs-Gal*4 > *UAS–gcm*, compare − to +). In sum, we provide significant genetic and molecular evidence for a positive interaction between *AGO*1 and *gcm* suggesting a mechanism of direct targeting. Interestingly, we did not observe any modulation of AGO1 upon Gcm forced expression in the nervous system using *sca-Gal*4 (Supplementary Fig. 7C). Since Gcm is required in different cell types, more efforts are required to clarify in which functional pathway Gcm controls AGO1.Our data provide nevertheless first evidence for a cell-specific factor modulating the expression of AGO1. Indeed, the widespread distribution and function of miRNAs suggest a complex regulatory network controlling *AGO*1 expression/activity: Gcm can be proposed as a cell-specific component of the small RNA cascade.

Conclusions and perspectives

Revealing protein expression provides the first step toward the characterization of gene regulation/activity and, subsequently, toward the understanding of genetic phenotypes.

The transcriptional activator Gcm constitutes a paradigmatic example of master regulator, acting as a pivotal cell fate determinant and differentiation factor during *Drosophila* embryogenesis. It is therefore crucial to outline a trustworthy picture of Gcm biology, from expression to function. The present study provides the first characterization of Gcm at the protein level and reports a large set of data on *gcm* function, regulation and expression, collected both *in vitro* and *in vivo*. Typically, we identify small RNA metabolism as an important element of the Gcm pathway and a novel *gcm*-dependent cell type essential in development.

Acknowledgments

We thank P.H. Taghert for kindly providing peritracheal cell marker antibody, F. Karch for the ZN-attP-68E flies, E. Lai for the *UAS–miR*-279 flies, B.J. Jones for the *pCasper-hs-LacZ* plasmid and the Bloomington Center for fly stocks. We also thank the lab members for critically reading the paper and R. Stocker and M. Ballarino for helpful discussions. We thank N. Arbogast, H. Dietrich and C. Diebold for excellent technical assistance, as well as the imaging and the cell culture facilities. We thank L. Soustelle for the initial design of the WT BAC construct. Work in the Giangrande lab was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the Hôpital de Strasbourg, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Institut National du Cancer, the Agence Nationale de la Recherche and the Région Alsace. P. Laneve, A Popkova, O Komonyi, H Flici and I Kerekes were supported by the Fondation pour la Recherche Médicale en France, by the Association contre le Cancer, by the Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine and by the Agence National contre le Cancer. G Trebuchet was funded by a Governmental PhD fellowship.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.014.

References

Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J.D., Technau, G.M., 2006. Expression profiling of glial genes during Drosophila embryogenesis. Dev. Biol. 296, 545–560.

Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A.M., Hotta, Y., 1996. The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in Drosophila and mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 25, 14912–14916.

Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T., Hotta, Y., 1999. Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in Drosophila. Development 126, 1967–1974.

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

Ballarino, M., Pagano, F., Girardi, E., Morlando, M., Cacchiarelli, D., Marchioni, M., Proudfoot, N.J., Bozzoni, I., 2009. Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs. Mol. Cell. Biol. 29, 5632–5638.

Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136, 215–233.

Bataillé, L., Augé, B., Ferjoux, G., Haenlin, M., Waltzer, L., 2005. Resolving embryonic blood cell fate choice in Drosophila: interplay of GCM and RUNX factors. Development 132, 4635–4644.

Bernardoni, R., Vivancos, V., Giangrande, A., 1997. Glide/Gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. Dev. Biol. 191, 118–130.

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

Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J.L., Giangrande, A., 1999. Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. Dev. Biol. 216, 265–275.

Biemar, F., Zinzen, R., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Manak, J.R., Levine, M.S., 2005. Spatial regulation of microRNA gene expression in the Drosophila embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102, 15907–15911.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., Basler, K., 2007. An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 3312–3317.

Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118, 401–415.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 3, e85.

Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C.Q., Tomlinson, A., 1994. RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in Drosophila. Development 120, 2957–2966.

Cayirlioglu, P., Kadow, I.G., Zhan, X., Okamura, K., Suh, G.S., Gunning., D., Lai, E.C., Zipursky, S.L., 2008. Hybrid neurons in a microRNA mutant are putative evolutionary intermediates in insect CO_2 sensory systems. Science 319, 1256–1260.

Chang, C.H., Chuang, H.C., Yu, C., Yao, T.P., Chen, H., 2005. Stimulation of GCMa transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMa. Mol. Cell Biol. 25, 8401–8414.

Chawla, G., Sokol, N.S., 2011. MicroRNAs in Drosophila development. Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 286, 1–65.

Chiang, M.H., Liang, F.Y., Chen, C.P., Chang, C.W., Cheong, M.L., Wang, L.J., Liang, C.Y., Lin, F.Y., Chou, C.C., Chen, H., 2009. Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia. J. Biol. Chem. 284, 17411–17419.

Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., Brand, A.H., 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in Drosophila neural stem cells. Dev. Cell. 11, 775–789.

Chotard, C., Leung, W., Salecker, I., 2005. Glial cells missing and Gcm2 cell autonomously regulate both glial and neuronal development in the visual system of Drosophila. Neuron 48, 237–251.

Colonques, J., Ceron, J., Tejedor, F.J., 2007. Segregation of postembryonic neuronal and glial lineages inferred from a mosaic analysis of the Drosophila larval brain. Mech. Dev. 124, 327–340.

Dai, Q., Smibert, P., Lai, E.C., 2012. Exploiting Drosophila genetics to understand microRNA function and regulation. Curr. Top Dev. Biol. 99, 201–235.

De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C., Giangrande, A., 2006. Huckebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. EMBO J. 25, 244–254.

Einhauer, A., Jungbauer, A., 2001. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. J. Biochem. Biophys. Methods 49, 455–465.

Ewer, J., 2005. Behavioral actions of neuropeptides in invertebrates: insights from Drosophila. Horm. Behav. 48, 418–429.

Farazi, T.A., Juranek, S.A., Tuschl, T., 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. Development 135, 1201–1214.

Fischer, J.A., Giniger, E., Maniatis, T., Ptashne, M., 1988. GAL4 activates transcription in Drosophila. Nature 332, 853–856.

Flici, H., Erkosar, B., Komonyi, O., Karatas, O.F., Laneve, P., Giangrande, A., 2011. Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia. Development 138, 4167–4178.

Flynt, A.S., Lai, E.C., 2008. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. Nat. Rev. Genet. 9, 831–842.

Förstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., Zamore, P.D., 2007. Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. Cell 130, 287–297.
Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M., 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell 40, 767–774.
Halter, D.A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S.S., Ito, K., Travers, A.A., 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, 317–332.
Hartenstein, V., Jan, Y.N., 1992. Studying Drosophila embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. Roux Arch. Dev. Biol. 201, 194–220.
Hartl, M., Loschek, L.F., Stephan, D., Siju, K.P., Knappmeyer, C., Kadow, I.C., 2011. A new Prospero and microRNA-279 pathway restricts CO2 receptor neuron formation. J. Neurosci. 31, 15660–15673.
Hewes, R.S., Park, D., Gauthier, S.A., Schaefer, A.M., Taghert, P.H., 2003. The bHLH protein Dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in Drosophila. Development 130, 1771–1781.
Ho, M.S., Chen, H., Chen, M., Jacques, C., Giangrande, A., Chien, C.T., 2009. Gcm protein degradation suppresses proliferation of glial progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 6778–6783.
Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., Hotta, Y., 1995. Glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in Drosophila. Cell 82, 1025–1036.
Jacques, C., Soustelle, L., Nagy, I., Diebold, C., Giangrande, A., 2009. A novel role of the glial fate determinant glial cells missing in hematopoiesis. Int. J. Dev. Biol. 53, 1013–1022.
Jones, B.W., Fetter, R.D., Tear, G., Goodman, C.S., 1995. Glial cells missing: a genetic switch that controls glial *versus* neuronal fate. Cell 82, 1013–1023.
Jones, B.W., Abeysekera, M., Galinska, J., Jolicoeur, E.M., 2004. Transcriptional control of glial and blood cell development in Drosophila: cis-regulatory elements of glial cells missing. Dev. Biol. 266, 374–387.
Kammerer, M., Giangrande, A., 2001. Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. EMBO J. 20, 4664–4673.
Knerr, I., Schubert, S.W., Wich, C., Amann, K., Aigner, T., Vogler, T., Jung, R., Dötsch, J., Rascher, W., 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, 3991–3998.
Kloosterman, W.P., Plasterk, R.H., 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. Dev. Cell. 11, 441–450.
Kataoka, Y., Takeichi, M., Uemura, T., 2001. Developmental roles and molecular characterization of a Drosophila homologue of *Arabidopsis Argonaute1*, the founder of a novel gene superfamily. Genes Cells 6, 313–325.
Lane, M.E., Kalderon, D., 1993. Genetic investigation of cAMP-dependant protein kinase function in Drosophila development. Genes Dev. 7, 1229–1243.
Lee, B.P., Jones, B.W., 2005. Transcriptional regulation of the Drosophila glial gene repo. Mech. Dev. 122, 849–862.
Luo, W., Sehgal, A., 2012. Regulation of circadian behavioral output via a MicroRNA-JAK/STAT circuit. Cell 148, 765–779.
Miller, A.A., Bernardoni, R., Giangrande, A., 1998. Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm. EMBO J. 17, 6316–6326.
Mlodzik, M., Baker, N.E., Rubin, G.M., 1990. Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in Drosophila. Genes Dev. 4, 1848–1861.
O'Brien, M.A., Taghert, P.H., 1998. A peritracheal neuropeptide system in insects: release of myomodulin-like peptides at ecdysis. J. Exp. Biol. 201, 193–209.
Park, D., Shafer, O.T., Shepherd, S.P., Suh, H., Trigg, J.S., Taghert, P.H., 2008. The Drosophila basic helix-loop-helix protein DIMMED directly activates PHM, a gene encoding a neuropeptide-amidating enzyme. Mol. Cell. Biol. 28, 410–421.
Popkova, A., Bernardoni, R., Diebold, C., Van de Bor, V., Schuettengruber, B., González, I., Busturia, A., Cavalli, G., Giangrande, A., 2012. Polycomb controls gliogenesis by regulating the transient expression of the Gcm/Glide fate determinant. PLOS Genet. 8 :e1003159, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003159.
Ragone, G., Bernardoni, R., Giangrande, A., 2001. A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 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., Giangrande, A., 2003. Transcriptional regulation of glial cell specification. Dev. Biol. 255, 138–150.
Schreiber, J., Sock, E., 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, 4739–4744.
Sokol, N.S., Ambros, V., 2005. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. Genes Dev. 19, 2343–2354.
Soustelle, L., Jacques, C., Altenhein, B., Technau, G.M., Volk, T., Giangrande, A., 2004. Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. Development 131, 4521–4532.
Soustelle, L., Giangrande, A., 2007a. Novel gcm-dependent lineages in the post-embryonic nervous system of Drosophila melanogaster. Dev. Dyn. 236, 2101–2108.
Soustelle, L., Giangrande, A., 2007b. Glial differentiation and the Gcm pathway. Neuron Glia Biol. 3, 5–16.
Soustelle, L., Trousse, F., Jacques, C., Ceron, J., Cochard, P., Soula, C., Giangrande, A., 2007. Neurogenic role of Gcm transcription factors is conserved in chicken spinal cord. Development 134, 625–634.
Soustelle, L., Roy, N., Ragone, G., Giangrande, A., 2008. Control of gcm RNA stability is necessary for proper glial cell fate acquisition. Mol. Cell. Neurosci. 37, 657–662.
Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D., 2007. Sorting of Drosophila small silencing RNAs. Cell 130, 299–308.
Trebuchet, G., Giangrande, A., 2012. Glial Cells in Neural Development. John Wiley & Sons, Ltd, Chichesterhttp://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0023740, In: eLS.
Van De Bor, V., Heitzler, P., Leger, S., Plessy, C., Giangrande, A., 2002. Precocious expression of the Glide/Gcm glial-promoting factor in Drosophila induces neurogenesis. Genetics 160, 1095–1106.
van Steensel, B., Henikoff, S., 2000. Identification of *in vivo* DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. Nat. Biotechnol. 18, 424–428.
Venken, K.J., He, Y., Hoskins, R.A., Bellen, H.J., 2006. P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. Science 314, 1747–1751.
Vincent, S., Vonesch, J.L., Giangrande, A., 1996. Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurons and glia. Development 122, 131–139.
Xiong, W.C., Okano, H., Patel, N.H., Blendy, J.A., Montell, C., 1994. repo encodes a glial-specific homeodomain protein required in the Drosophila nervous system. Genes Dev. 8, 981–994.
Yang, C.S., Yu, C., Chuang, H.C., Chang, C.W., Chang, G.D., Yao, T.P., Chen, H., 2005. FBW2 targets GCMa to the ubiquitin-proteasome degradation system. J. Biol. Chem. 280, 10083–10090.
Yoon, W.H., Meinhardt, H., Montell., D.J., 2011. miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold. Nat. Cell. Biol. 13, 1062–1069.
Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M., Tabata, T., 2005. DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of Drosophila. Development 132, 4587–4598.
Yasui, Y., Yamada, K., Takahashi, S., Sugiura-Ogasawara, M., Sato, K., Miyazawa, D., Sugiyama, T., Kitade, Y., Ueda, H., 2012. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway. Biochem. Biophys. Res Commun. 417, 1127–1132.
Zitnan, D., Kingan, T.G., Hermesman, J.L., Adams, M.E., 1996. Identification of ecdysis-triggering hormone from an epitracheal endocrine system. Science 271, 88–91.

SUPPLEMENTARY INDEX

- **Supplementary Methods (page 2)**
- **Supplementary Text (page 3)**
- **Supplementary Tables and Legends (page 4-6)**
- **Supplementary Figure Legends (page 7-9)**
- **Supplementary Movie 1 Legend (page 10)**
- **Supplementary References (page 11)**
- **Supplementary Figures (1-7, submitted as separate files)**

SUPPLEMENTARY METHODS

Immunoprecipitation assay

About 2.5mg of total protein extracts (from cells or embryos) were prepared in IP100 buffer (100mM KCl, 25mM Tris-HCl pH 7.9, 10% Glycerol, 5mM MgCl2, 0.3mM DTT, 0.1% NP40), pre-cleared against 100µl of protein G-Sepharose resin, and bound to 100µl of α-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma Aldrich) overnight at 4°C. Pellets were harvested, extensively washed in IP150 buffer and boiled in Laemli Buffer. 2µl-aliquots were analyzed by Western blot, in parallel to 10µl of each control fraction.

Phosphatase assay

30µg of S2 cell protein extracts overexpressing Gcm-FLAG were incubated with 10u of calf intestinal phosphatase (CIP, Promega) in CIP buffer for 30 min at 37°C. Boiling the samples in Laemli Buffer blocked the reaction, whose products were analyzed by Western blot.

Putative phosphorylation sites were predicted by the NetPhosK 1.0 server, available at: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/.

SUPPLEMENTARY TEXT

Gcm is expressed in two cephalic cell clusters

Two Gcm positive symmetric cell clusters are located laterally in the head region (Fig. 5A, B), similar to the profile obtained by *gcm in situ* hybridization (ISH; white triangles in Supplementary Fig. 3A, left panel). Gcm expression fades with time, hampering the identification of those cells at late stage. We therefore confirmed that the enhancer trap line gcm^{rA87} expressing the *lacZ* gene under the control of the *gcm* promoter is also active in the clusters and followed β-Gal expression during head morphogenesis (Supplementary Fig. 3B-D). These cells change position during development and, by the end of embryogenesis (stage 16-17) they are located rostrally, at the two sides of the mouth. They do not express Repo, or the neuronal marker Elav (Embryonic lethal abnormal vision, Robinow and White, 1998; Fig. 7A, B and Supplementary Fig. 3B-D) nor the pan-neuronal gene Prospero (Guenin et al., 2007; Supplementary Fig. 4A). Their compact morphology and position suggest that they could correspond to the head chemosensory organs [R. Stocker, personal communication and Grillenzoni et al., 2007]. However, a three dimensional (3D) reconstruction of the labeled region (Supplementary Movie 1 and Supplementary Fig. 4B) allowed us to distinguish the group of Gcm-expressing cells from the adjacent head dorsal (DO), terminal (TO) and ventral (VO) sensory organs.

NAME	SEQUENCE[1]	USE
miR-279 clon 100 FW	GAactagtGTTTTGCACTATCGCTTAATAATTG	*mir-279* cloning
miR-279 clon 100 RV	GAactagtGCGTCTCTTTTTTTTTTTCAAAG	*mir-279* cloning
miR-286 clon 100 FW	GAactagtTCACTGGGCAAAGTGTGTCTCAAG	*mir-286 cloning*
miR-286 clon 100 RV	GAactagtCCGGAAAAATCACCTAAGGCTGG	*mir-286 cloning*
gcm 3´UTR Kpn FW	GAGAggtaccGGGATCGGGATAAGATCTC	*gcm* UTR cloning
gcm 3´UTR Not RV	GAGAgcggccgcTTCTCAATACAAAATTTGG	*gcm* UTR cloning
gcm 3'UTR mut FW	CCTAGTTGATTGATTTCCATTC	*gcm* UTR mutagenesis
gcm 3'UTR mut RV	TGAGTGGCTCAGTAATAGTAGTTG	*gcm* UTR mutagenesis
antisense miR-279	TTAATGAGTGTGGATCTAGTCA	Northern blot
antisense miR-1	CTCCATACTTCTTTACATTCCA	Northern blot
antisense 5s rRNA	TGAACGCGCCCGATCTCGTCT	Northern blot
LA AscI	AggcgcgccTTGGGAATCTGTCACGCTGA	Cloning into Pacman
LA BamHi	TggatccCTTATGCAGCCATCTACCAG	Cloning into Pacman
RA BamHI	AggatccTAATCGCATAGTGGCCAGC	Cloning into Pacman
RA PacI	TttaattaaATGCCGCTTCCAATGCCATA	Cloning into Pacman
LA1 BamHI 2xFLAG[2]	ACggattcCATCTATTGCgactacaaagacgatgacgataaagactacaaagacgatgacgataaaTAGGGGATCGGGATAAGATCTCT	Cloning into Pacman
LA2 BamHI	CGggatccGTGCTGTTGACTGGGTGATA	Cloning into Pacman
LA2 NotI	AAGGAAAAAAgcggccgcACCAGTCAGCTATGATCCCA	Cloning into Pacman
RA NotI	AAGGAAAAAAgcggccgcAGTAATCGCATAGTGGCCAG	Cloning into Pacman
RA PacI	CCttaattaaATGCCGCTTCCAATGCCATA	Cloning into Pacman
Ffly FW	ACAGCAATACGGGAGTGGAG	Luc qPCR
Ffly RV	TCGTCTTTGTAGTCTTTATCGTCA	Luc qPCR
mCD8GFP FW	ACCGTTGACCCGCTTTCTGTC	mCD8GFP qPCR
mCD8GFP RV	CACTTCACATACCAGGTCCACCTTC	mCD8GFP qPCR
gcm F3	ACAGCAATACGGGAGTGGAG	*gcm*-FLAG qPCR
FLAG qPCR RV	TCGTCTTTGTAGTCTTTATCGTCA	*gcm*-FLAG qPCR

Supplementary Table 1: List of employed oligonucleotides.

1 Sequences 5'-3'; restriction sites in small caps
2 FLAG sequence underlined

Site ID	Sequence	Coordinates	P-value	Orientation
1	AGGCGGGT	2L: 9849797	3.6e-04	R
2	ATGCGGAT	2L: 9846596	7.2e-05	R
3	GGCCGCAT	2L: 9846474	1.6e-04	D
4	GCCCACAT	2L: 9845434	2.9e-04	D

Supplementary Table 2: **Predicted GBSs on the *Dmel-miR-1* promoter.**

The pattern-matching matrix scan software from RSAT (Thomas-Chollier et al., 2008), employing a matrix composed of already validated GBSs (Ragone et al., 2003), was used to locate putative binding sites in the 5kb region upstream of the *miR-1* transcribed region. The bioinformatically predicted sites are shown in Supplementary Fig. 6A.

The orientation is indicated according to the canonical sequence: D sites bear the same orientation as the canonical consensus, while R sites bear its reverse-complementary version.

Site ID	Sequence	Coordinates	P-value	Orientation
1	ACCCGCAT	2R: 9849797	1.8e-05	D
2	ATGCGGGT	2R: 9846596	1.8e-05	R
3	ATCCGCAT	2R: 9846474	7.5e-05	D
4	GCCCGCAA	2R: 9845434	1.0e-04	D
5	ACCCGCAT	2R: 9842985	1.6e-05	D
6	GCCCGCAG	2R: 9841583	2.1e-05	D

Supplementary Table 3: **Predicted GBSs on the *AGO1 locus* and promoter.** The same analysis performed on the *miR-1* locus was also performed onto *AGO1* genomic locus and on its 5kb region upstream region. Sites 1 and 5 correspond to the canonical consensus described in Akiyama et al., 1996 (ACCCGCAT). Other details like in the legend of Supplementary Table 2. Binding sites are reported in the Supplementary Fig. 7A.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1: *pUAST* based Gcm-FLAG-expressing construct.

A) Schematics of the *pUAST-gcm-FLAG* construct, carrying two copies of the sequence encoding the FLAG epitope, in frame to the 3' of Gcm coding sequence. Regulatory regions are represented as white boxes, expressed regions as grey (untranslated) or black (translated) boxes.

B) Immunoprecipitation analysis of extracts from S2 cells transfected with *UAS-WT gcm* (lanes Gcm) or *UAS-gcm-FLAG* (lanes Gcm-FLAG), immunoprecipitated with α-FLAG IgG (lanes α-FLAG) or with α-GST IgG, as a control (lanes α-GST). For each transfection, analyzed fractions were: total lysate (lanes EXTRACT), pre-cleared lysate (lanes INPUT), supernatants (lanes SUPER) and resin-bound proteins (lanes PELLET).

C) IP analysis of stage 9-14 embryos expressing WT (lanes *gcm*) or flagged Gcm (lanes *gcm-FLAG*), immunoprecipitated with α-FLAG IgG (lanes α-FLAG) or with α-GST IgG, as a control (lanes α-GST). For each genotype, analyzed fractions were like in Supplementary Fig. 1B.

Supplementary Figure 2: *gcm-FLAG*^{BAC} rescues gliogenesis in a *gcm* null background.

Expression of Gcm (FLAG) and Repo in rescued *gcm*^{26} mutant embryos (stage 13).

Supplementary Figure 3: *gcm* RNA is expressed in cephalic and abdominal cells.

A) gcm ISH on *gcm*^{26}*; gcm*^{BAC} embryos (stage 13-14). White triangles point to cephalic expression spots (left panel), corresponding to those described in Fig. 7A, B, F-H, and to abdominal dorsolateral Gcm(+) clusters (right panel) reported in Fig. 7A, C, and Fig. 8A.

B, C, D) β-Gal labeling of cephalic cell cluster (panel B) over development (stage 13, 14 and 16 respectively) in *gcm*^{rA87} embryos, bearing a LacZ insertion expressed under the control of the *gcm* promoter. By this stage, the FLAG is no longer expressed but the perdurance of the β-Gal allows us to follow the fate of the Gcm(+) cells in the head. β-Gal is shown in red. Repo (in green) and Elav (in blue) are also shown.

Supplementary Figure 4: *gcm* expression in the embryonic AMC.

A) Cephalic region of a stage 15 gcm^{rA87} embryo (lateral view) labeled with β-Gal (red), Elav (green) and Pros (blue). The cluster of β-Gal(+) cells (Gcm-expressing cells, white triangle) do not co-localize with Elav(+) nor with Pros(+) cells. Ventral cord (square bracket) and AMC region (dotted circle) are highlighted.

B) Snapshot taken by Movie 1. Stage 17 gcm^{rA87} embryo cephalic region labeled with α-β-Gal (green), α-22c10 (red) and α-Elav (blue). White triangle marks the Gcm(+) cell cluster; VO TO and DO indicate the Ventral, Terminal and Dorsal sensory Organs, respectively.

Supplementary Figure 5: Gcm post-transcriptional regulation *in vitro* and *in vivo*.

A) Immunoblot visualization of Gcm-FLAG from untreated (lane Un), buffer alone-treated (lane -) or CIP-treated (lane +) extracts. Arrowheads point to single bands. Note that only two bands are detected upon CIP treatment, one of which is quite weak (grey arrowhead). GFP was used as a transfection control.

B) Analysis of *miR-279* overexpression effect on gliogenesis. Quantification of Repo+ (glial) cells in the nerve cord of stage 14 embryos (left histogram: gcm^{26}/gcm^{34} background; right histogram: gcm^{34}*/Df(2L)132* background) upon overexpression of *miR-279* by *sca-Gal4* driver

The specific crosses established were: gcm^{34}*/CyO, twist-lacZ; UAS-miR-279* x gcm^{26}, *sca-Gal4/ CyO, twist-lacZ;* + (control: gcm^{34}*/CyO, twist-lacZ;* + x gcm^{26}, *sca-Gal4/CyO, twist-lacZ;* +) and gcm^{34}*/CyO, twist-lacZ; UAS-miR-279* x *Df(2L)132, sca-Gal4/CyO, twist-lacZ;* + (control: gcm^{34}*/CyO, twist-lacZ;* + x *Df(2L)132, sca-Gal4/CyO, twist-lacZ;* +). The genotypes were recognized by Repo labeling.

Supplementary Figure 6: *miR-1* is a putative direct target of *gcm*.

A) Profile of putative GBSs in the *miR-1* locus upstream region (5kb). GBSs are identified by numbers and shown as pointed box (gray, D orientation; white, R orientation). Curved arrow shows the position of the transcriptional start sites (TSSs). The conservation of the sites across various Drosophylid species and other Insecta is shown below as retrieved from the UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu/) Conservation track. GBS 1 appears to be the most conserved one, followed by sites 4 and 3. Site 2 shows almost no evolutionary conservation. Details like in Supplementary Figure 3. See Supplementary Table 2 for further information.

B) Northern blot analysis of *miR-1* expression in staged embryos upon *sca-Gal4* driven overexpression of Gcm (lanes 1: stage 10-11; lanes 2: stage 11-12; lanes 3: stage 12-13). 5s rRNA levels reflect the sample loading.

C) Northern blot analysis of *miR-1* in S2 cells, upon Gcm ectopic expression (2μg for 48h, lane *WT gcm*). RNA from untransfected cells (Un) or transfected with the empty vector (E) were used as negative controls. RNA from a mixed embryo population represents the positive control (Em).

Supplementary Figure 7: *AGO1* is a positive genetic interactor and a putative direct target of *gcm*.

A) Organization of the *AGO1* locus (according to FlyBase database, http://flybase.org/) and putative Gcm binding profile. Curved arrows show the position of the transcriptional start sites (TSSs) relative to the four different *AGO1* isoforms reported (RA, RB, RC and RD). Distances between the TSSs are indicated. GBSs 2, 3 and 5 show the highest degree of evolutionary conservation. See Supplementary Table 3 for other details.

B) gcm^{Pyx} genetic interaction with the *AGO1* mutation. Histogram presents the average number of bristles per heminotum (y-axis) in different genotypes (x-axis). At least thirty flies were analyzed for each genotype.

C) Western blot analysis of AGO1 in staged embryos overexpressing Gcm (lanes *sca-Gal4>UAS-gcm*) in the neurogenic territories *vs.* control embryos in a w^{1118} background (lanes *sca-Gal4>*w^{1118}). Details like in the legend of Supplementary Fig. 6B. Actin was used as a loading control. Note that, regardless of Gcm expression, AGO1 expression increases as development proceeds, revealing a temporal control of AGO1 during embryogenesis.

SUPPLEMENTARY MOVIE LEGEND

Supplementary Movie 1: *gcm* expression in embryonic head structures

3D reconstruction of stage 17 gcm^{rA87} embryo cephalic region stained with α-β-Gal (green), α-22c10 (red) and α-Elav (blue). White arrow marks the Gcm(+) cell cluster; VO TO and DO indicate the Ventral, Terminal and Dorsal sensory Organs, respectively.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Grillenzoni, N., de Vaux, V., Meuwly, J., Vuichard, S., Jarman, A., Holohan, E., Gendre, N., Stocker, R.F., 2007. Role of proneural genes in the formation of the larval olfactory organ of Drosophila. Dev Genes Evol. 217, 209-19.

Guenin L., Grosjean, Y., Fraichard, S., Acebes, A, Baba-Aissa, F., Ferveur, J.F., 2007. Spatio-temporal expression of Prospero is finely tuned to allow the correct development and function of the nervous system in Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 304, 62-74.

Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J.V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohée, S., van Helden J., 2008. RSAT: regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 36, 119-27.

Matériels et Méthodes

I. PRÉPARATION ET CULTURE DES MICROORGANISMES

I.A. Les souches d'*E .coli*

Les souches d'*E .coli* **DH5α** et **XL-1 BLUE s**ont utilisées pour amplifier un plasmide en vue de réaliser un clonage. Elles permettent d'exprimer des gènes clonés sous la dépendance du promoteur *tac*. Elles expriment une β-Galactosidase (β-Gal) inactive parce que tronquée du domaine N-terminal. L'activité de l'enzyme peut être restaurée par complémentation du fragment α, codé par un plasmide, conduisant à l'hydrolyse du X-Gal et l'obtention de colonies bleues. La souche **Rosetta2(DE3)pLysS** est utilisée pour la surproduction d'une protéine recombinante. Elle a été lysogénisée par le phage T7 et a intégré dans son génome le gène codant l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur lactose ainsi inductible par l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Cette souche contient aussi le plasmide pRARE qui code les ARNt décodant les codons rares et le lysozyme du phage T7. Ce plasmide confère à la bactérie la résistance au chloramphénicol.

E.coli est cultivé à 37 °C sous agitation dans le milieu LB (Luria Broth) (peptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L pour milieu gélosé) en présence de l'antibiotique adéquat (chloramphénicol 25 µg/mL ou ampicilline 100 µg/mL). Les cellules sont récoltées après une nuit, sauf indiqué différemment, par centrifugation à 5000 *g* pendant 15 min.

I.B. Préparation et transformation de cellules électro-compétentes

Les cellules de 1 L de culture, recueillies par centrifugation lorsque A_{600nm} = 0,8 UDO(unité de densité optique)/mL sont mises en suspension dans 0,5 L d'eau stérile froide et sédimentées. L'opération est répétée puis les cellules sont lavées dans 50 mL d'une solution de glycérol 10 %. Après centrifugation, elles sont reprises dans 5 mL de la même solution et conservées à -80 °C par fractions de 50 µL. Pour la transformation, 50 µL de cellules électro-compétentes décongelées sont mélangés avec 10 µL de milieu de ligation dialysé ou 50 ng d'ADN plasmidique dans une cuve d'électroporation. La transformation est effectuée par une décharge de 2,5 kvolts. L'appareil doit afficher une constante de temps de 4,7 à 4,8 ms. La suspension cellulaire est ensuite étalée sur milieu LB gélosé.

Nom	Séquence 5' -> 3'
Oligonucléotides utilisés pour la construction de *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4*	
srp(hemo) S	GAGAGGTACCCAGCGGGAGCAACAGGATC
srp(hemo)(ΔRBS) AS	GAGAGGTACCTATGGGATCCGTGCTGGGG
srp(hemo)(ΔRBS) S	CAGTTTCTCAGCCAGCCCCCCATAAGCCACCATCAG
srp(hemo) AS	GTCAAAGAGTCGGTCGGGGGGTATTCGGTGGTAGTC
Oligonucléotides utilisés pour la construction de *repo(4,3kb)ΔTBSs-GFP*	
repo (1,8kb) S	GAGAGGTACCGTCGACTTGCAGACTTTGTC
repo (ΔTBS4) AS	GATATTTACTTAAAAAACCTTTTTGAAAATATTTC
repo (ΔTBS4) S	GAAATATTTTCAAAAAGGTTTTTTAAGTAAATATC
repo (ΔTBS3) AS	GCTGCCGAATTATGTGGGCATTGCAATCG
repo (ΔTBS3) S	CGATTGCAATGCCCACATAATTCGGCAGC
repo (ΔTBS2) AS	CTTCATCGTCATTTTTGTTGGACGAAC
repo (ΔTBS2) S	GTTCGTCCAACAAAAATGACGATGAAG
repo (ΔTBS1) AS	CACTATATTTCTTTTTGCACTTATGTATG
repo (ΔTBS1) S	CATACATAAGTGCAAAAAGAAATATAGTGG
Repo (1,8kb) AS	GAGAGCTAGCGACTCGGCTACTGGCGATGATTGTC
Oligonucléotides utilisés pour la construction de *repo(0,7kb)ΔTBSs-GFP* et *repo(0,7kb)ΔTBSs-GFP*	
repo (0,7kb) S	GAGAGGTACCGAAATATTTTCATATGGGTTTTTTAAG
repo (0,7kb) AS	GAGAGCTAGCCACTATATTTCCATATGCACTTATGTATG
repo (0,7kbΔTBSs) S	GAGAGGTACCGAAATATTTTCAAAAAGGTTTTTTAAG
repo (0,7kbΔTBSs) AS	GAGAGCTAGCCACTATATTTCTTTTTGCACTTATGTATG
Oligonucléotides utilisés pour la PCR sur colonie	
repo (ΔTBS1) S	CATACATAAGTGCAAAAAGAAATATAGTGG
GFP AS	GGGTAGCGGCTGAAGCACTG
Oligonucléotides utilisés pour la construction de *STAT92E(2-4)-GFP* et *STAT92E(2-4)ΔGBSs-GFP*	
STAT92E S	GAGAGCTAGCCAGCCGTGTTCACCCGCATTG
STAT92E AS	GAGAGGTACCCTACCATTTACTTAAAGTCAC
STAT92E(ΔGBS1) S	GAGAGCTAGCCAGCCGTGTTCCTAATTTGTGTCTGCATTCTTCG
STAT92E (ΔGBS2) AS	CTCGGCGTGATTCCCTGTTTAATCACCTCCTTCTTCACC
STAT92E (ΔGBS2) S	GGTGAAGAAGGAGGTCTAATTTGAGGGAATCACGCCGAG
STAT92E (ΔGBS3) AS	GAGAGGTACCGACCTGGCACGCACTAATTTGGGCCGTCACGGATCG
Oligonucléotides utilisés pour la construction de *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*	
singed(2-3) S	GAGAGGTACCGGTAATTATGTATAGGTATGCGTGTGCGTGTTCGGTGTG
singed(2-3) AS	GAGAGCTAGCCGATAGTTTGCGTGGCCTGCTATTCTAACGGTAAAGAGC
singed(6-7) S	GAGAGGTACCCGTTTCTTGAAGTTCTTTGCCCGCAGAAGCCATTGTCGCCAC
singed(6-7) AS	GAGAGCTAGCGGATTGGCGAATGGATGCGGGGGTGGTGAGGCGACAC

Table 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR

S : sens; AS : antisens

II. MÉTHODES LIÉES À LA TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT

II.A. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une solution de tampon TAE (Tris 40 mM-acide acétique pH 7,9, acétate de sodium 20 mM, Na_2EDTA 2,5 mM) renfermant 1 % d'agarose est amenée à ébullition, homogénéisée et coulée un moule. Après solidification, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse et immergé dans le tampon TAE. 20 µL d'échantillon, contenant 0,2 à 0,5 µg d'ADN mélangé avec 5 µL de bleu de sarkosyl (sarcosine 2 %, bleu de bromophénol 0,12 %, Na_2EDTA 125 mM, glycérol 25 %) sont déposés dans les poches du gel. La migration est effectuée par application d'un courant de 100 volts. Le gel est révélé par immersion durant 10 min dans une solution de TAE renfermant 1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET) puis examiné sous les rayons UV.

II.B. Réaction d'amplification en chaîne (PCR)

II.B.1. PCR classique

Le milieu réactionnel d'un volume de 50 µL renferme dans le tampon livré par le fournisseur : 15 µM d'oligonucléotides sens et antisens, 600 µM de chaque dNTP, 100 ng d'ADN matrice et 3 U de phusion® ADN polymérase (Biorad). Le milieu est placé dans un thermocycleur dont les étapes sont paramétrées de la manière suivante : a) 4 min de dénaturation à 94 °C puis b) 40 cycles incluant 1 min de dénaturation à 94 °C, 1 min d'hybridation à 55 °C et 1 min/kb d'élongation à 72 °C puis c) 7 min de terminaison d'élongation à 72 °C. Les produits de PCR synthétisés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans le cas d'une PCR sur colonie, le clone est resuspendu dans 50 µL d'eau et lysé par 5 min d'incubation dans l'eau bouillante. Après centrifugation 1 min à 11000 g, 5 µL de la suspension sont utilisés comme matrice pour la PCR.

Figure 48 : Mutagénèse des quatre TBSs du promoteur de *repo*

A) Pour illustrer le processus de mutagénèse dirigé, le schéma montre les différentes étapes de la mutagénèse des sites TBSs présents sur un fragment du promoteur de *repo*. Les TBSs ont été mutés par PCR, les oligonucléotides (numérotés de 1 à 6) utilisés apportant les mutations aux niveaux des TBSs. Dans une première étape d'amplification, des petits fragments mutés, chevauchants, ont été synthétisés. Dans une seconde étape d'amplification, les petits fragments chevauchants ont été utilisés comme matrices et fusionnés lors d'une amplification par PCR en utilisant les oligonucléotides aux extrémités. B-C) Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. MT : Marqueur de taille.

II.B.1. Mutagénèse par PCR

Pour effectuer une ou plusieurs mutagenèses dirigées, une succession d'étapes d'amplification par PCR est requise (**Fig. 48**). Les mutations sont apportées par les oligonucléotides utilisés. La première étape consiste à générer plusieurs petits fragments chevauchants qui seront fusionnés lors de la seconde étape. Pour cela, 50-100 ng de ces petits fragments sont utilisés comme matrice en quantité équimolaire. A chaque étape, la taille et la qualité des produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose puis purifiés selon le kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean-up ». Avant la fusion des fragments, il est primordial de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Si des bandes non spécifiques sont détectées, le produit de PCR peut être purifié sur gel selon le même kit

II.C. Extraction et purification de l'ADN

II.C.1. Extraction de l'ADN génomique

30 drosophiles sont broyées dans 200 µL de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 0.5 %) jusqu'à obtenir une solution homogène qui est alors incubée à 65 °C pendant 30 min. La solution est ensuite complétée par 800 µL de sels (LiCl 3.6 M, KAc 1.4 M) et incubée dans la glace pendant 10 min. Après 15 min de centrifugation à 11 000 g, le surnageant est isolé et l'ADN génomique précipité par l'ajout de 0.6 volume d'isopropanol. Après une nouvelle étape de centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans 150 µL d'eau.

II.C.2. Extraction de l'ADN plasmidique

Les minipréparations d'ADN plasmidique s'effectuent selon le protocole du kit Nucleospin® plasmid (Macherey-Nagel) et les maxipréparations d'ADN plasmidique selon le protocole du kit Genelute™ Hp plasmid maxiprep (Sigma). La concentration en acide nucléique se détermine au Nanodrop®.

Figure 49 : Carte du plasmide *psrp(hemo)-Gal4*

A) Le plasmide *psrp(hemo)-Gal4* (gentiment fourni par le Dr. Katja Bruckner) a été utilisé comme rapporteur transcriptionnel du gène *srp*. Construit à partir d'un plasmide de type *pUC*, il contient un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication, un élément P et le marqueur de transgénèse *miniwhite*. La séquence *srp(hemo),* qui conduit l'expression de *srp* dans les hémocytes, est insérée en amont de la séquence codante du facteur de transcription Gal4. B) Cartographie de la séquence *srp(hemo)* (Noir) sur le locus du gène *srp*. *srp(hemo)* est composée de la fusion de deux fragments appelés « enhancer » et « promoter ». Le site canonique de fixation de la protéine Repo (RBS) est indiqué en rouge.

II.C.3. Purification des acides nucléiques

Précipitation alcoolique : 300 mM de NaAc sont ajoutés à la solution d'acides nucléiques. Ils précipitent par ajout 0,6 volume d'isopropanol. Le culot, recueilli après 20 min de centrifugation à 4 °C à 11 000 g est lavé à l'éthanol 70 %, séché, puis repris dans un volume d'eau approprié. **Extraction au phénol/chloroforme :** La solution d'acide nucléique est agitée vigoureusement au vortex en présence d'un volume de phénol saturé d'eau. Après une brève centrifugation d'1 min à 11000 g, la phase aqueuse supérieure est recueillie. La phase supérieure est ensuite vortexée en présence d'un volume de chloroforme et centrifugée de nouveau. Les acides nucléiques, toujours dans la phase supérieure, sont soumis ensuite à une précipitation alcoolique. **Purification sur colonne de silice :** Ce type de purification intervient dans différents kits, comme « Nucleospin Gel® and PCR Clean-up » ou « Nucleospin® plasmid » (Macherey-Nagel).

II.D. Modifications enzymatiques des acides nucléiques

Hydrolyse par les enzymes de restriction : L'ADN est digéré pendant 2 h à 37 °C en présence de 2 U d'enzyme de restriction par µg d'ADN dans le tampon livré par le fournisseur. Le produit de digestion est ensuite purifié en vue de la ligation. **Déphosphorylation de l'extrémité 5' du vecteur :** L'étape déphosphorylation permet d'éviter la recircularisation du vecteur vide et la reconstitution du plasmide sauvage lors de l'étape de ligation. Le vecteur linéarisé par digestion de restriction est incubé pendant 1 h à 37 °C avec 1 U de phosphatase alcaline par µg d'ADN. Il est ensuite purifié en vue de la ligation. **Ligation des fragments d'ADN dans un vecteur :** La ligation permet l'insertion d'un insert dans un plasmide. Elle s'effectue dans le tampon livré par le fournisseur durant une nuit à 16 °C en présence de 100 ng de vecteur linéarisé et déphosphorylé, une quantité variable d'insert et 1 U d'ADN ligase T4 (Fermentas). La même réaction en l'absence d'insert constitue le contrôle négatif. Avant de transformer des bactéries compétentes par électroporation, le produit de ligation doit être dialysé contre une membrane pour éliminer les sels. Après transformation, un nombre de colonie plus important doit être observé pour la réaction de ligation avec insert que pour le contrôle négatif.

Figure 50 : Carte du plasmide *pH-Stinger repo(4.3kb)-nGFP*

A) Originaire d'un plasmide de type *pUC*, le plasmide *pH-Stinger* contient un gène de résistance à l'ampicilline et une origine de réplication, un élément transposable de type élément P, le marqueur de transgénèse *miniwhite* et des séquences « insulator » pour limiter les effets de position. Le plasmide contient également la séquence codant pour la protéine GFP en aval du promoteur minimal *hsp70*, d'une boite TATA, et du multi site de clonage. Dans le plasmide *repo(4.3kb)-GFP,* le promoteur du gène *repo*, d'une taille de 4.3 kb, est inséré dans la cassette de clonage du vecteur *pH-Stinger*entre les sites KpnI et NheI. B) Carte génomique du promoteur de *repo*. Les lignes pointillées délimitent l'insert. La localisation des sites de restrictions (E = EcoRI, B = BamHI, X= XbaI, Sa = SacI et S = SalI) et des sites putatifs de fixation des protéines Gcm (GBSs, rouge), Repo (RBSs, bleu) et Twi (TBSs, jaune) sont indiqués

II.E. Les plasmides

II.E.1. Les vecteurs d'expression

Originaire d'un plasmide de type *pUC*, le plasmide ***pPac*** présente une taille de 6,9 kb. Il permet d'exprimer le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur constitutif du gène de l'Actine lors d'une expérience de co-transfection. Il confère également la résistance à l'ampicilline. Les vecteurs d'expressions *pPac-LacZ, pPac-repo, pPac-gcm-FLAG et pPac-twi* permettent donc d'exprimer constitutivement les protéines β-Gal, Repo, Gcm-FLAG et Twist respectivement. Le plasmide *pPac* vide est également utilisé comme contrôle négatif. Le plasmide *pGexKG-twi* a permis de produire chez *E.coli* la protéine Twi fusionnée à la Glutation S-transférase (GST) en N-ter. L'expression de la protéine de fusion GST-Twi est placée sous le contrôle du promoteur *tac* et du répresseur LacI et est ainsi inductible par l'IPTG.

II.E.2. Les rapporteurs transcriptionnels

Le rapporteur *psrp(hemo)-Gal4,* d'une taille de 15.4 kb, a été utilisé comme rapporteur transcriptionnel du gène *srp* (**Fig. 49**). Il exprime le facteur de transcription Gal4 selon les séquences du gène *srp* responsables de l'expression de *srp* dans les hémocytes **(Bruckner et al., 2004)**. L'analyse par BLAT de la séquence *srp(hemo*) (UCSC Genome Browser) montre qu'elle se compose de la fusion de deux fragments : le fragment « enhancer » et le fragment « promoter». La recherche de sites canoniques (CAATTA) de fixation pour la protéine Repo (RBS) par le programme RSAT montre la présence d'un seul site.

Le rapporteur *repo(4.3kb)-GFP* (**Fig. 50**), fut construit par Sara BERZSENYI au laboratoire. Il a été utilisé comme rapporteur transcriptionnel du gène *repo*. Dans ce plasmide, l'expression de la GFP dépend du promoteur de *repo,* d'une taille de 4.3 kb, inséré dans la cassette de clonage du plasmide *pH-Stinger* **(Barolo et al., 2004)**. Ce promoteur contient 11 sites de fixation de la protéine Gcm (GBSs), trois sites de fixation de la protéine Repo (RBSs) et quatre sites de fixation de la protéine Twi (TBSs). Il récapitule le territoire d'expression complet de *repo* **(Lee and Jones, 2005)**.

Figure 51 : Construction du plasmide *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4*

A) Schéma synoptique de la construction du plasmide *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4*. Le RBS, présent sur la séquence «promoter » du plasmide *psrp(hemo)-Gal4,* a été muté par PCR en prenant avantage des sites de restrictions KpnI flanquant cette séquence. Avant la ligation, le produit de PCR a été préalablement digéré par KpnI. En parallèle, le plasmide *psrp(hemo)-Gal4* a été soumis à la digestion par KpnI pour exciser l'insert sauvage et déphosphorylé. B) Analyse de restriction par KpnI montrant la présence de l'insert dans le vecteur recombiné. MT : marqueur de taille.

II.F. Clonages moléculaires

II.F.1. Génération du rapporteur muté *psrp(hemo)ΔRBS-Gal4*

J'ai entrepris la mutagénèse du RBS présent sur le fragment « promoter » du plasmide *psrp(hemo)-Gal4*. Ce fragment est flanqué de deux sites de restriction KpnI permettant un clonage bidirectionnel (**Fig. 51A**). Un fragment « promoter » portant un RBS muté et flanqué de sites KpnI à d'abord été généré par PCR. La mutation ainsi que les sites de restriction y ont été introduits par les oligonucléotides utilisés. Le produit de PCR a été purifié, soumis à la digestion par KpnI puis purifié de nouveau. En parallèle, le plasmide *psrp(hemo)-Gal4* a été soumis la digestion par KpnI, (ce qui conduit à l'excision du fragment « promoter » sauvage), déphosphorylé puis purifié. Les vecteurs recombinants ont alors été isolés par mini-préparation d'ADN plasmidique. L'analyse de restriction par KpnI a ensuite permis de déterminer les clones ayant intégré l'insert (**Fig. 51B**). Finalement, le séquençage des plasmides (compagnie GATC) a permis de déterminer les clones ayant inséré le fragment dans la bonne orientation et de vérifier la justesse de la séquence du fragment cloné.

II.F.2. Génération du rapporteur *repo(4.3kb)ΔTBSs-GFP*

La mutation des quatre TBSs présents sur le plasmide *repo(4.3 kb)–GFP* (construit par Shara BERZSENYI) a été entreprise. Ces sites sont localisés dans un fragment de 0.7 kb du promoteur de *repo*, lui-même localisé à 1 kb du site d'initiation de la transcription. Pour muter ces sites, j'ai pris avantage de deux sites de restriction BamHI. L'un est localisé à -1.8 kb tandis que l'autre se trouve dans la cassette de clonage en 3' du promoteur de *repo*. Le fragment du promoteur proximal de *repo* d'une taille de 1.8 kb, portant des TBSs mutés et flanqués par des sites BamHI, a été amplifié par plusieurs étapes de PCR successives (**Fig. 52A**). Les mutations au niveau des TBSs et les sites de restriction BamHI ont été introduits par les oligonucléotides utilisés. Le produit de PCR a été purifié, soumis à la digestion par BamHI puis purifié de nouveau. En parallèle, le plasmide *repo(4.3kb)-GFP* a été soumis la digestion par BamHI puis déphosphorylé. Après une étape de purification du plasmide, le plasmide linéarisé a été soumis à une étape de ligation en présence de l'insert. Le produit de ligation, dialysé, a été

Figure 52 : Construction du plasmide *repo(4.3kb)ΔTBS-GFP*

A) Schéma synoptique de la construction du plasmide *repo(4.3kb)ΔTBS-GFP*. Les TBSs, présents sur le promoteur de *repo* ont été mutés par PCR à partir du plasmide *repo(4.3kb)-GFP* en prenant avantage des sites de restrictions BamHI présents de chaque côté. Avant la ligation, le produit de PCR est digéré par KpnI. En parallèle, le plasmide *repo(4.3kb)-GFP* soumis à la digestion par BamHI, pour exciser le fragment sauvage, puis déphosphorylé. B) Analyse de restriction par BamHI montrant la présence de l'insert dans le vecteur recombiné. MT : marqueur de taille.

utilisé pour transformer des bactéries et les vecteurs recombinants ont été isolés par mini-préparation d'ADN plasmidique. L'analyse de restriction par BamHI a permis de déterminer les clones ayant intégré l'insert (**Fig. 52B**). Les autres clones, contaminants, correspondent vraisemblablement à une religation du plasmide sur lui-même. L'orientation du fragment et la justesse de la séquence ont été contrôlées lors du séquençage.

II.F.3. Génération du rapporteur *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBSs-GFP*

Les plasmides *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP* ont été construits en collaboration avec Maria PEZZE, une étudiante en Master que j'ai supervisé. Des fragments du promoteur de *repo* d'une taille de 0.7 kb, sauvages ou mutés pour les sites TBSs, ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides *repo(4.3kb)-GFP* et *repo(4.3kb)ΔTBS-GFP* (**Fig. 53A**). Les sites de restriction KpnI en 5' et NheI en 3' ont été introduits par les oligonucléotides utilisés. Après une étape de purification, les produits de PCR ont été soumis à la double digestion par KpnI et NheI puis purifiés de nouveau. En parallèle, le plasmide *pH-Stinger* a été linéarisé par la même double digestion, déphosphorylé et purifié. Les inserts sauvages ou mutants pour les sites TBSs ont été intégrés dans le plasmide *pH-Stinger* par ligation. Après une étape de dialyse, le produit de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries électro-compétentes. Les clones recombinants ont été criblés par PCR sur colonies en utilisant des oligonucléotides sens et antisens de localisés de part et d'autre du site BamHI en 3'. (**Fig. 53B**). Après minipréparation d'ADN plasmidique, l'absence de mutations aspécifiques a été vérifiée après séquençage des plasmides. Pour obtenir une purification de meilleure qualité permettant la transgénèse, les plasmides *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP* ont été purifiés par la technicienne Claude DELAPORTE par centrifugation sur gradient de chlorure de césium en présence de BET.

Figure 53 : Construction des rapporteurs *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP*

A) Schéma synoptique de la construction des plasmides *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP*. Un fragment du promoteur de *repo* d'une taille de 0.7 kb, contenant les quatre TBSs et flanqué par les sites de restriction KpnI et NheI, a été amplifié à partir des plasmides *repo(4.3kb)-GFP* et *repo(4.3kb)ΔTBS-GFP*. Les TBSs, présents sur ce fragment ont ensuite été mutés par PCR. Les fragments sauvages et mutants ont été digérés par les enzymes de restriction KpnI et NheI puis clonés dans le vecteur *pH-Stinger* préalablement digéré par les mêmes enzymes et déphosphorylé. B) Crible des clones recombinants par PCR sur colonies en utilisant des oligonucléotides comme décrit sur le schéma (A, flèches). L'amplification d'une bande spécifique d'environ 1 kb révèle la présence de l'insert. MT : marqueur de taille.

II.F.3. Génération des autres rapporteurs transcriptionnels : *STAT92E(2-4)-GFP*, *STAT92E(2-4)ΔGBSs-GFP*, *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*.

Les fragments de promoteurs *STAT92E(2-4)*, *singed(2-3)* et *singed(6-7)* (**Fig. 42 et Fig. 45**) ont été amplifiés à partir d'ADN génomique de drosophile (**Fig. 54A**). Les trois GBSs présents sur le fragment *STAT92E(2-4)* ont été mutés par PCR pour générer le fragment muté *STAT92E(2-4)ΔGBSs*. Pour la suite, les inserts *STAT92E(2-4)*, *STAT92E(2-4)ΔGBSs, singed(2-3)* et *singed(6-7)* ont été clonés dans le plasmide *pH-Stinger* entre les sites KpnI et NheI selon le même principe que décrit dans le paragraphe précédent. Les clones recombinants ont été criblés par analyse de restriction (**Fig. 54B,C**) et séquencés par la compagnie GATC.

Figure 54 : Construction des rapporteurs *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBS-GFP*

A) Schéma synoptique de la construction des plasmides *STAT92E(2-4)-GFP*, *STAT92E(2-4)ΔGBSs-GFP*, *singed(2-3)-GFP* et *singed(6-7)-GFP*. Les fragments de gènes *STAT92E(2-4), singed(2-3)* et *singed(6-7)-GFP* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de drosophile et les GBSs présents sur le fragment *STAT92E(2-4)* ont ensuite été muté par PCR pour généré le fragment muté *STAT92E(2-4)ΔGBSs*. Les inserts ont été soumis à la double digestion par KpnI et NheI avant d'être cloné dans le plasmide *pH-Stinger* préalablement digéré par les mêmes enzymes et déphosphorylé. B-C) Analyse de restriction (KpnI/NheI) de deux clones correspondant à chaque plasmide. Après digestion, la présence d'une bande correspondant à la taille de l'insert montre la présence de celui-ci dans le vecteur. MT : marqueur de taille ; D/ND : plasmide digéré ou non digéré.

III. METHODES COURANTES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

III.A. Culture cellulaire et transfection

Les cellules de drosophile S2 (Invitrogen) sont semi-adhérentes. Elles sont cultivées dans du milieu GIBCO® Schneider (10 % de sérum de veau inactivé par la chaleur ; 0,5 % Pénicilline/Streptomycine). Deux fois par semaine, les cellules sont détachées, diluées dans du milieu frais et remise en culture à un taux de confluence compris entre 50 et 80 %. Pour la transfection, six millions de cellules, sont déposées sur des plaques six puits dans un volume de 1.6 mL. Elles sont délicatement homogénéisées avant 6 h d'incubation à 25° C. Les transfections sont réalisées avec le réactif de transfection Effectene® (Qiagen) selon le protocole indiqué par le fournisseur. Le mix de transfection est déposé goutte à goutte sur les cellules puis délicatement homogénéisé. Les résultats peuvent être analysés entre 24 et 48 h après la transfection.

III.B. Techniques liées à l'étude des protéines

III.B.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le gel de séparation (acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 10 %, dodécylsulfate de sodium (SDS) 0,1 %, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, persulfate d'ammonium (APS) 0,1 %, tétraméthylène diamine (TEMED) 0,1 %) est coulé en premier. Après polymérisation, le gel de concentration (acrylamide/bisacrylamide 4 %, SDS 0,3 %, Tris-HCl 166,7 mM pH 6,8, APS 0,1 %, TEMED 0,1 %) est coulé par-dessus. Le gel est ensuite placé dans la cuve et immergé dans le tampon d'électrophorèse (Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 % à pH 9). 20 µL d'échantillon, renfermant 20 µg d'extrait protéique sont dénaturés par 5 min d'incubation à 95 °C avec 4 µL de solution dissociante (62 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2 % de SDS, 0,1 M de β-mercaptoéthanol, 10 % de glycérol et 0,0125 % de bleu de bromophénol) puis sont déposés dans les poches du gel. La migration est effectuée en présence d'un courant électrique de 200 volts. Pour une coloration au bleu de Coomassie, le gel est démoulé, dialysé contre une solution d'acide acétique à 10 % sous agitation, et révélé par coloration durant 30 min avec une solution renfermant 1 g/L de bleu de

Figure 55 : Surproduction et purification de la protéine GST-Twi

Analyse par SDS-PAGE des extraits protéiques issus des différentes étapes de la production et de la purification de la protéine GST-Twi (tête de flèche). A) Induction. B) Extraction des protéines solubles. C) Purification d'affinité. NI : Culture non induite ; I : Culture induite. C : Culot ; S : Surnageant ; Poubelle : fraction non retenue sur la colonne ; Lavage : fraction éluée après lavage ; Vm : Volume mort.

Coomassie, 10 % d'acide acétique et 50 % d'éthanol. L'excès de colorant est éliminé par lavage du gel dans une solution renfermant 10 % d'acide acétique et 10 % d'éthanol.

III.B.2. Surproduction et purification de la protéine GST-Twi

La protéine GST-Twi a été surproduite dans des bactéries Rosetta2(DE3)pLysS transformées par le vecteur d'expression *pGexKG-Twi*. Pour la production d'une protéine recombinante chez *E.coli*, une culture de 2 L est mise à incuber à 18 °C sous agitation en présence des antibiotiques adéquats. Lorsque A_{600nm} = 0,8 UDO/mL, la surproduction de la protéine est initiée par l'ajout d'IPTG à 0.1 mM final. Après 2 h d'induction, la surproduction de la protéine GST-Twi a été contrôlée par SDS-PAGE (**Fig. 55A**).

La culture est ensuite centrifugée et le culot repris dans 20 ml de tampon de sonication (Tris 10 mM pH8, NaCl 100 mM, DTT 1 mM) supplémenté en inhibiteur de protéases (PIC) (Roche). Les cellules sont cassées par 4 étapes d'1 min de sonication sous agitation et dans la glace en utilisant un sonicateur Vibracell (Bioblock Scientific). L'appareil est réglé sur une amplitude de 30 % et des cycles de pulsations de 4 s d'ultrasons entrecoupées de 4 s. L'extrait cellulaire est centrifugé pendant 30 min à 13000 *g* à 4 °C. Un échantillon du surnageant et du culot a été analysé par SDS-PAGE pour confirmer la solubilité de la protéine (**Fig. 55B**).

La protéine GST-Twi a été purifiée par purification d'affinité Glutation(GSH)/GST. Une colonne contenant 2 mL de billes de Glutathion Sepharose (GE Healthcare) est d'abord équilibrée avec 15 mL de tampon de sonication. Pendant ce temps, le surnageant de sonication est filtré à 22 µm. La protéine d'intérêt est ensuite adsorbée sur la colonne par incubation de pendant une nuit sur roue à 4 °C. Après décantation des billes et trois étapes de lavage avec 10 mL de tampon (Tris 10 mM, NaCl 500 mM, 0.1 % Triton-X100), la protéine d'intérêt est éluée dans 3 mL du même tampon supplémenté avec 50 mM de GSH et collectée par fractions de 500 mL. L'efficacité de la purification est alors évaluée par SDS-PAGE (**Fig. 55C**). La protéine pure est finalement dialysée (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, glycérol 50 %) puis stockée à -20 °C.

Nom	Séquence 5' -> 3'	Utilisation
miR-1 AS	CTCCATACTTCTTTACATTCCA	Northern blot
5S AS	TGAACGCGCCCGATCTCGTCT	Northern blot
repo(TBS1) S	CAACATAAGTGCATATGGAAATATAGTG	EMSA
repo(TBS1) AS	CACTATATTTCCATATGCACTTATGTTG	EMSA
repo(ΔTBS1) S	CAACATAAGTGCAAAAAGAAATATAGTG	EMSA
repo(ΔTBS1) AS	CACTATATTTCTTTTTGCACTTATGTTG	EMSA

Table 2 : Liste des oligonucléotides radiomarqués en 5'

S : sens ; AS : antisens

III.B.3. Expérience de retard de migration électrophorétique (EMSA)

Radiomarquage en 5' : 20 pmol d'oligonucléotides dimérisés sont incubés avec 10 U de T4 PNK (Polynucléotide Kinase) (Biolabs®) et 50 pmol de γ^{32}ATP dans un volume réactionnel de 20 µL pendant 45 min à 37 °C en présence du tampon recommandé par le fournisseur. Le mélange réactionnel est ensuite supplémenté avec 70 µL d'eau puis déposé sur 1 mL de résine Sephadex® G-25. Les sondes sont alors purifiées par 1 min de centrifugation à 1000 g.

0-2 µg de protéine pure sont incubées avec 15 000 cpm de sonde radiomarquée double brin dans 20 µL de tampon de liaison (Tris-HCl 8 mM pH 8, HEPES 24 mM pH 7.9, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM, glycérol 12 %) pendant 1 h à température ambiante. Pendant ce temps, le gel de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 6 %, TBE, APS 0.1 %, TEMED 0.1 %) est coulé entre deux plaques de verre dans du tampon TBE (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM). Après polymérisation, le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse, immergé dans le tampon TBE et soumis à une étape de pré-migration à 100 V pendant 30 min. Les échantillons sont ensuite supplémentés avec 5 mL de bleu formamide (bleu de bromophénol 0.02 %, bleu de xylène cyanol 0.02 %, formamide 90 %) et déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue par l'application d'un courant de 100 V. Le gel est ensuite séché sous vide, exposé sur la nuit contre un film autoradiographique avant d'être analysé avec l'appareil Typhoon 8600 (Molecular dynamics).

III.B.4. Western Blot

Après SDS-PAGE, le gel est monté en « sandwich » contre une membrane de nitrocellulose. Les protéines sont transférées pendant 2 h à 100 volts dans du tampon de transfert (10 mM Tris-HCl, 100 mM Glycine, éthanol 20 %). La membrane est lavées 5 min dans du PBS-Tween (PBS, Tween 0.1 %). Elle est ensuite bloquée (PBS-Tween, lait 3 %) pendant 1 h sous agitation douce avant d'ajouter l'anticorps primaire sur la nuit à 4 °C. Les anticorps primaires qui ont été utilisés sont les suivants : anti-β-Gal de souris, 1/5000 (Sigma), anti-Actine de lapin (1/10000) (Sigma), anti-GFP de lapin (1/5000) (Molecular Probes), anti-Repo de souris (1/10) (DHSB), anti-FLAG de souris (1/5000) (Sigma) et anti-Singed de souris (1/200) (DHSB). Après quatre lavages successifs de 10 min dans du PBS-Tween, la membrane est incubée 1 h à

Figure 56 : Détection de l'expression de Twi et Srp par immunocytochimie

Cellules S2 co-transfectées par un vecteur d'expression de la β-Gal et de Twi (A) ou de Srp (B). Les cellules sont marquées avec le DAPI, la β-Gal et Twi (A) ou Srp (B).

température ambiante avec l'anticorps secondaire correspondant (Jackson) (1/5000 dans la solution de blocage). Les anticorps secondaires sont conjugués à la protéine HRP (HorseRadish Peroxidase) permettant une révélation par chimioluminescence. Après deux étapes de lavages aux PBS-Tween, la révélation par chimiluminescence sur des films autoradiographiques (GE Healthcare) est effectuée selon le protocole du kit Western Lightning® *Plus*-ECL.

III.B.5. Immunocytochimie

L'immunocytochimie a été utilisée pour vérifier l'expression de protéines d'intérêts surexprimées dans les cellules S2 et non détectables par Western Blot (**Fig. 56**). Les cellules sont détachées par pipetage et déposées sur des lamelles en verre pendant 6 h avant d'être lavées deux fois au PBS pendant 10 min sous agitation douce. Les cellules sont ensuite fixées pendant 20 min (PBS, paraformaldéhyde 4 %). Elles sont perméabilisées par incubation avec du PTX pendant 10 min avant une étape de blocage (PTX, normal goat sérum (NGS) 5 %) d'1 h. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage sur la nuit à 4 °C sous agitation. Les anticorps primaires qui ont été utilisés sont les suivants : anti-Twist de lapin (1/1000) **(Thisse et al., 1988)**, anti-Srp de lapin (1/1000) **(Hoshizaki et al., 1994; Sam et al., 1996)** ou anti-β-Gal de souris (1/1000) (Sigma). Quatre lavages de 10 min avec du PTX sont effectués avant d'incuber les cellules avec les anticorps secondaires dilués au 1/500 dans la solution bloquante. Les cellules sont traitées au DAPI (PTX, DAPI 0.5 ng/ml) pendant 10 min. Les cellules sont montées entre lames et lamelles en présence de Vectashield® (Vector) et observées au microscope à épifluorescence.

III.B.6. Production et purification de l'anticorps anti-Srp

La production de l'anticorps anti-Srp a été réalisée à partir d'un peptide de 18 résidus d'aa, C-ter CQHVTNYAMHKFGVDRET N-ter, correspondant à l'extrémité N-ter de la protéine Srp **(Hoshizaki et al., 1994; Sam et al., 1996)**. Le peptide a été produit et purifié par Pascal EBERLING, responsable de la plateforme de production de peptide de l'IGBMC. J'ai moi-même couplé le peptide à l'ovalbumine selon le kit Imject® Maleimide Activated Ovalbumin (Pierce). Le sérum de lapin contenant l'anticorps polyclonal anti-Srp a été obtenu par

Nom	Séquence 5' -> 3'
gcm S	ACAGCAATACGGGAGTGGAC
gcm AS	AGGGACTAGAACAACGCTTGA
repo S	AAGCAGCAGCAAGAAGAAGG
repo AS	ATACGGAGCACGTTCAAAGG
actin S	GCAGCAACTTCTTCGTCACA
actin AS	CTTAGCTCAGCCTCGCCACT

Table 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR

S : sens ; AS : antisens

Gilles DUVAL, responsable de la plateforme de production d'anticorps polyclonaux de l'institut. Finalement, j'ai moi-même purifié l'anticorps anti-Srp par chromatographie d'affinité anticorps/antigène selon le kit SulfoLink® Coupling Gel (Pierce).

III.C. Techniques liées à l'étude des ARNs

III.C.1. Extraction des ARNs solubles

Pour prévenir la dégradation des ARNs, toutes les manipulations sont effectuées dans la glace (sauf si le cas contraire est précisé), du matériel « RNAse-free » et avec des gants.

Les embryons sont broyés dans 100 µL de Tri-Reagent ®. Lorsque la solution est homogène, le volume de Tri-Reagent® est augmenté à 250 µL et la solution est incubée à température ambiante pendant 5 min. Elle est ensuite supplémentée avec 50 µL de chloroforme, vortexée et centrifugée à 11 000 g pendant 10 min à 4 °C. La phase supérieure, soluble, est collectée. Les ARNs sont précipités par l'ajout de 125 µL d'isopropanol puis centrifugés de nouveau pendant 30 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, les ARNs sont lavés deux fois à l'éthanol 70 % et centrifugés pendant 5 min. Une fois l'éthanol éliminé, le culot est séché et les ARNs sont resuspendus dans 20 µL d'eau, quantifiés au nanodrop® et stockés à -20 °C.

III.C.2. qRT-PCR

Les ARNs sont traités à la DNase 1 en présence RNasein® et du tampon adéquat. La réaction est incubée pendant 30 min à 37 °C puis 20 min à 65 °C pour inactiver l'enzyme. La synthèse d'ADNc est effectuée selon le kit SuperSript™® II RT (Invitrogen). 500 ng d'ARNs traités sont mis en présence de 500 ng d'Oligo$(dT)_{12-18}$ et 10 mM de chaque dNTP dans un volume de 12 µL. Les ARNs sont dénaturés à 65 °C pendant 5 min puis refroidis dans la glace pour prévenir leur restructuration. Le mélange réactionnel est préincubé 2 min à 42 °C avec 4 µL de tampon recommandé par le fournisseur et 2 µL de DTT 0.1 M. La synthèse d'ADNc s'accomplie pendant 50 min à la même température en présence de 200 U de transcriptase inverse. L'enzyme est ensuite inactivée à 70 °C pendant 10 min.

La réaction de PCR quantitative s'opère dans des plaques 96 puits à partir de 25 ng d'ADNc. 2 µL d'oligonucléotides sens et antisens (20 µM chacun) 8 µL de SYBR® Green et 5 µL d'eau. La qPCR s'effectue dans un LightCycler® 480 II (Roche). Pour chaque gène, la quantification relative est déterminée part rapport une courbe standard réalisée à partir de dilution en cascade. Chaque mesure est ensuite normalisée par celle de l'actine.

III.C.3.Northern Blot

Le gel de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 19/1 10 %, MOPS/HCl 0.02 M à pH 7, UREA 7 M, APS 0.1 %, TEMED 0.1 % est coulé entre deux plaques de verre. Après polymérisation, le gel est placé dans la cuve, immergé dans le tampon d'électrophorèse MOPS/HCl 0.2 M à pH 7 puis soumis à une étape de pré-migration à 200 volts pendant 10 min. Pendant ce temps, 2 µg d'ARN sont mélangés à 6 µL d'eau et 6 µL de bleu formamide, dénaturés par 5 min d'incubation à 95 °C puis déposés dans les poches du gel. La migration est effectuée en présence d'un courant électrique de 200 volts. Après l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide est monté en « sandwich » contre une membrane de nitrocellulose. Les ARNs y sont transférés par l'application d'un courant électrique de 20 volts pendant 10 min dans le tampon MOPS/HCl 0.2 M à pH 7. Une fois le transfert terminé, la membrane est montée dans un second « sandwich » en présence d'une solution fixative (1-métylimidazole 0.15 M, HCl 0.012 M et 1-Ethyl-3-(Diméthylaminopropyle) Carbodiimide (EDC) 3 %) pendant 2 h à 60 °C.

La membrane est ensuite soumise à une étape de pré-hybridation pendant 3 h sur roue à 37 °C dans le tampon SSC 2x (SSC : 150 mM, citrate de sodium 15 mM, pH 7.2) en présence d'1 % de SDS et 100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon (ssDNA) préalablement dénaturé 5 min à 95 °C puis refroidi dans la glace pour prévenir sa renaturation. L'étape d'hybridation s'effectue sur la nuit par l'ajout des sondes ainsi que 100 µg/mL de ssDNA, tous deux préalablement dénaturés 5 min à 95 °C puis refroidi dans la glace. Suite à l'hybridation, la membrane est lavée au moins deux fois 15 min dans le tampon SSC 0.1x en présence de 0.2 % de SDS. La présence de radioactivité est finalement détectée par autoradiographie et l'appareil Typhoon 8600 (Molecular dynamics).

Figure 57 : Le système UAS/Gal4

A) La femelle possède le transgène *sca-Gal4* conduisant l'expression du facteur de transactivateur Gal4 dans l'ectoderme neurogénique, sous le contrôle du promoteur de *sca*. Le mâle porte le transgène *UAS-GFP*. Le facteur Gal4 reconnaît spécifiquement la séquence UAS ainsi les embryons issus de ce croisement expriment ectopiquement la protéine GFP dans l'ectoderme neurogénique. B) Double marquage Repo et GFP effectué sur des embryons *sca-Gal4 ; UAS-GFP*. C) La femelle possède le transgène *gcm-Gal4* qui conduit l'expression de Gal4 dans le territoire de *gcm* (les hémocytes et les cellules gliales). Elle porte aussi le transgène *repo-Gal80* qui conduit l'expression de Gal80, l'inhibiteur de Gal4, dans la glie. En conséquence, Gal4 est exprimé dans les hémocytes et exclut des cellules gliales. Le croisement avec un mâle portant le transgène UAS-GFP conduit donc à l'expression de la GFP dans les hémocytes de leur progéniture. D) Double marquage Repo et GFP effectué sur des embryons *gcm-Gal4, repo-Gal80 ; UAS-GFP*.

IV. METHODES D'ETUDES *IN VIVO* CHEZ LA DROSOPHILE

IV.A. Le système UAS-Gal4

La Drosophile, de part son architecture simple et la disponibilité d'une approche génétique sophistiquée, est un modèle d'étude adapté à l'étude les processus biologiques *in vivo*. Le système UAS/Gal4 a été utilisé dans de nombreuses expériences **(Brand and Perrimon, 1993)**. Il permet d'induire l'expression d'un gène d'intérêt dans un territoire spécifique. Le système UAS/Gal4 est basé sur les propriétés du facteur de transcription Gal4 **(Laughon and Gesteland, 1984)** : Gal4 est un facteur transactivateur qui se fixe spécifiquement sur une séquence de 17 pb appelée UAS (Upstream Activating Sequence) (Giniger et al., 1985).

Dans le système UAS/Gal4, le gène d'intérêt est placé en aval de cinq séquences UAS et donc sous la dépendance du facteur Gal4. Pour obtenir une expression tissue-spécifique du gène d'intérêt, l'expression du facteur Gal4 est placée sous le contrôle d'une séquence appelée « driver » qui peut être le promoteur d'un gène ou un enhancer transcriptionnel. Dans l'exemple décrit ci-contre (**Fig. 57A**), une mouche transgénique mâle contient le facteur Gal4 sous la dépendance du driver neurogénique *sca*. Le croisement entre ce mâle et une femelle portant le transgène *UAS-GFP* conduit leur progéniture à exprimer la GFP dans le territoire neurogénique.

Un système plus élaboré permet de contrôler spatialement ou temporellement l'expression du facteur Gal4 par le facteur Gal80 **(Lee and Luo, 1999)** qui bloque l'activité d'activateur transcriptionnel du facteur Gal4 **(Ma and Ptashne, 1987)**. Dans l'exemple décrit ci-contre (**Fig. 57B**), l'expression de Gal4 est dirigée dans la glie et dans les hémocytes par le promoteur du gène *gcm*. Cependant, l'expression du facteur Gal80 sous la dépendance du promoteur du gène *repo* bloque l'activité de Gal4 dans les cellules gliales. L'expression du transgène *UAS-GFP* est donc induite uniquement dans les hémocytes.

IV.B. Les souches transgéniques utilisées

La souche w1118 a été utilisée comme contrôle. Le transgène *repo-nGFP* a été utilisé comme marqueur des cellules gliales. Il conduit l'expression de la GFP dans leur noyau **(Jones, 2005; Laneve et al., 2012)**. Le transgène *singed(hemo)-lacZ*, conduisant l'expression de la β-Gal spécifiquement dans les hémocytes, a été utilisé comme marqueur de ces cellules (gentiment fourni par le Dr. Serge PLAZA). Les souches portant les transgènes *repo(0.7kb)-GFP* et *repo(0.7kb)ΔTBSs-GFP* ont été générées au laboratoire par la technicienne Claude DELAPORTE selon les méthodes classiques de transgénèse. gcm^{rA87} **(Vincent et al., 1996)** et gcm^{34} **(Bernardoni et al., 1999)** ont été utilisés comme des allèles hypomorphes de *gcm*. Ils sont caractérisés par une insertion P-lacZ au niveau du site d'initiation de la transcription *gcm*. La souche *Df(2L)132* **(Kammerer and Giangrande, 2001)**, caractérisé par une délétion complète du locus de *gcm,* a été utilisée comme un allèle mutant nul de *gcm*. $repo^{52}$, $repo^{84}$ **(Halter et al., 1995; Xiong et al., 1994)**, twi^{1} **(Castanon et al., 2001)**, $elav^{4}$ et ttk^{1e11} ont aussi été utilisés comme des allèles mutants nuls pour leur gène respectifs (Bloomington stock Center).

srp(hemo)-Gal4 a été utilisé pour conduire l'expression du facteur *Gal4* dans les hémocytes **(Bruckner et al., 2004)** de même que *gcm-Gal4* **(Soustelle and Giangrande, 2007b)** combiné avec *repo-Gal80* (gentiment fourni par le Dr. B. Altenheim). *sca-Gal4* a été utilisé comme un driver neurogénique, (Bloomington stock Center), *twi-Gal4* comme un driver mésodermal **(Baylies and Bate, 1996)** a et *repo-Gal4* comme un driver glial **(Lee and Jones, 2005)**. *tubulin-Gal80ts* a été utilisé pour contrôler l'expression du facteur *Gal4* selon l'axe temporal et le système TARGET **(Lee and Luo, 1999)**.

Les transgènes de type UAS qui ont été utilisés sont les suivants : *UAS-mCD8GFP* (conduisant l'expression membranaire de la GFP); *UAS-GFP* (Bloomington Stock Center); *UAS-srpNC* **(Waltzer et al., 2002)**; *UAS-repo* **(Yuasa et al., 2003)**; *UAS-repoRNAi* (VDRC stock center : $repo^{GD4145}$); *UAS-twi* **(Baylies and Bate, 1996)**; *UAS-gcm(F18A)* (portant un seul transgène de type *UAS-gcm* = faible surexpression de *gcm*), *UAS-gcm(RS1)* (portant un seul transgène de type *UAS-gcm* = surexpression de *gcm* intermédiaire) and *UAS-gcm(M24A)* (portant deux transgènes de type *UAS-gcm* = forte surexpression de *gcm*) **(Bernardoni et al., 1998)**. La combinaison des transgènes *UAS-gcm(M24A)* et *UAS-gcm(F18A)* a été utilisée pour conduire la plus forte surexpression de *gcm*.

IV.C. Immunohistochimie

Les drosophiles sont mises en cage avec, pour milieu nutritif, de la levure et du jus de pomme. Les embryons sont récoltés après une nuit de ponte. Ils sont d'abord soumis à une déchorionisation par la Javel pendant 5 min à température ambiante. Les embryons sont ensuite soumis à une étape de fixation : dans un tube en verre ils sont incubés dans une solution biphasique contenant 2 mL de phase aqueuse (PBS, paraformaldéhyde 4 %) et 2 mL de phase organique (Heptane) et mis sous agitation vigoureuse pendant 25 min. Après élimination de la phase aqueuse, les embryons sont soumis à deux lavages au méthanol. Les étapes suivantes sont effectuées sous agitation douce. Les embryons sont perméabilisés pendant 15 min dans du PTX avant d'être incubé pendant 1 h dans la solution bloquante (PTX, NGS 5 %). Les embryons sont ensuite incubés avec la solution d'anticorps primaire sur la nuit à 4 °C sous agitation.

Les anticorps primaires utilisés sont dilués dans la solution bloquante de la manière suivante : anti-Ush de souris (1/1000) **(Cubadda et al., 1997)**, anti-Srp de lapin (1/1000) **(Hoshizaki et al., 1994; Sam et al., 1996)**, anti-Singed de souris (1/200) (DHSB), anti-P1 de souris (1/10) **(Kurucz et al., 2007b)**, anti-Crq de lapin (1/500) (fourni par J.L Dimarck and J. Hoffman), anti-Draper de lapin (1/500) **(Freeman et al., 2003)**, anti-SIMU de lapin (1/500) (gentiment fourni par le Dr. Logan), anti-Repo de souris (1/10) (DHSB) ou de cochon d'inde (1/1000) (fourni par B. Althenheim), anti-Nazgul de cochon d'inde (1/200) et anti-SP2637 de lapin (1/500) **(von Hilchen et al., 2010**), anti-Elav de rat (1/200 (DHSB), anti-HRP de lapin (1/500) (Cappel), anti-Fas2 de souris (1/100) (fourni par C. Goodman), anti-DIMMED de pain (1/750), anti-PHM de lapin (1/750) (ces deux derniers ont été gentiment fournis pas le Dr. P. Taghert), anti-GFP de poulet (1/1000) (Abcam), anti-β-Gal de souris (1/200) (Sigma), anti-CM1 de lapin (1/500, Abcam), anti-PH3 de lapin (1/500) (Cell Signaling).

Les embryons sont ensuite soumis à quatre lavages successifs de 10 min au PTX avant d'être incubés avec la solution d'anticorps secondaire pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps secondaires correspondants sont tous dilués à 1/500 dans la solution bloquante. Ils sont couplés à différents fluorophores absorbants à des longueurs d'ondes spécifiques : Cy3, Cy5 et FITC. Après deux lavages successifs de 15 min au PTX, les embryons sont incubés dans une solution contenant du DAPI pendant 10 min. Les embryons sont ensuite montés entre lame et lamelle dans du vectashield® avant d'être analysés au microscope.

IV.D. Microscopie

Le microscope confocal qui a été utilisé est le SP2 UV (Leica) avec le logiciel Leica Confocal Software. Ce microscope est équipé avec les lasers UV (315nm et 364 nm), argon (458 nm, 476 nm, 488 nm et 514 nm) ou hélium-néon (633) permettant d'exciter les différents fluorophores. Les images sont prises aux objectifs X40 et X63 (Leica), à une résolution de 1024 x 1024 pixels. Les animaux sont scannés sur une épaisseur pouvant atteindre 40 µm avec un intervalle de 0.5 µm entre chaque section. Chaque acquisition est moyennée trois fois. Les données sont traitées à l'aide des logiciels Image J, Adobe Photoshop et Adobe Illustrator.

Les images sont prises à l'aide du microscope à épifluorescence Zeiss fonctionnant avec une lampe halogène. Il est équipé d'une caméra CoolSnap couleur et du logiciel de prise d'image CoolSnap™ de Roper.

IV.E. Statistiques

Toutes les expériences ont été effectuées dans au moins trois réplicas biologiques. n : nombre de réplicas. La pertinence statistique a été attribuée en calculant les moyennes et les erreurs standards et analysée en utilisant le test T de Student . * = $p > 0.05$; ** = $p > 0.01$; *** = $p > 0.005$).

Discussion Générale

Un des grands défis de la biologie du développement est de comprendre comment la diversité cellulaire est engendrée. Durant le processus de différenciation, la cellule acquiert une identité spécifique grâce à des facteurs de transcription qui déclenchent, consolident puis maintiennent le nouveau destin de la cellule. Du fait de son architecture simple et la disponibilité d'une approche génétique solide, la drosophile constitue un model de choix pour étudier ces processus à une résolution cellulaire.

Dans de nombreux cas, des gènes maîtres sont nécessaires et suffisants pour déclencher le processus complexe de la différenciation. L'un des plus connu est le déterminant musculaire MyoD dont l'expression ectopique dans de nombreuses lignées cellulaires est suffisante pour induire la formation de myotubes **(Davis et al., 1987; Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1989)**. Bien que de nombreux gènes maîtres aient été identifiés à ce jour, il apparaît que la plupart d'entre eux peuvent agir de manière différente dans plusieurs tissus. Ainsi, les facteurs de type GATA peuvent réguler le développement des cellules hématopoïétiques, neurales, cardiaques ou encore des tissus reproductifs **(Cantor and Orkin, 2005; Chlon and Crispino, 2012; Zaytouni et al., 2011)**. Dans ces cas, la spécificité du processus de différenciation repose sur d'autres mécanismes qui restent mal compris.

Durant ma thèse, j'ai ciblé l'étude d'un de ces facteurs maître, le déterminant glial Gcm. Gcm appartient à une famille atypique de facteurs de transcription à doigt de Zinc conservée dans l'évolution **(Akiyama et al., 1996; Correa et al., 2002; Hitoshi et al., 2011; Kanemura et al., 1999; Soustelle et al., 2007)**. Initialement connu pour constituer le facteur maître de la gliogénèse en agissant comme un interrupteur moléculaire entre neurone et glie **(Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996)**, il est très vite apparu que Gcm est également nécessaire dans d'autres processus de différenciation. Gcm est ainsi requis pour le développement des hémocytes embryonnaires **(Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997)**, des cellules de tendons **(Soustelle et al., 2004)** et aussi de certains neurones **(Chotard et al., 2005; Yoshida et al., 2005)**. J'ai moi-même mis en évidence un nouveau rôle de Gcm dans les cellules péritrachéales, cellules impliquées dans le processus de mue chez la drosophile **(Laneve et al., 2012)**. La biologie de ce facteur de transcription semble donc bien plus complexe que ce qui avait été initialement décrit. Il serait d'ailleurs intéressant d'identifier de nouveaux territoires d'expression de Gcm. Pour cela, nous pourrions utiliser une nouvelle approche par «G-trace», technique

permettant aussi de visualiser les lignages ayant exprimé transitoirement un gène **(Evans et al., 2009)**.

Pour étudier comment parvenir à la spécificité cellulaire lorsqu'un gène maître est partagé entre plusieurs territoires, nous avons ciblé l'étude du choix entre le destin glial et le destin hémocytaire de la cellule. Il est connu que le choix de la voie de différenciation peut reposer sur le niveau d'expression d'un facteur de transcription et l'existence de seuils. Ainsi, pendant la gastrulation, un gradient de la protéine Dorsal est établit ce qui divise l'embryon en trois domaines principaux le long de l'axe D/V : le mésoderme, l'ectoderme neurogénique et l'ectoderme non neurogénique **(Bier, 1997)**. Après la gastrulation, l'expression différentielle de Twi à travers le mésoderme permet l'émergence des muscles, du corps gras ou des hémocytes **(Baylies and Bate, 1996)**. La spécificité du processus de différenciation peut également reposer sur une combinaison de plusieurs familles de facteurs de transcription agissant en synergie, l'environnement de la cellule apportant ainsi des informations positionnelles qui contribuent à la spécificité **(Berger et al., 2005a; Berger et al., 2007; Furlong, 2004; Prokop and Technau, 1994)**. Par exemple, l'expression du gène maître de l'hématopoïèse *srp* est restreinte au mésoderme procéphalique par l'action simultanée des gènes *snail*, *buttonhead*, *empty spiracles* et *even-skipped* **(Spahn et al., 2014)**. Mes travaux ont mis en évidence que, dans le mésoderme pro-céphalique, l'absence de gliogénèse dépend à la fois de l'environnement mésodermal mais aussi d'un contrôle précis du niveau d'expression de Gcm. La spécificité du processus de différenciation ne semble donc dépendre d'une combinaison de différents mécanismes agissant en synergie.

Au vu de l'aspect transitoire de nombreux gènes maîtres, les gènes agissant en aval constituent des candidats de choix pour la consolidation et le maintient de l'identité cellulaire, cependant, leurs rôles dans les étapes précoces des processus de spécification restent peu étudiés. De manière très intéressante, j'ai mis en évidence que *repo*, une cible directe de Gcm dans la glie **(Akiyama et al., 1996; Johnson et al., 2012; Jones, 2005)**, est nécessaire pour réprimer à la fois le potentiel neuronal de la NSC et le potentiel hématopoïétique de Gcm. Les gènes agissant en aval d'un gène maître ne se limitent donc pas à promouvoir la différenciation tardive d'une cellule mais jouent également un rôle central dans la détermination précoce de l'identité cellulaire. Le mode d'action précis de *repo* reste toutefois mal compris. Mes résultats préliminaires suggèrent un mode d'action indirect. Pour confirmer cela et pour rechercher le

mode d'action précis de Repo, nous travaillons actuellement sur des expériences de Chip-seq visant à identifier les cibles directes de facteur de transcription à l'échelle du génome.

Néanmoins, mes résultats apportent un point de vue novateur sur le rôle clé des gènes agissant en aval d'un gène maître. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires gouvernant la spécification cellulaire, il est désormais déterminant d'élargir ce nouveau concept à d'autres processus de spécification. Durant le développement embryonnaire de la drosophile, le facteur GATA Srp joue un rôle instructif dans le développement du corps gras, de la glande lymphatique et des hémocytes (**Mandal et al., 2004; Rehorn et al., 1996; Reuter, 1994; Sam et al., 1996**). D'autres facteurs, agissant en aval de Srp, pourraient aussi jouer un rôle dans la spécificité de ces processus de différenciation. Gcm, qui est exprimé dans l'ensemble des hémocytes durant les premiers stades de l'hématopoïèse (**Bataille et al., 2005**), pourrait remplir une telle fonction. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si la perte des gènes *gcm1* et *gcm2* provoque l'induction dans le mésoderme procéphalique des marqueurs du corps gras comme l'Alcool déshydrogénase ou des marqueurs de la glande lymphatique comme le facteur de transcription Collier (**Crozatier et al., 2004; Hoshizaki et al., 1994**). Enfin, cette stratégie impliquant les gènes en aval d'un gène maître pourrait constituer un mécanisme conservé dans l'évolution. Il serait intéressant de déterminer si ce concept peut être retrouvé chez les vertébrés ou d'autres organismes.

De nombreuses études montrent que les propriétés des facteurs de transcription peuvent aussi dépendre de cofacteurs. Par exemple, durant l'hématopoïèse chez les vertébrés, le facteur de transcription de type GATA1 nécessite d'interagir avec son cofacteur FOG-1 pour occuper certains sites sur la chromatine (**Cantor and Orkin, 2005**). De manière différente, l'autorégulation de Gcm dans le NGB1-1A dépend de l'interaction de Gcm avec son cofacteur Hkb (**De Iaco et al., 2006**). Les cibles directes de Gcm étant différentes entre les cellules gliales et les hémocytes, il serait intéressant d'étudier si cette spécificité dépend de cofacteurs. Certains partenaires putatifs de Gcm avaient été identifiés *in vitro* par un crible double-hybride (**Jacques et al., 2009**). Désormais, la disponibilité des animaux transgéniques *gcm-FLAG*^{BAC} permet l'identification des cofacteurs de Gcm *in vivo* par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse.

D'un autre côté, il a déjà été démontré que des facteurs de transcription peuvent directement activer l'expression de leur cofacteur. Ainsi, Srp est absolument nécessaire pour activer l'expression de Ush dans les précurseurs des plasmatocytes **(Muratoglu et al., 2006)** avant que le dimère Srp/Ush ne réprime la spécification des cellules à cristaux **(Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2010)**. De plus, nous savons que Gcm peut interagir directement avec sa cible Repo **(Fici et al, accepté dans Nature communication)** et que Repo est nécessaire pour réprimer la spécification du destin hémocytaire durant la gliogénèse. Repo constitue donc un excellent candidat pour constituer un tel cofacteur. En tronquant différents domaines de la protéine Repo, nous pourrions commencer par déterminer lequel est responsable de son interaction avec Gcm. Ensuite, la séquence codante de la protéine Repo, tronquée du domaine d'interaction avec Gcm, pourraient être placée sous le contrôle de son propre promoteur **(Lee and Jones, 2005)** et les souches transgéniques correspondantes pourraient être générées. Si l'interaction entre Repo et Gcm permet de réprimer les marqueurs hémocytaires dans la glie, nous attendons que la protéine Repo tronquée du domaine d'interaction avec Gcm ne soit pas capable de sauver la spécification du destin hémocytaire observée dans les embryons mutants pour le gène *repo*.

Les cellules gliales de la drosophile et des vertébrés partagent de nombreuses fonctions. Elles contrôlent l'homéostasie des neurones, recyclent les neurotransmetteurs ou encore isolent électriquement les axones **(Freeman and Doherty, 2006)**. Cependant, le programme transcriptionnel contrôlant les premières étapes de la gliogénèse n'est pas conservé dans l'évolution. Chez la drosophile, Gcm est un gène maître qui agit comme un interrupteur moléculaire entre neurones et cellules gliales. Bien que les orthologues de Gcm semblent conserver un potentiel gliogénique **(Buzanska et al., 2001; Iwasaki et al., 2003; Kim et al., 1998; Reifegerste et al., 1999; Soustelle et al., 2007)**, aucun interrupteur de ce type n'a pu être mis en évidence chez les vertébrés **(Hitoshi et al., 2011)**. De plus, les cellules gliales des vertébrés ne partagent pas de facteurs de transcription pan-gliaux comme Repo et Ttk69 **(Wakamatsu, 2004)**. Le lien évolutif des cellules gliales de la drosophile et des vertébrés reste donc incertain.

A l'opposé, les bases moléculaires de l'hématopoïèse ont été remarquablement bien conservées au cours de l'évolution et impliquent les mêmes familles de facteurs de transcription, GATA, FOG et RUNX **(Lebestky et al., 2000)**. Ces observations suscitent l'hypothèse d'un rôle

des orthologues de Gcm dans l'hématopoïèse. Il serait aussi intéressant de déterminer si les orthologues de Gcm conservent un potentiel hématopoïétique. Pour cela, l'induction de marqueurs hémocytaires pourrait être suivie dans des cellules HeLa co-transfectées par des vecteurs d'expression de GCM1 ou GCM2.

Il serait aussi intéressant de tracer le profil d'expression des orthologues de Gcm dans les hémocytes et les organes hématopoïétiques de la souris et de l'homme. L'étude de la microglie serait particulièrement intéressante car ces cellules, bien qu'issues d'un lignage hématopoïétique, partagent de nombreuses fonctions avec les cellules gliales de la drosophile. En effet, en plus d'effectuer de nombreux rôles pour supporter les fonctions neuronales, la microglie assure majoritairement la réponse immunitaire du CNS des vertébrés **(Kim and de Vellis, 2005)**. De plus, la microglie est impliquée dans l'initiation et la progression de nombreuses maladies neurodégénératives comme Alzheimer, Parkinson ou la sclérose en plaques **(Gentleman, 2013; Goldmann and Prinz, 2013; Siskova and Tremblay, 2013)** et la drosophile constitue un modèle de choix pour étudier de telles maladies **(Leyssen and Hassan, 2007)**.

REFERENCES

Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I., and Steller, H. (1993). Programmed cell death during Drosophila embryogenesis. Development *117*, 29-43.

Abrescia, C., Sjostrand, D., Kjaer, S., and Ibanez, C.F. (2005). Drosophila RET contains an active tyrosine kinase and elicits neurotrophic activities in mammalian cells. FEBS letters *579*, 3789-3796.

Adams, J.C. (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. Current opinion in cell biology *16*, 590-596.

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

Akam, M. (1989). Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. Cell *57*, 347-349.

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. Development genes and evolution *208*, 578-585.

Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T., and Hotta, Y. (1999). Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in Drosophila. Development *126*, 1967-1974.

Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S., and Oda, H. (2000). Mechanism of glia-neuron cell-fate switch in the Drosophila thoracic neuroblast 6-4 lineage. Development *127*, 3513-3522.

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*, 14912-14916.

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

Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., and Patel, N.K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. Pharmacology & therapeutics *138*, 155-175.

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*, 545-560.

Altshuller, 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 letters *393*, 201-204.

Arbouzova, N.I., and Zeidler, M.P. (2006). JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development *133*, 2605-2616.

Auld, V.J., Fetter, R.D., Broadie, K., and Goodman, C.S. (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in Drosophila. Cell *81*, 757-767.

Awasaki, T., and Ito, K. (2004). Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during Drosophila metamorphosis. Curr Biol *14*, 668-677.

Awasaki, T., Tatsumi, R., Takahashi, K., Arai, K., Nakanishi, Y., Ueda, R., and Ito, K. (2006). Essential role of the apoptotic cell engulfment genes draper and ced-6 in programmed axon pruning during Drosophila metamorphosis. Neuron *50*, 855-867.

Badenhorst, P. (2001). Tramtrack controls glial number and identity in the Drosophila embryonic CNS. Development *128*, 4093-4101.

Bailey, A.M., and Posakony, J.W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. Genes Dev *9*, 2609-2622.

Banerjee, S., Sousa, A.D., and Bhat, M.A. (2006). Organization and function of septate junctions: an evolutionary perspective. Cell biochemistry and biophysics *46*, 65-77.

Barolo, S., Castro, B., and Posakony, J.W. (2004). New Drosophila transgenic reporters: insulated P-element vectors expressing fast-maturing RFP. BioTechniques *36*, 436-440, 442.

Barres, B.A., and Raff, M.C. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. Neuron *12*, 935-942.

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*, 303-311.
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*, 4635-4644.
Baumgartner, S., Littleton, J.T., Broadie, K., Bhat, M.A., Harbecke, R., Lengyel, J.A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A., and Bellen, H.J. (1996). A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. Cell *87*, 1059-1068.
Baylies, M.K., and Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in Drosophila. Science *272*, 1481-1484.
Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997). Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. Glia *20*, 145-154.
Beckervordersandforth, R.M., Rickert, C., Altenhein, B., and Technau, G.M. (2008). Subtypes of glial cells in the Drosophila embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. Mech Dev *125*, 542-557.
Bellen, H.J., Lu, Y., Beckstead, R., and Bhat, M.A. (1998). Neurexin IV, caspr and paranodin--novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. Trends Neurosci *21*, 444-449.
Bello, B.C., Izergina, N., Caussinus, E., and Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in Drosophila brain development. Neural development *3*, 5.
Berger, C., Pallavi, S.K., Prasad, M., Shashidhara, L.S., and Technau, G.M. (2005a). A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of Drosophila melanogaster. Nat Cell Biol *7*, 56-62.
Berger, C., Pallavi, S.K., Prasad, M., Shashidhara, L.S., and Technau, G.M. (2005b). Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system. Cell cycle *4*, 422-425.
Berger, C., Renner, S., Luer, K., and Technau, G.M. (2007). The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the Drosophila embryonic CNS. Dev Dyn *236*, 3562-3568.
Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J.L., and Giangrande, A. (1999). Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. Dev Biol *216*, 265-275.
Bernardoni, R., Miller, A.A., and Giangrande, A. (1998). Glial differentiation does not require a neural ground state. Development *125*, 3189-3200.
Bernardoni, R., Vivancos, V., and Giangrande, A. (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. Dev Biol *191*, 118-130.
Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. Nat Rev Neurosci *3*, 517-530.
Besson, M.T., Soustelle, L., and Birman, S. (1999). Identification and structural characterization of two genes encoding glutamate transporter homologues differently expressed in the nervous system of Drosophila melanogaster. FEBS letters *443*, 97-104.
Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. Cell *124*, 1241-1253.
Bier, E. (1997). Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction. Cell *89*, 681-684.
Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1992). deadpan, an essential pan-neural gene in Drosophila, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. Genes Dev *6*, 2137-2151.
Boone, J.Q., and Doe, C.Q. (2008). Identification of Drosophila type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. Developmental neurobiology *68*, 1185-1195.

Booth, G.E., Kinrade, E.F., and Hidalgo, A. (2000). Glia maintain follower neuron survival during Drosophila CNS development. Development *127*, 237-244.
Bossing, T., and Technau, G.M. (1994). The fate of the CNS midline progenitors in Drosophila as revealed by a new method for single cell labelling. Development *120*, 1895-1906.
Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q., and Technau, G.M. (1996). 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.
Boulanger, A., and Dura, J.M. (2014). Nuclear receptors and Drosophila neuronal remodeling. Biochimica et biophysica acta.
Boulanger, A., Farge, M., Ramanoudjame, C., Wharton, K., and Dura, J.M. (2012). Drosophila motor neuron retraction during metamorphosis is mediated by inputs from TGF-beta/BMP signaling and orphan nuclear receptors. PloS one *7*, e40255.
Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G., and Knoblich, J.A. (2008). The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in Drosophila. Dev Cell *14*, 535-546.
Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development *118*, 401-415.
Brand, M., Jarman, A.P., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). asense is a Drosophila neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. Development *119*, 1-17.
Britton, J.S., and Edgar, B.A. (1998). Environmental control of the cell cycle in Drosophila: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. Development *125*, 2149-2158.
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.
Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. J Clin Invest *109*, 1139-1142.
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.
Buszczak, M., and Segraves, W.A. (1998). Drosophila metamorphosis: the only way is USP? Curr Biol *8*, R879-882.
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. Journal of neuroscience research *65*, 17-23.
Cabrera, C.V. (1990). Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in Drosophila: the interactions between scute, Notch and Delta. Development *110*, 733-742.
Cabrera, C.V., Martinez-Arias, A., and Bate, M. (1987). The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in Drosophila. Cell *50*, 425-433.
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*, 2957-2966.
Campos-Ortega, J.A. (1993). Mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. Journal of neurobiology *24*, 1305-1327.
Campos-Ortega, J.A. (1995). Genetic mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. Molecular neurobiology *10*, 75-89.
Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1985). The Embryonic development of Drosophila melanogaster.
Campos, A.R., Fischbach, K.F., and Steller, H. (1992). Survival of photoreceptor neurons in the compound eye of Drosophila depends on connections with the optic ganglia. Development *114*, 355-366.

Cant, K., Knowles, B.A., Mooseker, M.S., and Cooley, L. (1994). Drosophila singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. J Cell Biol *125*, 369-380.
Cantera, R., and Technau, G.M. (1996). Glial cells phagocytose neuronal debris during the metamorphosis of the central nervous system in Drosophila melanogaster. Development genes and evolution *206*, 277-280.
Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. Seminars in cell & developmental biology *16*, 117-128.
Carton, Y., and Nappi, A.J. (1997). Drosophila cellular immunity against parasitoids. Parasitology today *13*, 218-227.
Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., and Baylies, M.K. (2001). Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during Drosophila mesoderm development. Development *128*, 3145-3159.
Castellanos, E., Dominguez, P., and Gonzalez, C. (2008). Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. Curr Biol *18*, 1209-1214.
Caussinus, E., and Gonzalez, C. (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in Drosophila melanogaster. Nature genetics *37*, 1125-1129.
Chell, J.M., and Brand, A.H. (2010). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. Cell *143*, 1161-1173.
Chlon, T.M., and Crispino, J.D. (2012). Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. Development *139*, 3905-3916.
Cho, N.K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., and Krasnow, M.A. (2002). Developmental control of blood cell migration by the Drosophila VEGF pathway. Cell *108*, 865-876.
Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., and Brand, A.H. (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in Drosophila neural stem cells. Dev Cell *11*, 775-789.
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*, 237-251.
Chung, W.S., and Barres, B.A. (2009). Selective remodeling: refining neural connectivity at the neuromuscular junction. PLoS Biol *7*, e1000185.
Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1998). New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 5891-5898.
Coffman, J.A. (2003). Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. Cell biology international *27*, 315-324.
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*, 1835-1845.
Correa, P., Akerstrom, G., and Westin, G. (2002). Underexpression of Gcm2, a master regulatory gene of parathyroid gland development, in adenomas of primary hyperparathyroidism. Clinical endocrinology *57*, 501-505.
Cripps, R.M., Black, B.L., Zhao, B., Lien, C.L., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1998). The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during Drosophila myogenesis. Genes Dev *12*, 422-434.
Crozatier, M., Krzemien, J., and Vincent, A. (2007). The hematopoietic niche: a Drosophila model, at last. Cell cycle *6*, 1443-1444.
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.

Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R.P., Bourouis, M., Ramain, P., Gelbart, W., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). u-shaped encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes achaete and scute during the formation of bristles in Drosophila. Genes Dev *11*, 3083-3095.
Cubas, P., de Celis, J.F., Campuzano, S., and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the Drosophila imaginal wing disc. Genes Dev *5*, 996-1008.
Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. Prog Neurobiol *65*, 1-105.
Datta, S. (1995). Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the Drosophila central nervous system. Development *121*, 1173-1182.
Davies, A.M. (1998). Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. Curr Biol *8*, R15-18.
Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987-981000.
De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C., and Giangrande, A. (2006). Huckebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. EMBO J *25*, 244-254.
Dearolf, C.R. (1998). Fruit fly "leukemia". Biochimica et biophysica acta *1377*, M13-23.
DeSalvo, M.K., Mayer, N., Mayer, F., and Bainton, R.J. (2011). Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of Drosophila. Glia *59*, 1322-1340.
Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. Science *298*, 1959-1964.
Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the Drosophila central nervous system. Development *116*, 855-863.
Doherty, J., Logan, M.A., Tasdemir, O.E., and Freeman, M.R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult Drosophila brain. J Neurosci *29*, 4768-4781.
Doliana, R., Bot, S., Mungiguerra, G., Canton, A., Cilli, S.P., and Colombatti, A. (2001). Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. J Biol Chem *276*, 12003-12011.
Dumstrei, K., Wang, F., and Hartenstein, V. (2003). Role of DE-cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis, and axon tract formation in Drosophila larval brain development. J Neurosci *23*, 3325-3335.
Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis. Curr Biol *12*, 1923-1927.
Echalier, G., and Ohanessian, A. (1969). [Isolation, in tissue culture, of Drosophila melangaster cell lines]. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles *268*, 1771-1773.
Edwards, J.S., Swales, L.S., and Bate, M. (1993). The differentiation between neuroglia and connective tissue sheath in insect ganglia revisited: the neural lamella and perineurial sheath cells are absent in a mesodermless mutant of Drosophila. The Journal of comparative neurology *333*, 301-308.
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*, 3295-3309.
Ekas, L.A., Cardozo, T.J., Flaherty, M.S., McMillan, E.A., Gonsalves, F.C., and Bach, E.A. (2010). Characterization of a dominant-active STAT that promotes tumorigenesis in Drosophila. Dev Biol *344*, 621-636.
Erturk-Hasdemir, D., and Silverman, N. (2005). Eater: a big bite into phagocytosis. Cell *123*, 190-192.
Evans, C.J., and Banerjee, U. (2003). Transcriptional regulation of hematopoiesis in Drosophila. Blood cells, molecules & diseases *30*, 223-228.
Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in Drosophila and vertebrate hematopoiesis. Dev Cell *5*, 673-690.

Evans, C.J., Olson, J.M., Ngo, K.T., Kim, E., Lee, N.E., Kuoy, E., Patananan, A.N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.T., *et al.* (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in Drosophila. Nature methods *6*, 603-605.
Evans, I.R., and Wood, W. (2011). Understanding in vivo blood cell migration--Drosophila hemocytes lead the way. Fly (Austin) *5*, 110-114.
Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends in immunology *28*, 138-145.
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*, 726-734.
Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2007). The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nature reviews. Immunology *7*, 862-874.
Fessler, L.I., Nelson, R.E., and Fessler, J.H. (1994). Drosophila extracellular matrix. Methods in enzymology *245*, 271-294.
Fichelson, P., and Gho, M. (2003). The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of Drosophila. Development *130*, 123-133.
Fischbach, K.F., and Hiesinger, P.R. (2008). Optic lobe development. Advances in experimental medicine and biology *628*, 115-136.
Flici, H., Erkosar, B., Komonyi, O., Karatas, O.F., Laneve, P., and Giangrande, A. (2011). Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia. Development *138*, 4167-4178.
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). Tiggrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins. Development *120*, 1747-1758.
Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S.H., and Schulz, R.A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during Drosophila hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 11451-11456.
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*, 7348-7353.
Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity *4*, 431-443.
Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. Science *284*, 1991-1994.
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*, 567-580.
Freeman, M.R., and Doe, C.Q. (2001). Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the Drosophila CNS. Development *128*, 4103-4112.
Freeman, M.R., and Doherty, J. (2006). Glial cell biology in Drosophila and vertebrates. Trends Neurosci *29*, 82-90.
Fuentes-Medel, Y., Logan, M.A., Ashley, J., Ataman, B., Budnik, V., and Freeman, M.R. (2009). Glia and muscle sculpt neuromuscular arbors by engulfing destabilized synaptic boutons and shed presynaptic debris. PLoS Biol *7*.
Fuerstenberg, S., Broadus, J., and Doe, C.Q. (1998). Asymmetry and cell fate in the Drosophila embryonic CNS. Int J Dev Biol *42*, 379-383.
Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 12355-12358.

Furlong, E.E. (2004). Integrating transcriptional and signalling networks during muscle development. Current opinion in genetics & development *14*, 343-350.
Gentleman, S.M. (2013). Review: microglia in protein aggregation disorders: friend or foe? Neuropathology and applied neurobiology *39*, 45-50.
Ghysen, A., and Dambly-Chaudiere, C. (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. Genes Dev *2*, 495-501.
Giangrande, A. (1995). Proneural genes influence gliogenesis in Drosophila. Development *121*, 429-438.
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*, 2307-2316.
Giniger, E., Varnum, S.M., and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell *40*, 767-774.
Goldmann, T., and Prinz, M. (2013). Role of microglia in CNS autoimmunity. Clinical & developmental immunology *2013*, 208093.
Gonzalez, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., and Campuzano, S. (1989). Molecular analysis of the asense gene, a member of the achaete-scute complex of Drosophila melanogaster, and its novel role in optic lobe development. EMBO J *8*, 3553-3562.
Granderath, S., Bunse, I., and Klambt, C. (2000). gcm and pointed synergistically control glial transcription of the Drosophila gene loco. Mech Dev *91*, 197-208.
Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C.S., O'Kane, C.J., and Klambt, C. (1999). loco encodes an RGS protein required for Drosophila glial differentiation. Development *126*, 1781-1791.
Grosskortenhaus, R., Robinson, K.J., and Doe, C.Q. (2006). Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage. Genes Dev *20*, 2618-2627.
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.
Hakim, Y., Yaniv, S.P., and Schuldiner, O. (2014). Astrocytes play a key role in Drosophila mushroom body axon pruning. PloS one *9*, e86178.
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*, 317-332.
Han, Z., and Olson, E.N. (2005). Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during Drosophila cardiogenesis and hematopoiesis. Development *132*, 3525-3536.
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*, 1235-1247.
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*, 2857-2865.
Hartenstein, V. (1995). Atlas of Drosophila development (Cold Spring Harbor, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
Hartenstein, V., Tepass, U., and Gruszynski-Defeo, E. (1994). Embryonic development of the stomatogastric nervous system in Drosophila. The Journal of comparative neurology *350*, 367-381.
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*, 175-178.
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. Journal of molecular biology *336*, 441-451.
Hashemolhosseini, S., and Wegner, M. (2004). Impacts of a new transcription factor family: mammalian GCM proteins in health and disease. J Cell Biol *166*, 765-768.

Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. Development *122*, 161-171.
Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. Cell *64*, 1083-1092.
Hidalgo, A., and Booth, G.E. (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the Drosophila embryonic CNS. Development *127*, 393-402.
Hidalgo, A., Kato, K., Sutcliffe, B., McIlroy, G., Bishop, S., and Alahmed, S. (2011). Trophic neuron-glia interactions and cell number adjustments in the fruit fly. Glia *59*, 1296-1303.
Hitoshi, S., Ishino, Y., Kumar, A., Jasmine, S., Tanaka, K.F., Kondo, T., Kato, S., Hosoya, T., Hotta, Y., and Ikenaka, K. (2011). Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active DNA demethylation and induce neural stem cells. Nat Neurosci *14*, 957-964.
Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in Drosophila. Development *130*, 4955-4962.
Hoopfer, E.D., McLaughlin, T., Watts, R.J., Schuldiner, O., O'Leary, D.D., and Luo, L. (2006). Wlds protection distinguishes axon degeneration following injury from naturally occurring developmental pruning. Neuron *50*, 883-895.
Hoshizaki, D.K., Blackburn, T., Price, C., Ghosh, M., Miles, K., Ragucci, M., and Sweis, R. (1994). Embryonic fat-cell lineage in Drosophila melanogaster. Development *120*, 2489-2499.
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*, 1025-1036.
Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J.B., Nabeshima, Y., Doe, C.Q., and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during Drosophila asymmetric divisions. Nature *390*, 625-629.
Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cellular microbiology *7*, 335-350.
Ito, K., and Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of Drosophila melanogaster. Dev Biol *149*, 134-148.
Ito, K., Urban, J., and Technau, G. (1995). Distribution, classification, and development ofDrosophila glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. Roux's Arch Dev Biol *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*, 6027-6035.
Jacobs, J.R. (2000). The midline glia of Drosophila: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. Prog Neurobiol *62*, 475-508.
Jacques, C., Soustelle, L., Nagy, I., Diebold, C., and Giangrande, A. (2009). A novel role of the glial fate determinant glial cells missing in hematopoiesis. Int J Dev Biol *53*, 1013-1022.
Johnson, R.W., Wood, J.L., and Jones, B.W. (2012). Characterization of cis-regulatory elements controlling repo transcription in Drosophila melanogaster. Gene *492*, 167-176.
Jones, B.W. (2005). Transcriptional control of glial cell development in Drosophila. Dev Biol *278*, 265-273.
Jones, B.W., Abeysekera, M., Galinska, J., and Jolicoeur, E.M. (2004). Transcriptional control of glial and blood cell development in Drosophila: cis-regulatory elements of glial cells missing. Dev Biol *266*, 374-387.
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*, 1013-1023.
Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. Development *132*, 2521-2533.

Kammerer, M., and Giangrande, A. (2001). Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. EMBO J *20*, 4664-4673.
Kanai, M.I., Okabe, M., and Hiromi, Y. (2005). seven-up Controls switching of transcription factors that specify temporal identities of Drosophila neuroblasts. Dev Cell *8*, 203-213.
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 letters *442*, 151-156.
Kato, K., Awasaki, T., and Ito, K. (2009). Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult Drosophila brain. Development *136*, 51-59.
Kato, K., Forero, M.G., Fenton, J.C., and Hidalgo, A. (2011). The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by pros-notch and pros-NFκB feedback. PLoS Biol *9*.
Kato, K., and Hidalgo, A. (2013). An injury paradigm to investigate central nervous system repair in Drosophila. Journal of visualized experiments : JoVE.
Kerr, K.S., Fuentes-Medel, Y., Brewer, C., Barria, R., Ashley, J., Abruzzi, K.C., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O.E., Freeman, M.R., and Budnik, V. (2014). Glial wingless/Wnt regulates glutamate receptor clustering and synaptic physiology at the Drosophila neuromuscular junction. J Neurosci *34*, 2910-2920.
Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998a). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. Cell *92*, 205-215.
Kidd, T., Russell, C., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998b). Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. Neuron *20*, 25-33.
Kiefer, J.C., Jarman, A., and Johnson, J. (2005). Pro-neural factors and neurogenesis. Dev Dyn *234*, 808-813.
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*, 12364-12369.
Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. Journal of neuroscience research *81*, 302-313.
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*, 149-160.
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*, 163-176.
Klambt, C., and Goodman, C.S. (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. Glia *4*, 205-213.
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 letters *579*, 3991-3998.
Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M.*, et al.* (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila. Cell *123*, 335-346.
Kraut, R., and Campos-Ortega, J.A. (1996). inscuteable, a neural precursor gene of Drosophila, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. Dev Biol *174*, 65-81.
Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in Drosophila. Nature *383*, 50-55.
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*, 325-328.

Kunisch, M., Haenlin, M., and Campos-Ortega, J.A. (1994). Lateral inhibition mediated by the Drosophila neurogenic gene delta is enhanced by proneural proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 10139-10143.
Kurant, E. (2011). Keeping the CNS clear: glial phagocytic functions in Drosophila. Glia *59*, 1304-1311.
Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D., and Gaul, U. (2008). Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. Cell *133*, 498-509.
Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N., and Adams, J.C. (2002). Fascins, and their roles in cell structure and function. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology *24*, 350-361.
Kurucz, E., Markus, R., Zsamboki, J., Folkl-Medzihradszky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E.*, et al.* (2007a). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes. Curr Biol *17*, 649-654.
Kurucz, E., Vaczi, B., Markus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsamboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., and Ando, I. (2007b). Definition of Drosophila hemocyte subsets by cell-type specific antigens. Acta biologica Hungarica *58 Suppl*, 95-111.
Landgraf, M., and Thor, S. (2006). Development of Drosophila motoneurons: specification and morphology. Seminars in cell & developmental biology *17*, 3-11.
Lanet, E., Gould, A.P., and Maurange, C. (2013). Protection of neuronal diversity at the expense of neuronal numbers during nutrient restriction in the Drosophila visual system. Cell reports *3*, 587-594.
Laneve, P., Delaporte, C., Trebuchet, G., Komonyi, O., Flici, H., Popkova, A., D'Agostino, G., Taglini, F., Kerekes, I., and Giangrande, A. (2012). The Gcm/Glide molecular and cellular pathway: new actors and new lineages. Dev Biol *375*, 65-78.
Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. Dev Biol *230*, 243-257.
Laughon, A., and Gesteland, R.F. (1984). Primary structure of the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene. Mol Cell Biol *4*, 260-267.
Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. Science *288*, 146-149.
Lebestky, T., Jung, S.H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. Genes Dev *17*, 348-353.
Leclerc, V., and Reichhart, J.M. (2004). The immune response of Drosophila melanogaster. Immunological reviews *198*, 59-71.
Lee, B.P., and Jones, B.W. (2005). Transcriptional regulation of the Drosophila glial gene repo. Mech Dev *122*, 849-862.
Lee, C.Y., Wilkinson, B.D., Siegrist, S.E., Wharton, R.P., and Doe, C.Q. (2006). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. Dev Cell *10*, 441-449.
Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron *22*, 451-461.
Lee, T., Marticke, S., Sung, C., Robinow, S., and Luo, L. (2000). Cell-autonomous requirement of the USP/EcR-B ecdysone receptor for mushroom body neuronal remodeling in Drosophila. Neuron *28*, 807-818.
Leiserson, W.M., Harkins, E.W., and Keshishian, H. (2000). Fray, a Drosophila serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. Neuron *28*, 793-806.
Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of Drosophila melanogaster. Annual review of immunology *25*, 697-743.
Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973-983.

Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. Science *237*, 1154-1162.
Leyssen, M., and Hassan, B.A. (2007). A fruitfly's guide to keeping the brain wired. EMBO reports *8*, 46-50.
Li, L., and Vaessin, H. (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis. Genes Dev *14*, 147-151.
Liew, C.K., Simpson, R.J., Kwan, A.H., Crofts, L.A., Loughlin, F.E., Matthews, J.M., Crossley, M., and Mackay, J.P. (2005). Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 583-588.
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*, 6330-6337.
Lindstrom, R., Lindholm, P., Kallijarvi, J., Yu, L.Y., Piepponen, T.P., Arumae, U., Saarma, M., and Heino, T.I. (2013). Characterization of the structural and functional determinants of MANF/CDNF in Drosophila in vivo model. PloS one *8*, e73928.
Liu, P., Tarle, S.A., Hajra, A., Claxton, D.F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M.J., and Collins, F.S. (1993). Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. Science *261*, 1041-1044.
Liu, Y.H., Jakobsen, J.S., Valentin, G., Amarantos, I., Gilmour, D.T., and Furlong, E.E. (2009). A systematic analysis of Tinman function reveals Eya and JAK-STAT signaling as essential regulators of muscle development. Dev Cell *16*, 280-291.
Logan, M.A., and Freeman, M.R. (2007). The scoop on the fly brain: glial engulfment functions in Drosophila. Neuron glia biology *3*, 63-74.
Luo, H., Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R. (1995). An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-l Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. EMBO J *14*, 1412-1420.
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*, 1562-1571.
Ma, J., and Ptashne, M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. Cell *50*, 137-142.
MacDonald, J.M., Beach, M.G., Porpiglia, E., Sheehan, A.E., Watts, R.J., and Freeman, M.R. (2006). The Drosophila cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. Neuron *50*, 869-881.
Macdonald, J.M., Doherty, J., Hackett, R., and Freeman, M.R. (2013). The c-Jun kinase signaling cascade promotes glial engulfment activity through activation of draper and phagocytic function. Cell death and differentiation *20*, 1140-1148.
Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. J Biol Chem *279*, 48466-48476.
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. Nature genetics *36*, 1019-1023.
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*, 320-324.
Mao, H., Lv, Z., and Ho, M.S. (2012). Gcm proteins function in the developing nervous system. Dev Biol *370*, 63-70.
Maret, A., Bourdeau, I., Ding, C., Kadkol, S.S., Westra, W.H., and Levine, M.A. (2004). Expression of GCMB by intrathymic parathyroid hormone-secreting adenomas indicates their parathyroid cell origin. The Journal of clinical endocrinology and metabolism *89*, 8-12.

Martin-Bermudo, M.D., Martinez, C., Rodriguez, A., and Jimenez, F. (1991). Distribution and function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in Drosophila. Development *113*, 445-454.
Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H., and Izumi, H. (1998). miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis. Development *125*, 4089-4098.
Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nature reviews. Molecular cell biology *9*, 446-454.
Meister, M., and Lagueux, M. (2003). Drosophila blood cells. Cellular microbiology *5*, 573-580.
Miller, A.A., Bernardoni, R., and Giangrande, A. (1998). Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm. EMBO J *17*, 6316-6326.
Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 10431-10434.
Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. Cell *147*, 1589-1600.
Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell *132*, 598-611.
Mukherjee, T., Kim, W.S., Mandal, L., and Banerjee, U. (2011). Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells. Science *332*, 1210-1213.
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*, 561-579.
Nakao, K., and Campos-Ortega, J.A. (1996). Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in Drosophila. Neuron *16*, 275-286.
Nappi, A.J., and Vass, E. (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society *6*, 117-126.
Nappi, A.J., and Vass, E. (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive Drosophila melanogaster. The Journal of parasitology *84*, 1150-1157.
Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. European journal of cell biology *68*, 450-456.
Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (2000). Nitric oxide involvement in Drosophila immunity. Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society *4*, 423-430.
Nave, K.A., and Salzer, J.L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. Current opinion in neurobiology *16*, 492-500.
Nave, K.A., and Trapp, B.D. (2008). Axon-glial signaling and the glial support of axon function. Annual review of neuroscience *31*, 535-561.
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*, 3438-3447.
Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R.M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. Nature medicine *19*, 1584-1596.
Olofsson, B., and Page, D.T. (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic Drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. Dev Biol *279*, 233-243.
Parker, R.J., and Auld, V.J. (2006). Roles of glia in the Drosophila nervous system. Seminars in cell & developmental biology *17*, 66-77.

Parmentier, M.L., Woods, D., Greig, S., Phan, P.G., Radovic, A., Bryant, P., and O'Kane, C.J. (2000). Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in Drosophila. J Neurosci *20*, RC84.
Pearson, B.J., and Doe, C.Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in Drosophila. Nature *425*, 624-628.
Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia *50*, 427-434.
Perez, S.E., and Steller, H. (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in Drosophila melanogaster. Journal of neurobiology *30*, 359-373.
Petronczki, M., and Knoblich, J.A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in Drosophila. Nat Cell Biol *3*, 43-49.
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*, 99-9113.
Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell *112*, 453-465.
Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C.*, et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science *282*, 2085-2088.
Prokop, A., and Technau, G.M. (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of Drosophila melanogaster. Development *111*, 79-88.
Prokop, A., and Technau, G.M. (1994). Early tagma-specific commitment of Drosophila CNS progenitor NB1-1. Development *120*, 2567-2578.
Querfurth, E., Schuster, M., Kulessa, H., Crispino, J.D., Doderlein, G., Orkin, S.H., Graf, T., and Nerlov, C. (2000). Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. Genes Dev *14*, 2515-2525.
Ragone, G., Bernardoni, R., and Giangrande, A. (2001). A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 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*, 138-150.
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*, 132-147.
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*, 4023-4031.
Reichert, H. (2011). Drosophila neural stem cells: cell cycle control of self-renewal, differentiation, and termination in brain development. Results and problems in cell differentiation *53*, 529-546.
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*, 141-150.
Reuter, R. (1994). The gene serpent has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the Drosophila gut. Development *120*, 1123-1135.
Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M.T., Iche, M., and Birman, S. (2004). Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the Drosophila brain. Curr Biol *14*, 599-605.
Rizki, R.M., and Rizki, T.M. (1984). Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. Proc Natl Acad Sci U S A *81*, 6154-6158.
Rizki, T.M., Rizki, R., and Grell, E.H. (1980). A mutant affecting the crystal cells inDrosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Archiv *188*, 91-99.

Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.M., and White, K. (1988). The elav gene product of Drosophila, required in neurons, has three RNP consensus motifs. Science *242*, 1570-1572.
Romani, S., Campuzano, S., and Modolell, J. (1987). The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of Drosophila embryos. EMBO J *6*, 2085-2092.
Rothberg, J.M., Jacobs, J.R., Goodman, C.S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. Genes Dev *4*, 2169-2187.
Roush, W. (1995). Nobel prizes: fly development work bears prize-winning fruit. Science *270*, 380-381.
Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., and Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (Leptopilina boulardi) eggs in resistant and susceptible strains of Drosophila. Parasitology *112 (Pt 1)*, 135-142.
Sam, S., Leise, W., and Hoshizaki, D.K. (1996). The serpent gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. Mech Dev *60*, 197-205.
Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V., and Furlong, E.E. (2007). A core transcriptional network for early mesoderm development in Drosophila melanogaster. Genes Dev *21*, 436-449.
Santos, J.G., Vomel, M., Struck, R., Homberg, U., Nassel, D.R., and Wegener, C. (2007). Neuroarchitecture of peptidergic systems in the larval ventral ganglion of Drosophila melanogaster. PloS one *2*, e695.
Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila. Curr Biol *10*, 353-362.
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*, 4653-4689.
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.
Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in Drosophila neuroblasts. Nature *402*, 548-551.
Schreiber, J., Enderich, J., and Wegner, M. (1998). Structural requirements for DNA binding of GCM proteins. Nucleic Acids Res *26*, 2337-2343.
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*, 2466-2474.
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*, 4739-4744.
Schuldt, A.J., Adams, J.H., Davidson, C.M., Micklem, D.R., Haseloff, J., St Johnston, D., and Brand, A.H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. Genes Dev *12*, 1847-1857.
Seal, R.P., Daniels, G.M., Wolfgang, W.J., Forte, M.A., and Amara, S.G. (1998). Identification and characterization of a cDNA encoding a neuronal glutamate transporter from Drosophila melanogaster. Receptors & channels *6*, 51-64.
Sepp, K.J., and Auld, V.J. (2003). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for Drosophila peripheral nervous system development. J Neurosci *23*, 8221-8230.
Sepp, K.J., Schulte, J., and Auld, V.J. (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in Drosophila melanogaster. Glia *30*, 122-133.

Shen, C.P., Knoblich, J.A., Chan, Y.M., Jiang, M.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1998). Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufen and Prospero during asymmetric cell division in Drosophila. Genes Dev *12*, 1837-1846.
Shklyar, B., Levy-Adam, F., Mishnaevski, K., and Kurant, E. (2013). Caspase activity is required for engulfment of apoptotic cells. Mol Cell Biol *33*, 3191-3201.
Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P., and Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. Neuron *49*, 489-502.
Simpson, P., and Carteret, C. (1990). Proneural clusters: equivalence groups in the epithelium of Drosophila. Development *110*, 927-932.
Siskova, Z., and Tremblay, M.E. (2013). Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. Neural plasticity *2013*, 425845.
Skeath, J.B., and Carroll, S.B. (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the Drosophila nervous system. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *8*, 714-721.
Slack, C., Overton, P.M., Tuxworth, R.I., and Chia, W. (2007). Asymmetric localisation of Miranda and its cargo proteins during neuroblast division requires the anaphase-promoting complex/cyclosome. Development *134*, 3781-3787.
Sokol, N.S., and Ambros, V. (2005). Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. Genes Dev *19*, 2343-2354.
Somogyi, K., Sipos, B., Penzes, Z., Kurucz, E., Zsamboki, J., Hultmark, D., and Ando, I. (2008). Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. Molecular biology and evolution *25*, 2337-2347.
Sonnenfeld, M.J., and Jacobs, J.R. (1994). Mesectodermal cell fate analysis in Drosophila midline mutants. Mech Dev *46*, 3-13.
Sorrentino, R.P., Carton, Y., and Govind, S. (2002a). Cellular immune response to parasite infection in the Drosophila lymph gland is developmentally regulated. Dev Biol *243*, 65-80.
Sorrentino, R.P., Gajewski, K.M., and Schulz, R.A. (2005). GATA factors in Drosophila heart and blood cell development. Seminars in cell & developmental biology *16*, 107-116.
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*, 1343-1356.
Sorrentino, R.P., Small, C.N., and Govind, S. (2002b). Quantitative analysis of phenol oxidase activity in insect hemolymph. BioTechniques *32*, 815-816, 818, 820, 822-813.
Sousa-Nunes, R., Yee, L.L., and Gould, A.P. (2011). Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in Drosophila. Nature *471*, 508-512.
Soustelle, L., and Giangrande, A. (2007a). Glial differentiation and the Gcm pathway. Neuron glia biology *3*, 5-16.
Soustelle, L., and Giangrande, A. (2007b). Novel gcm-dependent lineages in the postembryonic nervous system of Drosophila melanogaster. Dev Dyn *236*, 2101-2108.
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*, 4521-4532.
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*, 625-634.
Southall, T.D., and Brand, A.H. (2007). Chromatin profiling in model organisms. Briefings in functional genomics & proteomics *6*, 133-140.
Spahn, P., Huelsmann, S., Rehorn, K.P., Mischke, S., Mayer, M., Casali, A., and Reuter, R. (2014). Multiple regulatory safeguards confine the expression of the GATA factor Serpent to the hemocyte primordium within the Drosophila mesoderm. Dev Biol *386*, 272-279.

Sprecher, S.G., and Hirth, F. (2006). Expression and function of the columnar patterning gene msh in late embryonic brain development of Drosophila. Dev Dyn *235*, 2920-2929.
Stofanko, M., Kwon, S.Y., and Badenhorst, P. (2010). Lineage tracing of lamellocytes demonstrates Drosophila macrophage plasticity. PloS one *5*, e14051.
Stoll, G., and Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. Prog Neurobiol *58*, 233-247.
Stork, T., Engelen, D., Krudewig, A., Silies, M., Bainton, R.J., and Klambt, C. (2008). Organization and function of the blood-brain barrier in Drosophila. J Neurosci *28*, 587-597.
Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. Science *242*, 405-411.
Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10520-10525.
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*, 1829-1837.
Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the Drosophila embryo. Dev Biol *161*, 563-596.
Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. Science *274*, 1123-1133.
Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., and Perrin-Schmitt, F. (1988). Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos. EMBO J *7*, 2175-2183.
Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J.-V., Janky, R.s., Defrance, M., Vervisch, E., Brohee, S., and van Helden, J. (2008). RSAT: regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res *36*, 119-127.
Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., and Leiden, J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. Nature *384*, 474-478.
Truman, J.W., and Bate, M. (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of Drosophila melanogaster. Dev Biol *125*, 145-157.
Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. Nature *371*, 221-226.
Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. Cell *90*, 109-119.
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*, 1457-1466.
Umesono, Y., Hiromi, Y., and Hotta, Y. (2002). Context-dependent utilization of Notch activity in Drosophila glial determination. Development *129*, 2391-2399.
Urbach, R., Schnabel, R., and Technau, G.M. (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in Drosophila. Development *130*, 3589-3606.
Van De Bor, V., and Giangrande, A. (2001). Notch signaling represses the glial fate in fly PNS. Development *128*, 1381-1390.
Van De Bor, V., and Giangrande, A. (2002). glide/gcm: at the crossroads between neurons and glia. Current opinion in genetics & development *12*, 465-472.
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*, 3735-3743.

van den Eijnde, S.M., Boshart, L., Baehrecke, E.H., De Zeeuw, C.I., Reutelingsperger, C.P., and Vermeij-Keers, C. (1998). Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. Apoptosis : an international journal on programmed cell death *3*, 9-16.
van Steensel, B., Delrow, J., and Henikoff, S. (2001). Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase. Nature genetics *27*, 304-308.
Vignjevic, D., and Montagnac, G. (2008). Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. Seminars in cancer biology *18*, 12-22.
Viktorin, G., Riebli, N., Popkova, A., Giangrande, A., and Reichert, H. (2011). Multipotent neural stem cells generate glial cells of the central complex through transit amplifying intermediate progenitors in Drosophila brain development. Dev Biol *356*, 553-565.
Vincent, S., Vonesch, J.L., and Giangrande, A. (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. Development *122*, 131-139.
von Hilchen, C., and Altenhein, B. (2014). Tracing cells throughout development: insights into single glial cell differentiation. Fly (Austin) *8*.
von Hilchen, C.M., Bustos, A.E., Giangrande, A., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2013). Predetermined embryonic glial cells form the distinct glial sheaths of the Drosophila peripheral nervous system. Development *140*, 3657-3668.
von Hilchen, C.M., Hein, I., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the Drosophila embryo. Development *137*, 1251-1262.
Wakamatsu, Y. (2004). Understanding glial differentiation in vertebrate nervous system development. The Tohoku journal of experimental medicine *203*, 233-240.
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*, 5477-5486.
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*, 6516-6525.
Waltzer, L., Gobert, V., Osman, D., and Haenlin, M. (2010). Transcription factor interplay during Drosophila haematopoiesis. Int J Dev Biol *54*, 1107-1115.
Watts, R.J., Schuldiner, O., Perrino, J., Larsen, C., and Luo, L. (2004). Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. Curr Biol *14*, 678-684.
Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B., and Miller, A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 5434-5438.
White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. Science *264*, 677-683.
Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. J Cell Biol *150*, 1361-1374.
Wong, M.C., Castanon, I., and Baylies, M.K. (2008). Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis. Dev Biol *317*, 417-429.
Xiong, W.C., and Montell, C. (1995). Defective glia induce neuronal apoptosis in the repo visual system of Drosophila. Neuron *14*, 581-590.
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*, 981-994.
Yin, Z., Xu, X.L., and Frasch, M. (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. Development *124*, 4971-4982.
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*, 4587-4598.

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*, 2419-2428.
Zanet, J., Payre, F., and Plaza, S. (2009a). Fascin for cell migration in Drosophila. Fly (Austin) *3*, 281-282.
Zanet, J., Stramer, B., Millard, T., Martin, P., Payre, F., and Plaza, S. (2009b). Fascin is required for blood cell migration during Drosophila embryogenesis. Development *136*, 2557-2565.
Zaytouni, T., Efimenko, E.E., and Tevosian, S.G. (2011). GATA transcription factors in the developing reproductive system. Advances in genetics *76*, 93-134.
Zeidler, M.P., and Bausek, N. (2013). The Drosophila JAK-STAT pathway. Jak-Stat *2*, e25353.
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*, 14192-14197.
Ziegenfuss, J.S., Biswas, R., Avery, M.A., Hong, K., Sheehan, A.E., Yeung, Y.G., Stanley, E.R., and Freeman, M.R. (2008). Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. Nature *453*, 935-939.
Zsámboki, J., Csordás, G., Honti, V., Pintér, L., Bajusz, I., Galgóczy, L., Andó, I., and Kurucz, É. (2013). Drosophila Nimrod proteins bind bacteria. cent.eur.j.biol. *8*, 633-645.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Guillaume Trébuchet

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Etude des mécanismes de la différenciation cellulaire impliquant le facteur de transcription Glide/Gcm chez la drosophile

Résumé

La différenciation cellulaire implique des facteurs clés. Chez la drosophile, le facteur de transcription Glide/Gcm est impliqué dans la différenciation de deux types de cellules immunitaires : les macrophages circulants, qui ont une origine hématopoïétique, et les cellules gliales, macrophages résidents du système nerveux central, qui sont issues des précurseurs neuraux. J'ai d'abord entrepris la caractérisation du potentiel hématopoïétique de Gcm et l'identification de ses cibles dans les hémocytes. Ensuite, pour comprendre comment plusieurs types cellulaires peuvent être spécifiés par un même facteur de transcription, j'ai étudié comment s'effectue le choix entre le destin glial et le destin hémocytaire de la cellule. J'ai en particulier mis en évidence le rôle clé des gènes agissant en aval de Gcm, ceux impliqués dans la consolidation et le maintien de l'identité cellulaire. Finalement, j'ai participé à la caractérisation du territoire d'expression de Gcm au niveau protéique et découvert un nouveau rôle de Gcm dans la différenciation de cellules neurosécrétrices, cellules indispensable pour initier le signal hormonale déclenchant le phénomène de mue chez les insectes.

Mots clés : Cellules gliales, hémocytes, Gcm, Repo, spécification cellulaire, drosophile, cellules péritrachéales

Résumé en anglais

Cell fate determination involves key transcription factors. In *Drosophila*, the transcription factor Glide/Gcm is required for the differentiation of two immune cell types: circulating macrophages, which arise from hematopoietic precursors, and glial cells, resident macrophages of the central nervous system, which differentiate from neural precursors. In first, I characterized Gcm hematopoietic potential and identified its target genes in hemocytes. Then, to get an insight into molecular mechanisms underlying the acquisition of several identities with a single fate determinant, I investigated how the choice between the hemocyte and the glial fates is regulated. Being necessary to consolidate and to maintain a specific fate, I highlighted the key role of genes acting downstream of a fate determinant. Finally, I contributed to characterize Gcm expression profile at the protein level and highlighted a new role of Gcm in the differentiation of neurosecretory cells, cells absolutely required to initiate the hormonal signal triggering the molting process in insects.

Keywords : Glial cells, hemocytes, Gcm, Repo, cell fate determination, *Drosophila*, peritracheal cells