



**HAL**  
open science

# Rôle de Spen dans la survie cellulaire - Apoptose Développementale et processus neurodégénératifs

Matthieu Querenet

► **To cite this version:**

Matthieu Querenet. Rôle de Spen dans la survie cellulaire - Apoptose Développementale et processus neurodégénératifs. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2014. Français. NNT : 2014ENSL0934 . tel-01131769

**HAL Id: tel-01131769**

**<https://theses.hal.science/tel-01131769>**

Submitted on 16 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale  
Supérieure de Lyon

Discipline : Sciences de la vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire et de la Cellule

École Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

présentée et soutenue publiquement le **3 Octobre 2014**

par Monsieur Matthieu QUERENET

---

Rôle de *spen* dans la survie cellulaire :  
Apoptose Développementale et processus  
neurodégénératifs

---

Directeur de thèse : Pr. Bertrand MOLLEREAU  
Co-Encadrante de thèse : Dr. Nathalie DAVOUST-NATAF

Devant la commission d'examen formée de :

Dr. Mohammed BENDAHMANE	Examineur
Dr. Nathalie DAVOUST-NATAF	Co-Encadrante de thèse
Dr. Isabelle GUÉNAL	Rapporteur
Dr. Bertrand MOLLEREAU	Directeur de thèse
Dr. Emmanuel TAILLEBOURG	Examineur
Pr. Laurent THÉODORE	Rapporteur

*La science est une chose merveilleuse... tant qu'il ne faut pas en vivre !*  
A. Einstein

## Remerciements

J'ai été plus que content d'avoir réalisé ce travail de thèse au sein d'une communauté très agréable et motivante. Je veux tout d'abord remercier ma compagne Floriane, sans qui ces quatre années de thèse n'auraient pas été aussi agréables. C'est un vrai bonheur d'être à ses côtés depuis mon entrée à Normal Sup. Elle m'a apporté son optimisme et sa joie de vivre dans et hors de mon travail de thèse.

Je veux aussi remercier mes deux directeurs de thèse, Bertrand et Nathalie, qui ont fait un travail remarquable et éprouvant (sourire) à savoir me diriger dans mon travail de thèse. Ils ont tous les deux été très formateurs et disponibles au cours de ces années. Je les remercie également pour leur aide au cours de la rédaction de mon manuscrit de thèse.

Je veux aussi saluer tous les membres (présents et passés, même futurs tant qu'à faire) de l'équipe Mollereau. Un clin d'œil spécial à Bertin, "C.lève", Gilles et Marion pour leur bonne humeur. Un grand merci à Valérie pour sa sympathie et son aide pour le projet.

Il m'est impossible de ne pas mentionner le trio gagnant qui m'a supporté dans le bureau tout du long : Antoine, Max et Stéphane. Ce serait trop long d'expliquer pourquoi j'ai été si content de les avoir à mes côtés. Merci beaucoup à vous trois et ces moments vont me manquer.

Merci également à Serge Birman et Catherine Giesler, pour m'avoir parfaitement guidé pendant mes comités de suivi de thèse. Je fais un gros clin d'œil aux équipes de recherche du couloir : Jalinot et Aguilaniu, en particulier mon Momo à qui je souhaite plein de réussite au NIH.

Je remercie également Laurent Seugnet, Marie-Odile Fauvarque et Véronique Morel pour leurs conseils tout au long de ma thèse. Je remercie également toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions : le service technique et administratif du LBMC et le personnel de L'ENS. Un coucou au passage à Alex, qui a su sans fautes nous fournir la nourriture pour les drosos.

Je tiens également à remercier l'équipe du Platim, leurs conseils et leurs expertises en microscopie m'ont été d'une grande aide au cours de mes expériences.

Un grand merci à toute ma famille et mes amis. Même si aucun d'entre eux n'a jamais compris sur quoi j'ai travaillé pendant quatre ans, ils ont tous été d'un support essentiel.

Je tiens à saluer tous mes collègues de l'ASVF Bad, de la mairie de

FOUR et du monde agricole, c'est grâce à eux que j'ai pu souvent m'évader et prendre beaucoup de plaisir.

## Résumé

Le gène *split end* (*spen*) est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, notamment les voies Notch, EGF ou encore Wingless. Alors que le rôle de *spen* a été étudié dans de nombreux processus (polarité planaire, mise en place des cellules gliales, développement précoce de l'œil...), plusieurs études ont suggéré son rôle dans le contrôle de la mort cellulaire sans jamais le démontrer.

Durant ma thèse j'ai étudié le rôle de *spen* dans la mort cellulaire au cours du développement de la rétine de la Drosophile. L'œil de Drosophile est composé de centaines d'unités appelées ommatidies. Chaque ommatidie est composée de huit photorécepteurs entourés de cellules accessoires comprenant quatre cellules cônes et deux cellules pigmentaires primaires, ainsi que douze cellules interommatidiales. Les cellules interommatidiales comprennent six cellules pigmentaires secondaires (à l'interface entre deux ommatidies), trois cellules tertiaires (à l'interface entre trois ommatidies) et trois soies. Les cellules interommatidiales adoptent une structure hexagonale parfaitement régulière. Des cellules interommatidiales en excès doivent être éliminées par apoptose afin d'obtenir un nombre exact donnant un patron final parfait. Cette phase de mort cellulaire intervient principalement 28 heures après la formation de la puppe. L'implication des voies Notch et EGF dans la régulation de l'apoptose au cours de ce processus, nous a conduit à étudier le rôle de *spen* dans ce contexte.

J'ai montré que la modulation de *spen* (inactivation ou sur-expression) modifiait radicalement le patron des cellules interommatidiales. L'utilisation d'un driver spécifique de l'œil a permis de mettre en évidence un probable rôle anti-apoptotique de *spen*. En effet l'inactivation de *spen* conduit à un défaut de cellules interommatidiales alors que sa surexpression entraîne un excès de ces cellules. Afin de confirmer que ce phénotype est en effet lié à un problème de mort cellulaire, nous avons utilisé la protéine virale p35 connue comme bloquant l'activité des caspases. Nous avons ainsi montré que la perte des cellules interommatidiales dans un contexte mutant pour *spen* pouvait être entièrement sauvée en exprimant la protéine p35. Aussi nous avons montré que l'inactivation de *spen* après les étapes de développement larvaire de l'œil était suffisante pour induire la perte de cellules interommatidiales, excluant ainsi l'hypothèse que le phénotype pupal observé eu été la conséquence du rôle précoce de *spen* au cours de développement.

Le gène *spen* code pour une protéine nucléaire appartenant à une famille

de co-represseurs transcriptionnels. Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire, nous avons donc cherché à déterminer dans quelles cellules *spen* jouait son rôle de régulateur de la mort cellulaire.

Grâce à une analyse clonale, nous avons pu montrer que c'est au niveau des cellules cônes que *spen* agit. L'inactivation de *spen* dans les autres cellules accessoires de l'œil n'influence pas la mort des cellules interommatidiales. Nous avons en outre, montré que *spen* avait un rôle dans la formation des soies de chaque ommatidie.

Ces travaux mettent en évidence un rôle de *spen* dans le contrôle de la mort cellulaire des cellules interommatidiales dans les cellules cônes. Nos résultats montrent, par ailleurs, que *spen* serait requis pour le relarguage du facteur de survie Spitz (le ligand activateur de la voie EGF) à partir des cellules cônes. Des études supplémentaires pourront montrer par quels mécanismes moléculaires *spen* contrôle la survie des IOCs.

En parallèle, nous avons étudiés le rôle de survie de *spen* dans un modèle neurodégénératif (stress oxydatif induit par l'agent chimique paraquat). Nous avons montré que *spen* était nécessaire dans le cerveau adulte au niveau des cellules gliales pour la résistance au stress oxydatif. De manière intéressante, nous avons trouvé que l'inactivation de *spen* dans la glie diminuait l'activité de la voie de signalisation NOTCH. Cette résistance pourrait se faire via la modulation de gènes anti-oxydants.

De manière générale, nos travaux démontrent un rôle du gène *split ends* dans la survie cellulaire. Ce facteur agit de manière non-autonome à partir des cellules supports de différents organes.

#### MOTS-CLÉS

Drosophile, rétine, apoptose, développement, Notch, EGFR, stress oxydatif, *split ends*, cellules gliales, neurones dopaminergiques

## Abstract

In metazoan, the successful development of many organs requires the elimination of supernumerary cells by apoptosis. For example, the elimination of about two thousand interommatidial cells (IOCs) during *Drosophila* eye development allows the precise rearrangement of ommatidia in a perfect hexagonal array. Maximal apoptosis occurs during pupal life and the remaining IOCs differentiate into secondary and tertiary pigment cells. The precise removal of unwanted IOCs requires coordinated activation of Notch (pro-death) and EGF (pro-survival) pathways. IOCs undergoing apoptosis express the IAP inhibitor Hid, which leads to the activation of initiator and effector caspases. However, the mechanisms that coordinate the death and survival pathways for timed and precise IOC removal are poorly understood.

Here, we report that *spen* encodes a nuclear protein expressed in the pupal eye that is required for IOC survival. We showed that the inhibition of *spen*, by either RNAi or in *spen* mutant clones resulted in disorganized ommatidia with missing IOCs. Moreover, overexpression of *spen* lead to extra IOCs. These results indicate that *spen* expression promotes IOC survival during eye development. Importantly blocking apoptosis prevents the loss of IOC in a *spen* mutant retina. Spen is a protein known to be ubiquitous in tissue during development. Indeed, we have shown using an enhancer trap line that *spen* is expressed in all the cells in the eye pupal disk. To better understand where *spen* is acting from in this tissue to regulate cell death, we performed a clonal analysis. We found that the inactivation of *spen* in the cone cells was causing the loss of IOC, indicating that *spen* is required non-autonomously in cone cell for IOC survival. In parallel we have shown that the inactivation of *spen* was disrupting eye bristles morphology. Even if studies discuss the role of bristles in the regulation of developmental apoptosis in this context, our clonal analysis excluded this possibility. Furthermore, we found that *spitz*, the EGFR ligand, accumulate in cone cells upon *spen* inactivation. Our current hypothesis is that *spen* is likely to be required for the release of Spitz from the cone cells in order to active the survival signaling pathway EGFR in the IOCs.

Also, we examined the protective role of *spen* in a chemical model of Parkinson disease (paraquat treatment). We showed that the glial expression of *spen* is protective in this context, which suggest against that *spen* acts non-autonomously. Interestingly we found that the inactivation of *spen* in glia downregulates the Notch signaling pathway. *Spen* is likely to be a key factor

integrating cues from different signaling pathways to promote cell survival.

## Message introductif

J'ai réalisé ma thèse de 2011 à 2014 au Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule (LBMC) au sein de l'École Normale Supérieure de Lyon (ENSL). Ce laboratoire regroupe plusieurs équipes travaillant sur de nombreux sujets allant de la structure de la chromatine au vieillissement, cela en utilisant une panoplie complète d'organismes modèles allant de la levure à la souris. J'ai intégré l'équipe "apoptose et neurogénétique" dirigée par le professeur Bertrand Mollereau. L'équipe utilise la *Drosophile* pour comprendre les mécanismes génétiques et moléculaires contrôlant les processus de mort cellulaire, notamment au cours des maladies neurodégénératives. Mes travaux de thèse ont été encadrés par mes deux co-directeurs de thèse Bertrand Mollereau et Nathalie Davoust-Nataf. Nathalie est Maître de Conférences en immunologie à l'ENSL.

J'ai débuté ma thèse en travaillant sur un projet visant à comprendre l'interaction entre une protéine virale du virus de la dengue et la réponse immunitaire dans un modèle arthropode. Ces travaux ont donné lieu à une publication actuellement en révision et présentée en annexe. Nous avons ensuite utilisé la puissance de la génétique de la *Drosophile* pour apporter des éléments de réponse quant au rôle des cellules gliales dans la progression des maladies neurodégénératives. J'ai pour cela effectué un criblage génétique afin d'identifier des gènes gliaux et liés génétiquement à la maladie de Parkinson. Ce crible m'a permis d'identifier le gène *spen* dans ce contexte. Afin d'identifier des partenaires génétiques de *spen*, nous avons surexprimé ce gène dans l'œil nous donnant un phénotype spectaculaire de désorganisation de l'œil. Nous avons ainsi en parallèle caractérisé le rôle de *spen* dans la mise en place de l'œil de *Drosophile* au cours du développement pupal.

# Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Abstract	6
Message introductif	8
Table des figures	13
Liste des abbréviations	15
<b>1 Introduction</b>	<b>18</b>
1.1 La formation de l'œil de Drosophile et l'apoptose développementale . . . . .	18
1.1.1 L'origine des signaux de mort . . . . .	29
1.1.2 Réarrangement des IOC et mort cellulaire . . . . .	31
1.2 L'apoptose . . . . .	33
1.2.1 Propriétés morphologiques de l'apoptose . . . . .	33
1.2.2 Les caspases : les acteurs de la mort . . . . .	35
1.2.3 Les cibles des caspases effectrices . . . . .	36
1.2.4 Les voies d'activation de l'apoptose : les voies intrinsèque et extrinsèque . . . . .	38
1.2.5 Les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) . . . . .	39
1.2.6 Les protéines antagonistes des IAPS : Les protéines RHG	40
1.2.7 La régulation des protéines RHG . . . . .	41
1.3 <i>split ends</i> ( <i>spen</i> ) . . . . .	45
1.3.1 La découverte du gène <i>split ends</i> ( <i>spen</i> ) . . . . .	45
1.3.2 Les rôles pléiotropes de <i>spen</i> . . . . .	47

1.3.3	Rôle de <i>spen</i> dans les étapes précoces du développement de l'œil de Drosophile . . . . .	49
1.3.4	Structure moléculaire de Spen . . . . .	52
1.3.5	La famille de <i>spen</i> et les problèmes développementaux . . . . .	55
1.4	La voie de signalisation Notch . . . . .	58
1.4.1	La voie de signalisation Notch chez la drosophile . . . . .	58
1.4.2	Notch dans le noyau . . . . .	62
1.4.3	Un exemple de programme développemental nécessitant la voie de signalisation Notch : la division asymétrique . . . . .	65
1.5	La voie de signalisation du récepteur EGF chez la Drosophile . . . . .	68
1.5.1	Les bases de la voie EGFR chez la Drosophile . . . . .	68
1.5.2	La régulation de la voie EGFR via le clivage du ligand Spitz . . . . .	69
1.5.3	Les modulateurs de la voie EGFR . . . . .	70
1.5.4	Les relations entre Notch et la voie EGFR . . . . .	74
1.6	Les interactions neurones-glies et la maladie de Parkinson . . . . .	76
1.6.1	les maladies neurodégénératives . . . . .	76
1.6.2	Stress oxydatif et mort cellulaire dans la maladie de Parkinson . . . . .	77
1.6.3	Rôle de la microglie dans la maladie de Parkinson . . . . .	78
1.6.4	Les cellules gliales chez la drosophile . . . . .	80
1.7	Objectifs . . . . .	81
<b>2</b>	<b>Matériels et Méthodes</b> . . . . .	<b>83</b>
2.1	Lignées de Drosophile utilisées et génétique . . . . .	83
2.2	Immunomarquages . . . . .	84
2.3	Détection de l'activité de l'enzyme $\beta$ -galactosidase . . . . .	85
2.4	Microscopie électronique à balayage . . . . .	85
2.5	Microscopie électronique à transmission . . . . .	86
2.6	Génération d'un anticorps polyclonal contre Spen . . . . .	86
2.7	Visualisation des cellules interommatidiales par la méthode de neutralisation de la cornée . . . . .	87
2.8	Extraction d'ARNm et PCR quantitative . . . . .	89
2.9	Résistance au stress . . . . .	90
2.10	Test de Survie . . . . .	90
2.11	Analyses Statistiques . . . . .	90

<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>91</b>
3.1	Le gène <i>Split ends</i> ( <i>spen</i> ) est requis pour la survie des cellules interommatidiales durant le développement pupal de la Drosophile . . . . .	91
3.1.1	<i>Spen</i> est requis pour le développement des IOC's dans la rétine . . . . .	91
3.1.2	<i>Spen</i> contrôle la mort par apoptose des IOC's au cours du développement de la rétine . . . . .	98
3.1.3	<i>Spen</i> régule la survie des IOC's de manière non-autonome à partir des cellules cônes . . . . .	103
3.1.4	<i>Spen</i> contrôlerait la mort des IOC's en contrôlant le relarguage du ligand Spitz . . . . .	108
3.2	<i>Spen</i> est nécessaire à la résistance au stress oxydatif dans le cerveau adulte . . . . .	111
3.2.1	L'expression du gène <i>spen</i> est modulée en réponse à un traitement au paraquat . . . . .	112
3.2.2	L'exposition au paraquat entraîne une perte des neurones dopaminergiques et l'apparition de défauts locomoteurs et de survie . . . . .	113
3.2.3	<i>Spen</i> est exprimé ubiquitairement dans le cerveau adulte de la mouche . . . . .	116
3.2.4	<i>Spen</i> est requis pour la résistance à une exposition au paraquat . . . . .	118
3.2.5	L'expression de <i>spen</i> dans la glie est requise chez la mouche adulte pour la résistance au stress oxydatif . . . . .	122
3.2.6	L'expression de <i>spen</i> dans le cerveau adulte contrôle des acteurs de la réponse anti-oxydante et la voie de signalisation Notch . . . . .	122
3.3	Résultats Annexes . . . . .	125
3.3.1	GMR-GAL4 driver et l'affectation des soies . . . . .	125
3.3.2	<i>Spen</i> et la formation des veines de l'aile . . . . .	126
3.3.3	Identification de nouveaux gènes gliaux impliqués dans la maladie de Parkinson . . . . .	129
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>134</b>
4.1	<i>Spen</i> régule l'élimination des IOC's . . . . .	134
4.2	<i>Spen</i> agit en inhibant la mort cellulaire à partir des cellules cônes . . . . .	135

4.3	Mécanismes par lesquels <i>spen</i> contrôle la survie des IOC's . . .	136
4.4	<i>Spen</i> influencerait la survie des IOC's en contrôlant le relarguage de Spitz . . . . .	137
4.5	<i>Spen</i> régule indirectement la mort apoptotique des IOC's . . .	138
4.6	Le contrôle de la mort cellulaire par communications cellulaires	140
4.7	Le rôle des soies dans la régulation de l'apoptose développementale . . . . .	143
4.8	<i>Spen</i> est requis pour la formation des soies . . . . .	144
4.9	Le gène <i>spen</i> contrôle la survie cellulaire de manière non cellulaire autonome . . . . .	145
4.10	L'expression gliale de <i>spen</i> contrôle la résistance au stress oxydatif dans le cerveau adulte . . . . .	147
<b>Conclusion</b>		<b>149</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>150</b>
<b>Appendices</b>		<b>174</b>
Liste des publications		174
Manuscrit 1 : The dengue virus NS3 protein interacts with Cactus and interferes with Dorsal dependent gene expression in <i>Drosophila</i>		175
Manuscrit 2 : <i>Spen</i> is required for pigment cell survival during <i>Drosophila</i> pupal development		198

# Table des figures

1.1	Organisation de l'œil de Drosophile . . . . .	19
1.2	Mise en place des photorécepteurs chez la larve. . . . .	22
1.3	Mécanismes de recrutement des cellules cônes et des cellules pigmentaires primaires. . . . .	23
1.4	Réarrangement des cellules interommatidiales au cours du temps	25
1.5	Hairless induit la mort en inactivant la voie EGFR . . . . .	28
1.6	Caractéristiques morphologiques de l'apoptose . . . . .	34
1.7	Les caspases initiatrices et effectrices chez la Drosophile et les mammifères . . . . .	37
1.8	L'apoptose chez la Drosophile . . . . .	44
1.9	L'inactivation de <i>spen</i> affecte la fasciculation des axones sensoriels dans l'embryon de Drosophile. . . . .	46
1.10	Représentation schématique des membres de la famille de <i>spen</i>	51
1.11	Schéma d'inhibition latérale au sein d'un groupe de neurones en différenciation . . . . .	59
1.12	Structure de Notch et ses ligands . . . . .	60
1.13	Tableau présentant les différents composants de la voie Notch	61
1.14	Représentation des bases de l'activation de la voie Notch . . .	63
1.15	Division asymétrique donnant un organe sensoriel . . . . .	67
1.16	La régulation du clivage de Spitz par le trafic intracellulaire .	71
1.17	Signalisation à travers la voie EGFR . . . . .	73
1.18	Un exemple d'interaction entre la voie Notch et la voie EGFR	75
1.19	Représentation schématique du rôle duel de la microglie dans le maintien des neurones dopaminergiques . . . . .	80
2.1	Visualisation des cellules interommatidiales par la méthode de neutralisation de la cornée . . . . .	88

3.1	<i>Spn</i> est requis pour la survie des IOCs . . . . .	92
3.2	Profil d'expression du driver <i>lz-GAL4</i> dans les rétines de <i>Drosophila</i> . . . . .	94
3.3	L'inactivation de <i>spn</i> affecte les photorécepteurs et les IOCs dans les rétines adultes de <i>Drosophila</i> . . . . .	96
3.4	<i>Spn</i> est requis pour la formation des soies de la rétine de <i>Drosophila</i> . . . . .	99
3.5	<i>Spn</i> est requis pour la survie des IOCs durant la formation de la puppe . . . . .	101
3.6	L'inhibition de l'apoptose sauve la mort des IOCs dans des mouches mutantes pour <i>spn</i> . . . . .	102
3.7	<i>Spn</i> est exprimé ubiquitairement dans le disque pupal d'œil .	104
3.8	L'expression de <i>Spn</i> est sévèrement réduite dans des clones <i>spn</i> mutants . . . . .	105
3.9	L'inactivation de <i>spn</i> dans les IOCs n'affecte pas la survie des IOCs . . . . .	106
3.10	La survie des IOCs nécessite l'expression de <i>spn</i> dans les cellules cônes . . . . .	109
3.11	<i>Spitz</i> s'accumule dans les cellules cônes et les IOCs dans les clones <i>spn</i> mutants . . . . .	110
3.12	L'expression de <i>spn</i> est modulée en réponse au paraquat (PQ), un agent chimique induisant la mort des neurones dopaminergiques . . . . .	114
3.13	Le gène <i>spn</i> est exprimé ubiquitairement dans le cerveau adulte et est requis pour la résistance à un stress oxydatif . . .	117
3.14	L'expression gliale de <i>spn</i> chez l'adulte est nécessaire à la résistance à un stress au paraquat . . . . .	119
3.15	<i>Spn</i> est impliqué dans la réponse oxydative et la voie de signalisation Notch . . . . .	124
3.16	Le driver <i>GMR-GAL4</i> cible les cellules composants les soies mais pas dans les phases tardives du développement du disque de puppe . . . . .	127
3.17	L'inactivation de <i>spn</i> dans l'aile de la <i>Drosophila</i> bloque la formation de la PCV . . . . .	128
3.18	Patron d'expression de gènes liés à PD dans le cerveau adulte de <i>Drosophila</i> . . . . .	131
3.19	Patron d'expressions de gènes liés à PD dans le cerveau adulte	133

## Liste des abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
Ab	Antibody
Ac	Achaetc
Act	Actin
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AIF	Apoptosis-inducing factor
APF	After pupariation formation
Aos	Argos
Arm	Armadillo
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
$\alpha$ -Syn	$\alpha$ -Synuclein
$\beta$ -cat	$\beta$ -catenin
$\beta$ -GAL	$\beta$ -galactosidase
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology domains
BI-1	Bax inhibitor 1
BIR	Domain Baculovirus IAP repeats domain
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CARD	Caspase-recruitment domain
CNS	Central Nervous System
Co-R	Co-repressor
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
CyO	Curly O
Cyt-c	Cytochrome-c
Da	Dopamine
DARK	Apaf-1 related killer
Dat	Dopamine transporter
DCP-1	Death caspase-1
DD	Death domain
Ddc	Dopa decarboxylase
Debcl	Death executioner Bcl-2 homologue
DED	Death effector domain
DER/EGFR	Drosophila Epidermal Growth Factor Receptor
DIAP	Drosophila inhibitor of apoptosis
DIO	Death inducer-obligator
Dl	Delta
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dpp	Decapentaplegic
DR	Death receptor
DREDD	Death related ced-3/Nedd2-like protein
DRICE	Drosophila Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme

<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DsRNA	Double-stranded RNA
DTRAF	Drosophila TNF-receptor-associated factor
EBV	Epstein-Barr virus
EGF	Epidermal growth factor
Elav	Embryonic lethal abnormal vision
En	Engrailed
ER	Endoplasmic reticulum
E(spl)	Enhancer of Split
Ey	Eyeless
FADD	Fas-associated death domain
GFP	Green Fluorescent protein
GMR	Glass multimerized repeat
H	Hairless
HDAC	Histone deacetylase
Hid	Head involution defective
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IBM	IAP-Binding Motif
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Klu	Klumpfuss
Lch	Lateral chordotonal
Luc	Luciferase
Lz	Lozenge
MAPK	Mitogen Activated Protein kinase
MF	Morphogenetic furrow
Mint	Msx2-interacting nuclear target
N	Notch
NGF	Neuronal Growth Factor
NLS	Nuclear localization signal
NuRD	Nucleosome remodeling and histone deacetylase
Ott1	One twenty-Two 1
PCD	Programmed cell death
PCV	Posterior cross vein
PQ	Paraquat
PR	Photorécepteur
Rbm15	RNA-binding protein motif 15
RBP-J	Recombination signal sequence-binding protein J
Repo	Reverse polarity
Rh	Rhodopsin
RHG	Reaper, Hid, Grim
Rho	Rhomboid
RNAi/ARNi	Acide ribonucléique interférant

RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpr	Reaper
RRM	RNA-recognition motif
Ry	Rosy
S	Star
Sc	Scute
SEM/MEB	Scanning electron microscopy
Ser	Serrate
Sev	Sevenless
Sharp	SMRT/HDAC1 associated repressor protein
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid receptor
SOD	Superoxyde dismutase
SOP	Sensory organ precursor
Spen	Split ends
Spi	Spitz
SPOC	Spen paralog and ortholog C-terminus
SRC-1	Steroid receptor co-activator 1
Su(H)	Suppressor of Hairless
TCF	T-cell Factor
TM6B	Third multiple 6B
TNF	Tumor necrosis factor
TEM/MET	Transmission electron microscopy
Ts	Temperature sensitive
Tub	Tubulin
UAS	Upstream activating sequence
Ubi	Ubiquitin
Vimat	Vesicular monoamine transporter
Wg	Wingless

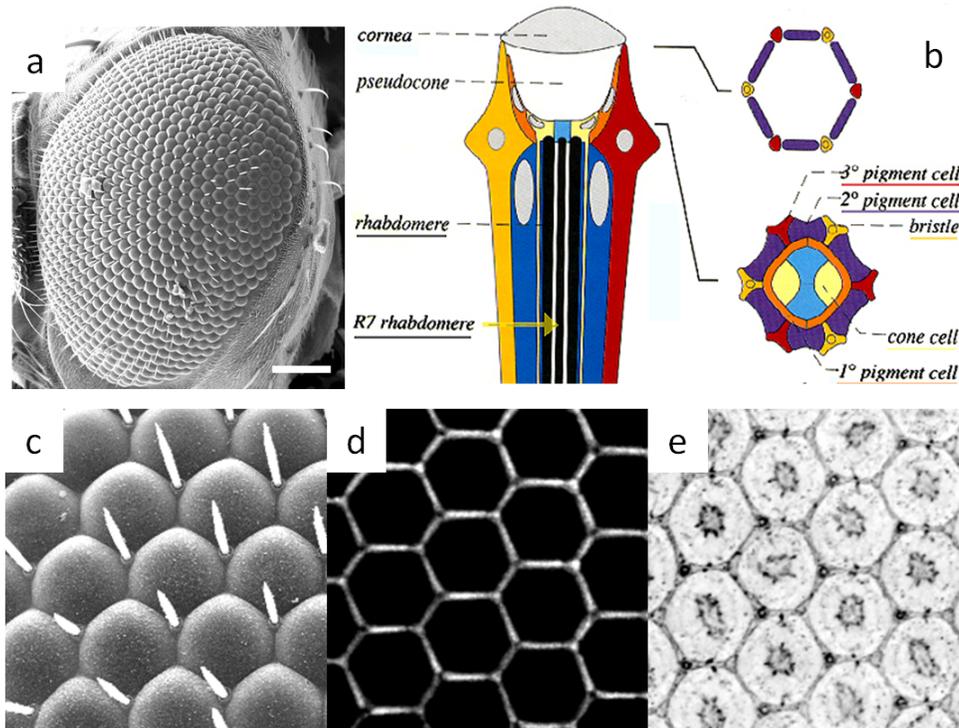
# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 La formation de l'œil de *Drosophile* et l'apoptose développementale

C'est au début du XXème siècle lorsque T.H. Morgan a publié une étude sur la transmission de caractères liés au sexe après avoir observé l'apparition d'un mâle aux yeux blancs dans ses élevages que l'œil de *Drosophile* est devenu un modèle d'étude aujourd'hui célèbre (Morgan 1910). Les études sur l'œil de *Drosophile* sont d'autant plus facilitées que c'est un organe qui n'est requis ni pour la viabilité ni pour la fertilité de la mouche. Par exemple, dans une mouche surexprimant le facteur pro-apoptotique HID (Head Involution Defective) sous le contrôle d'un promoteur fort spécifique de l'œil (GMR-GAL4), l'intégralité des cellules de l'œil seront éliminées par apoptose, mais la mouche sera viable. Le développement de l'œil implique la plupart des voies développementales connues et a été utilisé comme tube à essai pour disséquer les voies de signalisation (Rubin 1989). En conclusion, l'œil de *Drosophile* constitue un outil puissant permettant l'étude de nombreux processus biologiques grâce à l'utilisation de la génétique, de la génomique et de la biochimie.

Au cours du développement de la mouche, l'œil adopte un patron parfait et stéréotypé, dont la mise en place fait intervenir plusieurs voies de signalisation conservées au cours de l'évolution (Kumar 2012). L'œil de *dro-*



**Fig. 1.1. Organisation de l'œil de Drosophile.** (a) Image par microscopie électronique à balayage d'un œil sauvage de Drosophile. L'œil est composé de centaines de facettes appelées ommatidies. L'agrandissement permet de visualiser les soies associées à chaque ommatidie ainsi que la cornée. (b) Vue en coupe et schématisée d'une ommatidie. Au centre de chaque ommatidie se trouvent les photorécepteurs. Au-dessus les quatre cellules cônes sécrètent la cornée. Les cellules pigmentaires et les soies entourent ces cellules formant une ommatidie. Schéma adapté de (Wolff and Ready 1993). (c) Image de Microscopie Electronique à Balayage de la surface d'un œil de mouche. L'aspect hexagonal des ommatidies est visible. Chaque ommatidium est entouré de trois soies. (d) Visualisation des IOC's par la technique de neutralisation de la cornée. Seules les cellules pigmentaires secondaires et tertiaires sont visibles. (e) Disque d'œil de pupa fixé 42 heures APF et marqué avec un anticorps anti-Armadillo, afin de visualiser les membranes. La barre d'échelle (a) représente 100  $\mu$  m.

sophile est composé d'environ 750 unités répétées appelées ommatidies. Ces dernières forment une structure cristalline symétrique par rapport à une ligne équatoriale horizontale. La structure de l'œil est tellement parfaite et précise qu'elle est comparée à un cristal (Ready et al. 1976). Chaque ommatidie mature contient 8 photorécepteurs (cellules neuronales) organisés de manière trapézoïdale. Les photorécepteurs sont entourés de cellules accessoires non neuronales et qui comprennent deux cellules primaires pigmentaires, quatre cellules cônes, et une formation hexagonale composée de six cellules pigmentaires secondaires, trois cellules pigmentaires tertiaires et trois soies (Fig. 1.1). Les cellules pigmentaires secondaires et tertiaires doivent leur nom au nombre de contact qu'elles forment avec les ommatidies voisines, elles sont également nommées cellules interommatidiales ou IOCs (Interommatidial Cells) (Ready et al. 1976, Higashijima et al. 1992). La structure cristalline finale de l'œil adulte étant parfaitement organisée n'importe quelle dérégulation génétique des processus développementaux conduit à des défauts visibles dans l'œil adulte. Cette propriété a permis d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la formation de l'œil. Nous utiliserons dans notre travail, l'œil de *Drosophila* comme un modèle pour comprendre le rôle de *spen* dans la régulation de la mort cellulaire développementale des IOCs.

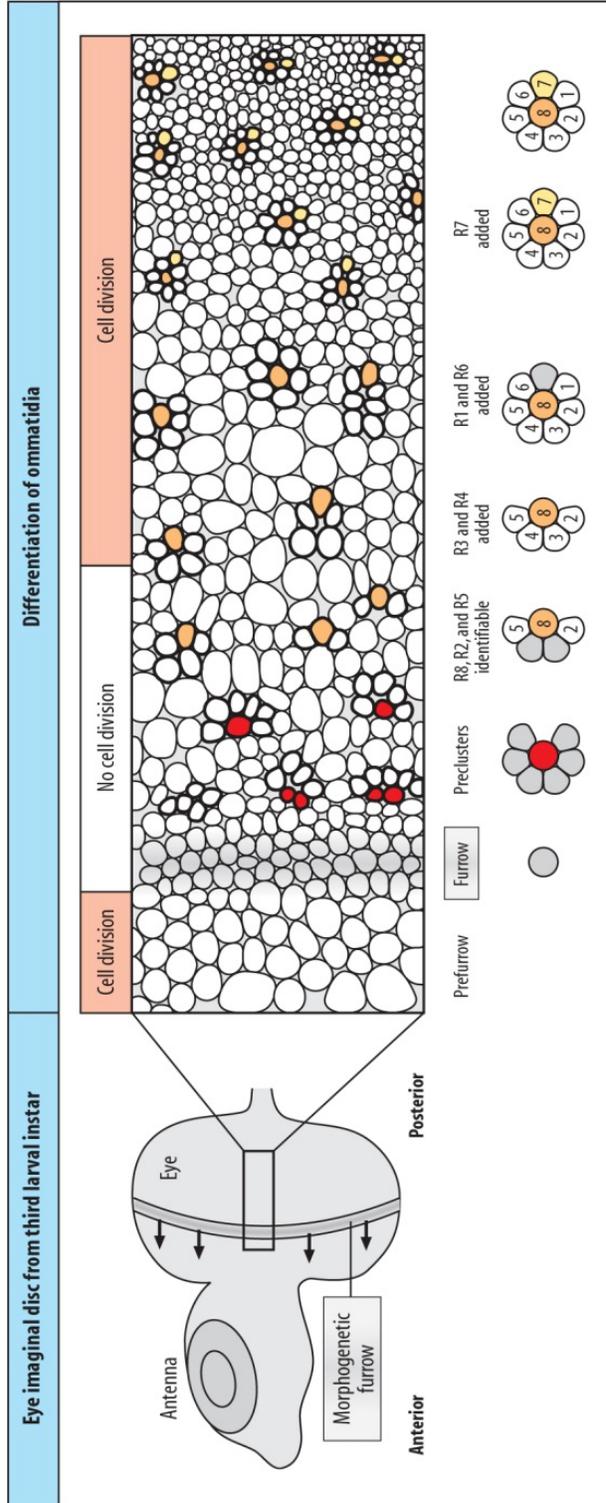
Le développement de l'œil de *Drosophila* commence dès le premier stade larvaire où le disque imaginal d'œil va passer du statut de simple épithélium à celui de tissu organisé (Fig. 1.2). Les premières cellules à se différencier sont les photorécepteurs (les cellules qui captent la lumière). La spécification des cellules de la rétine commence après le passage du sillon morphogénétique. Ce dernier avance de l'extrémité postérieure vers l'extrémité antérieure du disque imaginal d'œil. La position et la vitesse du sillon morphogénétique sont régulées par la molécule extracellulaire Hedgehog (Hh). Hh est sécrétée par les photorécepteurs différenciés après le passage du sillon morphogénétique (Greenwood and Struhl 1999). Le premier photorécepteur à être différencié

est R8 qui recrutera ensuite les autres photorécepteurs au sein de l'ommatidium en formation (Tomlinson and Ready 1987).

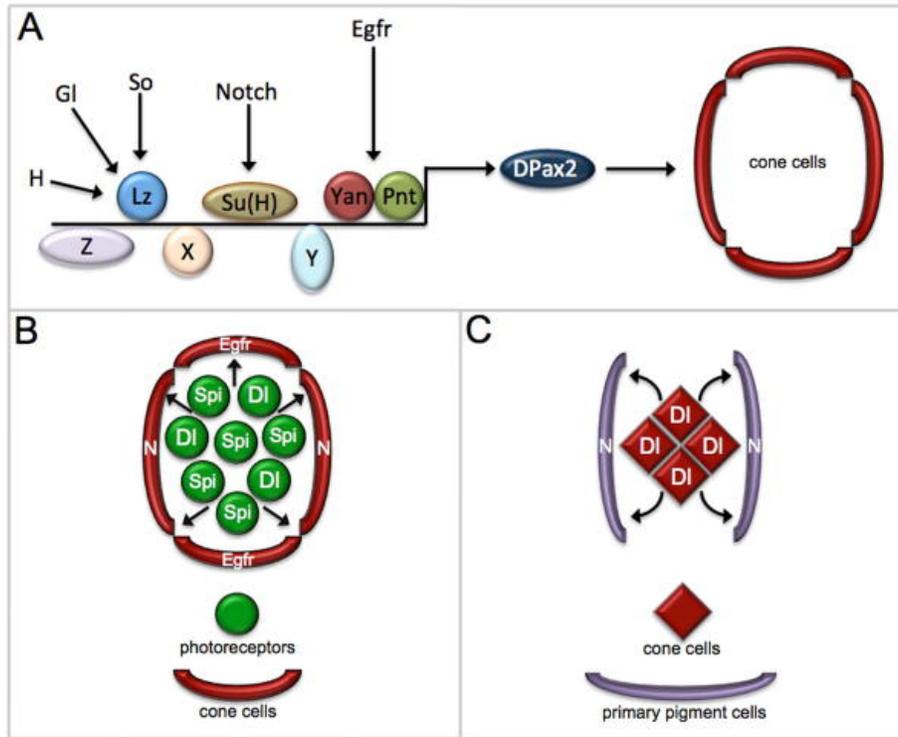
La différenciation des photorécepteurs fait intervenir deux voies de signalisation, la voie EGF et la voie Notch (voir section 1.4 et 1.5). Le récepteur EGF agit via RAS et la cascade des MAPK pour permettre la différenciation et maintenir la survie des cellules dans la rétine à ce stade (Freeman 1996, Domínguez et al. 1998, Yang and Baker 2001, Bergmann et al. 1998). La voie Notch a des effets opposés à la voie EGF, en effet l'activation de la voie Notch induit un blocage de la différenciation cellulaire favorisant ainsi la division des cellules (Cagan and Ready 1989a, Fortini et al. 1993). Au niveau du disque imaginal d'œil en développement, la voie Notch inhibe ainsi la différenciation des photorécepteurs induite par *ras* (Yang and Baker 2006). Plus récemment, une étude a toutefois montré un rôle de la voie Notch dans le recrutement et la différenciation des PRs, en agissant de concert avec la voie EGFR (Tomlinson et al. 2011).

A la fin du troisième stade larvaire, les photorécepteurs "s'enfoncent" dans le disque pour permettre le recrutement des quatre cellules non neuronales qui sécrètent la cornée, appelées cellules cônes (Cagan and Ready 1989a). Une fois que les photorécepteurs sont différenciés, ils envoient en effet des signaux de différenciation en cellules cônes aux cellules les entourant. Ainsi, les ommatidies mutantes pour *argos* (un inhibiteur de la voie EGFR) qui contiennent trop de photorécepteurs auront également des cellules cônes en excès (Freeman et al. 1992). Le facteur de transcription clé et nécessaire à la différenciation des cellules cônes est : dPax 2 (ou *sparkling*) (Fu and Noll 1997). Le promoteur de dPax2 est activé par des facteurs de transcriptions induits par les voies Notch et EGF (Flores et al. 2000, Kumar 2012, Fig. 1.3).

Ainsi, 20 heures après la formation de la puppe (APF, after pupal formation), la différenciation des photorécepteurs, des cellules cônes et des cellules pigmentaires primaires est complète. Les cellules restantes vont former un



**Fig. 1.2. Mise en place des photorécepteurs chez la larve.** Schéma présentant un disque imaginal d'œil au troisième instar larvaire. Le sillon morphogénétique se déplace du côté postérieur vers le côté antérieur du disque. Juste après le passage du sillon morphogénétique les cellules arrêtent de se diviser et se différencient en photorécepteurs dans un ordre bien précis. Image adaptée de : [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIO13530/DEVO\\_11/devo\\_11.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIO13530/DEVO_11/devo_11.html).



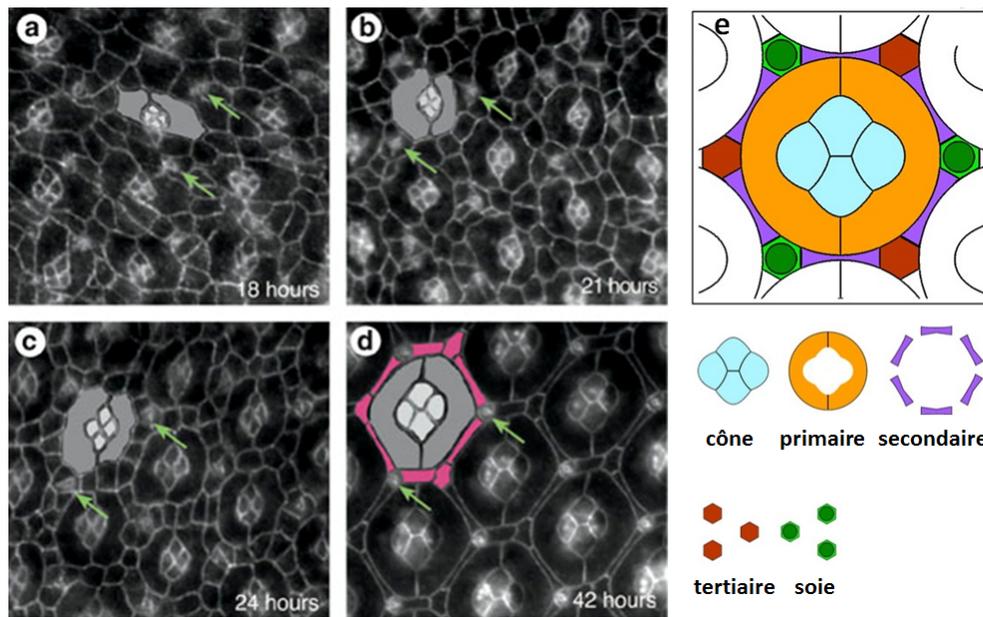
**Fig. 1.3. Mécanismes de recrutement des cellules cônes et des cellules pigmentaires primaires.**A. Différents signaux allant activer le promoteur du gène DPax2, central pour la différenciation des cellules cônes. Des signaux proviennent des voies Notch et EGF notamment. B. Les ligands activant les voies Notch et EGF proviennent des photorécepteurs. C. La voie Notch contrôle la différenciation des cellules pigmentaires primaires. Le signal provient de la voie Notch, activée par l'expression du ligand Delta par les cellules cônes (Kumar 2012). Ensuite, les cellules cônes recruteront à leur tour les deux cellules pigmentaires primaires : le ligand de la voie Notch, Delta (DI), est en effet exprimé par les cellules cônes ce qui entraîne la différenciation des cellules pigmentaires primaires exprimant le récepteur Notch (Nagaraj and Banerjee 2007).

réseau séparant les ommatidies, composé par les cellules pigmentaires secondaires, et tertiaires et les poils sensoriels ou soies. L'ensemble de ces cellules, partagées entre deux ou trois ommatidies, constituera finalement une structure définie et formée d'un nombre constant de cellules appelées cellules interommatidiales. 20 heures APF, les cellules interommatidiales sont indifférenciées et désorganisées. 22 heures APF, les cellules surnuméraires et non différenciées commencent à s'organiser d'une manière très ordonnée formant deux ou plusieurs couches entre les ommatidies. Par la suite, les cellules interommatidiales créent des contacts avec les cellules pigmentaires primaires. Ainsi chaque cellule interommatidiale formera un contact avec au moins deux cellules pigmentaires primaires (Cagan and Ready 1989a). Il en résulte en une structure monocouche de cellules interommatidiales (Fig. 1.4).

22 heures APF il y a un excès de cellules interommatidiales par rapport au nombre final observé dans l'œil adulte. Ainsi environ 1/3 des cellules seront éliminées par apoptose au cours du développement de la puppe et avant l'éclosion pour obtenir un nombre exact d'IOCs et une disposition hexagonale parfaite des ommatidies. Bloquer l'apoptose à ce stade conduit à la formation d'un œil rugueux car l'excès d'IOCs cause un problème d'espacement entre les ommatidies (Hay et al. 1994).

Comme nous allons le voir par la suite, une vague principale d'apoptose intervient entre 26 et 32 heures après la formation de la puppe afin d'éliminer les cellules interommatidiales en excès. La voie apoptotique classique et notamment la protéine pro-apoptotique HID (Head Involution Defect) sont responsables de cette vague d'apoptose (Brachmann and Cagan 2003).

Cette vague de mort cellulaire est également régulée par les voies Notch et EGF (Hay et al. 1994, Ready et al. 1976, Wolff and Ready 1991). En effet, l'induction des voies Notch et EGF assure l'élimination du nombre exact de cellules (Baker and Yu 2001, Rusconi et al. 2000). L'implication de la voie Notch dans ce programme développemental a été d'abord suggérée dans la fin



**Fig. 1.4. Réarrangement des cellules interommatidiales au cours du temps.** (a-d) montrent les cellules du disque pupal d'œil marquées avec un anticorps contre la  $\beta$ -caténine pour marquer les membranes à différents temps après la formation de la pupe (APF). Les cellules cônes sont en gris clair, les cellules pigmentaires primaires sont en gris foncé. Les soies sont marquées par des flèches. (e) représente un schéma d'une ommatidie 42 heures APF avec les différents types cellulaires la composant. Adapté de (Monserrate and Brachmann 2007).

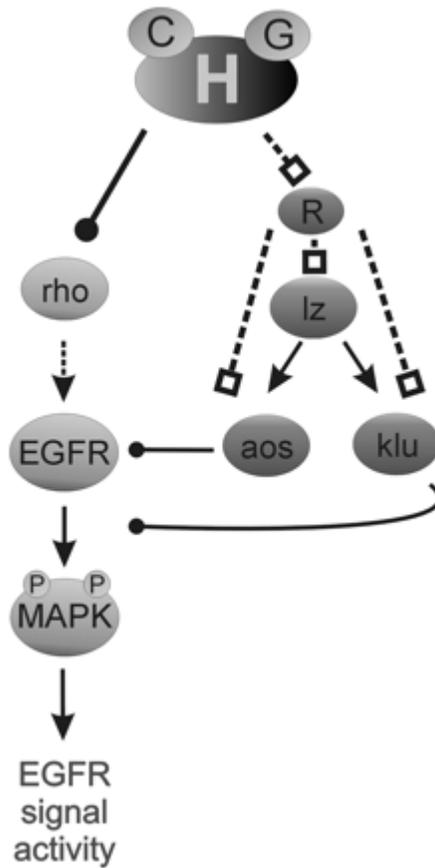
des années 80. Une étude utilisant un allèle thermosensible de Notch a montré que l'inhibition de Notch au cours du développement de l'œil conduisait à l'apparition de cellules pigmentaires secondaires surnuméraires (Cagan and Ready 1989a). La voie de signalisation EGF a été largement caractérisée comme ayant des propriétés de survie cellulaire au cours du développement de la Drosophile (Baker and Yu 2001, Kurada and White 1998, Sawamoto et al. 1998). La voie EGF maintient en effet la survie d'une cellule en inhibant le facteur pro-apoptotic Hid. Lorsque la voie EGF est activée, les MAPK (kinases en aval du récepteur dEGFR) inhibent les fonctions effectrices de Hid par phosphorylation (Bergmann et al. 1998). Ainsi, l'expression d'une forme constitutivement activée de la voie EGF (*ras<sup>v12</sup>*) bloque la mort des cellules pigmentaires en excès. Ces résultats suggèrent que la voie EGF induit un signal de survie (Miller and Cagan 1998, Sawamoto et al. 1998). Plusieurs études ont par la suite montré que l'inactivation de la voie EGF conduit à un excès d'apoptose (Freeman 1996, Miller and Cagan 1998) corroborant ainsi les résultats précédents.

Il est actuellement admis que c'est un équilibre entre les deux voies Notch (signal de mort) et EGF (signal de survie) qui régule le devenir cellulaire des cellules interommatidiales au cours du développement de la rétine. Alors que l'effet de la voie EGF sur la régulation de la survie cellulaire au cours du développement de la rétine est bien décrit, l'implication précise de la voie Notch reste peu connue (Brachmann and Cagan 2003). En outre, la régulation des signaux Notch et EGF n'est pas non plus décrite de manière exhaustive. Une étude a montré que *argos* (*aos*), qui est un ligand inhibiteur sécrété de la voie EGF (Schweitzer et al. 1995a), interviendrait dans la principale vague de mort dans la rétine de la mouche. Les auteurs montrent que la surexpression d'*aos* conduit à un excès de mort cellulaire (Sawamoto et al. 1998). Une hypothèse simple pourrait être que Notch active *aos*, ce qui résulte en une inactivation de la voie EGF et donc un défaut de signaux de survie.

Ce modèle est étayé par des expériences d'épistasie montrant que EGF est en amont du facteur pro-apoptotique Hid, et que la voie Notch, antagoniste de la voie EGFR, serait en amont de cette dernière (Yu et al. 2002).

D'autres éléments de réponse quant aux mécanismes de régulation de la mort des IOCs proviennent de l'étude du gène *klumpfuss* (*klu*), qui encode un facteur de transcription à doigt de zinc. *Klumpfuss* est le seul gène dont l'expression est dynamique au cours de l'élimination des cellules pigmentaires en excès. Les mutants pour ce gène présentent des défauts de mort cellulaire (cellules pigmentaires secondaires en surnombre) (Rusconi et al. 2004). Les auteurs ont aussi montré que *klu* agirait en inhibant la voie EGF pour induire l'apoptose. Les niveaux de dpERK (un marqueur de l'activation de la voie EGF) augmentent dans un mutant *klu*. Pour le moment on ne sait pas si *klu* interagit avec la voie Notch. En revanche une étude récente a pu montrer que *lozenge* (*lz*) code pour un facteur de transcription qui peut directement activer *klu* et *aos*. L'inactivation de *lz* durant la vague d'apoptose conduit à un défaut d'apoptose, tout comme l'inactivation de *klu* ou *aos* (Wildonger et al. 2005). Un modèle simple serait que Notch active *lz* qui lui-même active *klu* et *aos* pour inactiver EGF et ainsi induire la mort par apoptose (Protzer et al. 2008, Fig. 1.5).

La vague de mort cellulaire intervenant 26 heures après la formation de la puppe est la plus importante en termes de nombre de cellules éliminées. Mais plus tôt au cours du développement de l'œil, des cellules mourant par apoptose ont été détectées. Le processus d'élimination des cellules de l'œil commence ainsi dès le stade larvaire (Yu et al. 2002). Des signaux de la voie EGF sont émis après le passage sillon morphogénétique afin de contrôler l'élimination d'un petit nombre de cellules en excès entre les ommatidies. La voie EGF envoyant des signaux de survie (Baker and Yu 2001). Par exemple la mutation du récepteur EGFR entraîne un excès d'apoptose qui peut être sauvé par l'expression de p35 (une protéine virale anti-apoptotique) (Yu et al.



**Fig. 1.5. Hairless (H) induit la mort en inactivant la voie EGFR.** H, avec ces co-represseurs Groucho (G) et CtBP (C), inhibe la voie EGFR de plusieurs manières. H inhibe l'expression de *rhomboid* (*rho*), interférant ainsi avec la production du ligand de EGFR Spiz. Deuxièmement, H active des régulateurs négatifs de la voie EGFR tels que *lozenge* (*lz*), *argos* (*aos*) and *klumpfuss* (*klu*). On note que come ces trois derniers facteurs sont connus pour causer l'apoptose dans la rétine de Drosophile, on s'attend aussi à ce que H induise la mort.

2002). Cette phase d'apoptose précoce serait présente non-pas pour enlever des cellules naturellement en excès mais pour corriger d'éventuels défauts suite aux divisions mitotiques lors du passage du sillon morphogénétique.

Après la métamorphose, soit 18 heures après la formation de la pupe, une vague d'apoptose intervient, localisée dans la partie antérieure de la rétine ainsi que hors de la rétine (Cordero et al. 2004). La phase d'apoptose hors de la rétine serait requise pour sculpter la cuticule entourant l'œil. Cette phase de mort cellulaire s'étend ensuite vers le centre de la rétine jusqu'à 24 heures APF. Les voies Notch et Wingless sont requises pour envoyer le signal de mort à cette étape. De plus le gène pro-apoptotic *hid* est requis à ce moment.

Plus tard au cours de la formation de la pupe, de 35 à 42 heures APF, une dernière vague d'apoptose nécessaire pour sculpter le bord de la rétine a lieu. Cette vague d'apoptose est sous le contrôle positif de la voie de signalisation Wingless et fait intervenir les gènes pro-apoptotic *reaper*, *hid* et *grim* (Lin et al. 2004, Ahmed et al. 1998, Lim and Tomlinson 2006).

### 1.1.1 L'ORIGINE DES SIGNAUX DE MORT

Lors des phases d'apoptoses décrites ci-dessus, le nombre exact de cellules est à chaque fois éliminé. Les mécanismes contrôlant la sélection des IOC's vouées à mourir reste inconnus. Il s'avère toutefois que la sélection des IOC's devant mourir ne se fait pas au hasard et que la position des IOC's affecte leur destin. Les soies seraient ainsi importantes en amenant un signal de position, la majeure partie des IOC's meurent ainsi dans une zone de mort autour des soies (Monserrate and Brachmann 2007). Il est admis que les soies ne seraient pas requises dans l'exécution de la mort des IOC's étant donné que bloquer la formation des soies n'influence pas l'élimination des IOC's (Cadigan and Nusse 1996). Afin de comprendre comment les choix des cellules vouées à mourir est fait, plusieurs groupe ont essayé de comprendre le patron

d'expression les signaux de survies (EGF) et les signaux de mort (Notch). Il s'avère qu'avant la vague d'apoptose principale (26 heures à 32 heures APF), toutes les cellules interommatidiales transduisent des signaux Notch et EGF (Monserrate and Brachmann 2007). Il est ainsi très probable que c'est une fine régulation de la balance entre les signaux de mort et de survie qui contrôle l'apoptose. La voie EGF est activée par la fixation du ligand diffusible Spitz (Schweitzer et al. 1995b), et Spitz pourrait être le signal de vie au niveau de l'ommatidium (Freeman 1997). Spitz est exprimé au niveau des cellules cônes et des soies (Miller and Cagan 1998). Des études plus récentes ont cependant montré que *spitz* pourrait ne pas être impliqué dans la régulation de la mort des cellules pigmentaires. En d'autres termes, la voie EGF serait présente pour maintenir la survie, et la voie Notch s'opposerait à la voie de survie EGF (Yu et al. 2002). En parallèle la voie Notch enverrait un signal de mort (Miller and Cagan 1998). Notch est activé par la fixation de son ligand Delta (Rebay et al. 1991). L'étude de l'expression de Delta apparaît complexe par la dynamique de ce ligand et le fait que Notch est impliqué dans la différenciation de pratiquement tous les types cellulaires de l'ommatidium (Parks et al. 1995). Une seconde étude utilisant une construction *DI-lacZ* a montré que Delta serait fortement exprimé au niveau des cellules cônes (Bao 2014).

Enfin, à défaut de parfaitement comprendre où sont exprimés les signaux de survie ou de mort, des études ont cherché à comprendre qu'elles cellules étaient requises pour contrôler l'apoptose. Des expériences d'ablation laser des cellules de l'œil chez la puppe ont montré que l'ablation des cellules primaires ou des cellules cônes conduisait à un déficit en cellules pigmentaires secondaires. Il reste à démontrer si c'est un excès d'apoptose ou un défaut de survie qui est à l'origine de ce phénotype (Miller and Cagan 1998, Sawamoto et al. 1998). Des études plus récentes ont montré que c'était en effet à partir des cellules cônes que les signaux de mort pourraient provenir. La vague

d'apoptose intervenant 18 heures après la formation de la puppe nécessite un signal de mort passant par la voie de signalisation Wingless. Durant cette période, le ligand Wingless est détecté au niveau des cellules cônes, suggérant que le signal de mort provient de ces cellules (Cordero et al. 2004). Une étude a montré que le gène *Trithorax-like* (*Trl*) est requis pour la mort des IOC. La mutation de ce gène bloque la mort des cellules. Les auteurs ont réalisé une analyse clonale montrant que *Trl* est requis dans les cellules cônes (Dos-Santos et al. 2008). Comme vu précédemment, les molécules d'adhésion sont essentielles du moment qu'elles permettent de positionner correctement les IOC afin qu'elles reçoivent les bons signaux. Dernièrement, une étude a montré que la voie Notch était requise pour l'expression de molécules d'adhésion telles que Rst ou Hbs. Delta, le ligand de Notch est exprimé dans les cellules cônes afin d'induire la voie Notch dans les cellules pigmentaires primaires. Notch va alors permettre l'expression de molécules d'adhésion afin de positionner les IOC autour de ces cellules pigmentaires primaires. Les cellules cônes seraient alors à l'origine de ce signal (Bao 2014).

### 1.1.2 RÉARRANGEMENT DES IOC ET MORT CELLULAIRE

En plus d'études génétiques qui ont mis en évidence les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mort des IOC, l'étude de mutants a aidé à comprendre les mécanismes mis en jeu dans la régulation de la mort des cellules interommatidiales en excès. La première découverte de gènes dont l'inactivation conduit à des défauts d'apoptose remonte au début des années 90. Deux mutants *roughest* (*rst*) et *echinus* (*ec*) perturbent l'apoptose lorsqu'ils sont mutés (Wolff and Ready 1991). La mutation de ces deux gènes conduit à un excès d'IOC après les vagues d'apoptose. Dans le mutant *rst*, les cellules interommatidiales entre les cellules pigmentaires primaires de deux ommatidies ne forment pas une seule ligne de cellule. Il en résulte un défaut d'apoptose. Le mutant *ec* intervient certainement plus tard car les

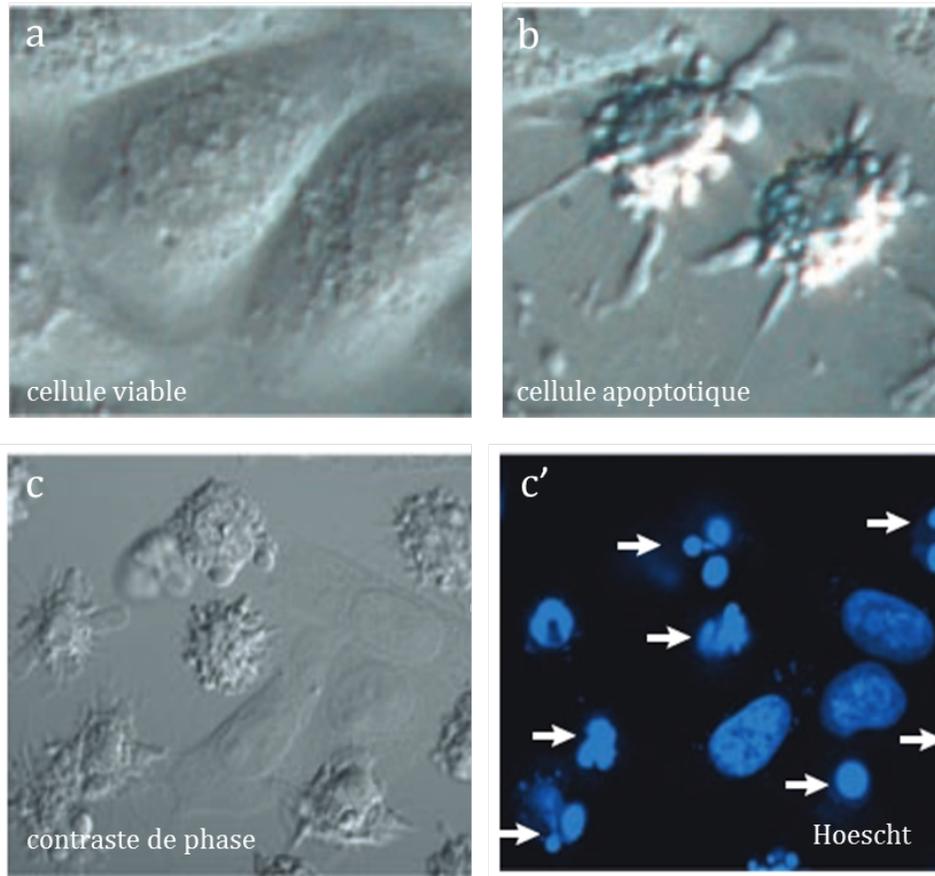
cellules interommatidiales sont bien agencées mais l'apoptose n'est pas complète. Le phénotype causé par le mutant *ec* est très proche de celui résultant du blocage de l'apoptose par p35 (Hay et al. 1994). On note que la mutation *rst* est localisée sur le même bras chromosomique que *irreC*. Une analyse du locus permettra d'isoler le gène *irreC-rst* (Ramos et al. 1993). La protéine IrreC-rst est présente à la jonction entre les IOCs et les cellules pigmentaires primaires. Cette protéine d'adhésion est essentielle à l'alignement des IOCs et aux contacts entre les IOCs et les cellules pigmentaires primaires. Cette organisation servirait à identifier les candidats voués à mourir via la réception des signaux de vie ou de mort (Reiter et al. 1996). Le gène *rst* n'est pas un régulateur de l'apoptose mais est impliqué dans le réarrangement des IOCs, étape nécessaire pour la signalisation apoptotique. Quant au gène *echinus*, il encode une protéase ciblant les protéines ubiquitinylées. Toutefois cette fonction ne serait pas requise pour le rôle d'*ec* dans la régulation de l'apoptose de l'œil. Par ailleurs *ec* n'interagit avec aucun des acteurs connus de l'apoptose à ce stade (Notch, Egf, Hid. . .) (Copeland et al. 2007). Ainsi, l'organisation spatiale des cellules interommatidiales est importante pour assurer l'élimination du nombre correct de cellule. Les cellules mal ordonnées ne recevraient en effet pas les signaux de mort ou de survie correctement.

## 1.2 L'apoptose

### 1.2.1 PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES DE L'APOPTOSE

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, désigne un mécanisme conduisant à la mort et à la destruction de la cellule. Ce processus participe à l'homéostasie cellulaire dans les tissus sains mais aussi pour éliminer certaines cellules dans des cas pathologiques (Lord and Gunawardena 2012). Une cellule mourant par apoptose présente plusieurs caractéristiques morphologiques. Les cellules en apoptose subissent une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN (Wyllie et al. 1981). De plus, la taille de la cellule diminue entraînant une condensation des organelles dans le cytoplasme (Kerr et al. 1974). Enfin une désorganisation du cytosquelette conduit à des troubles de la membrane cytoplasmique appelés blebbing (Ndozangue-Touriguine et al. 2008). Il est important de noter que bien que la membrane cytoplasmique soit affectée, il n'y a aucune perte du cytoplasme dans le milieu extracellulaire, évitant toute réponse immune excessive (Wyllie 1980). En revanche les corps apoptotiques seront au final éliminés par phagocytose (Ballard and Holt 1968) (Fig. 1.6).

L'apoptose est souvent décrite comme ayant vocation à éliminer les cellules malades ou infectées par un virus. Toutefois l'apoptose est aussi un mécanisme crucial intervenant au cours de certaines phases de développement, notamment pour éliminer des tissus transitoires. C'est le cas par exemple de la queue des amphibiens qui est détruite par apoptose (Kerr et al. 1974). De même la sélection clonale des lymphocytes T requiert l'apoptose, ceci afin d'éliminer les lymphocytes reconnaissant des antigènes du soi (Scaffidi et al. 1999). Enfin l'apoptose est requise pour sculpter l'œil de la *Drosophile* en supprimant les cellules surnuméraires entre les ommatidies (voir section précédente).



**Fig. 1.6. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.** Images par microscopie à contraste de phase de cellules HeLa saines (a) comparé à des cellules dont l'apoptose a été induite (b) (daunorubicin). Les caractéristiques typiques d'une cellule mourant par apoptose sont présentes : rétraction de la cellule, phénomène de blebbing au niveau de la membrane. c et c' représentent respectivement des images par contraste de phase de cellules en cultures et le marquage Hoescht (marquant les noyaux) associé. On peut voir que les cellules apoptotiques présentent des noyaux condensés et fragmentés (flèches blanches). Image adaptée de (Taylor et al. 2008).

### 1.2.2 LES CASPASES : LES ACTEURS DE LA MORT

Les caspases sont des protéases très bien conservées au cours de l'évolution. Elles ont la propriété de cliver leur substrat juste après un résidu aspartate d'où leur nom CysteinyI ASPartate-specific proteASE (Alnemri et al. 1996). Chez la Drosophile sept caspases (Dronc, Drice, Dcp-1, Decay, Damm, Dredd, Strica) ont été identifiées contre quatorze chez les mammifères (Sakamaki and Satou 2009, Kumar 2007) (Fig. 1.7). Bien que les caspases aient comme rôle principal l'exécution de l'apoptose, certaines caspases ont des rôles autres que dans l'apoptose. Par exemple certaines caspases peuvent intervenir au cours d'une réponse immunitaire notamment dans le relargage de facteurs pro-inflammatoires (Jamilloux and Henry 2013). Certaines caspases sont aussi requises pour la maturation du sperme (Arama et al. 2006). Toutes les caspases sont exprimées sous forme de zymogènes et doivent être clivées pour être activées. Parmi les caspases régulant la mort cellulaire, deux groupes peuvent être identifiés en fonction de la longueur de leur domaine N-terminal : les caspases effectrices et les caspases initiatrices. Alors que les caspases initiatrices ont un long domaine N-terminal, les caspases effectrices ont un domaine N-terminal plus court. Chez la Drosophile, les caspases effectrices sont DRICE et Dcp-1, les initiatrices sont DREDD, Dronc et Strica.

Les caspases initiatrices sont les caspases les plus en amont. Elles contiennent différents domaines N-terminaux identifiés : le domaine CARD (caspase-recruitment domain), le domaine DED (death effector domain) et le domaine PYD (pyridin domain). Ces domaines contrôlent la régulation des caspases selon l'induction de l'apoptose. Les caspases initiatrices ont la faculté de s'autocliver et d'aller alors activer les caspases effectrices. L'autoactivation des caspases initiatrices nécessite la formation de multimères de ces caspases initiatrices et non de clivages. Le complexe protéique permettant l'activation des caspases initiatrices est l'apoptosome. Chez les mammifères, dans cette structure, la pro-caspase 9 forme des agrégats en association avec Apaf-1 et

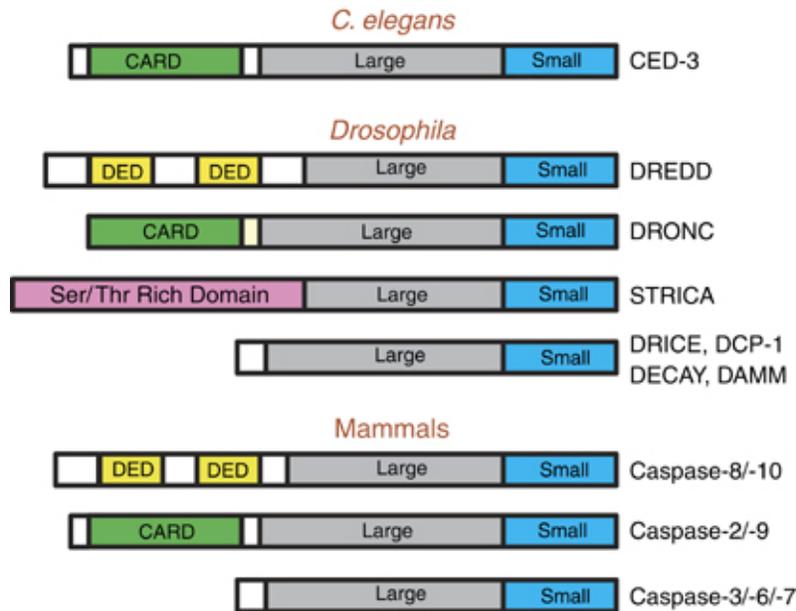
le Cytochrome-c (Cyt-c) (Li et al. 1997). Nous discuterons plus tard quant au rôle du Cytochrome-c chez la mouche. Ensuite, une fois activées, les caspases initiatrices s'autoclivent et clivent alors les caspases effectrices.

Chez les mammifères, les principales caspases initiatrices sont les caspase 8, 9 et 10. Chez la mouche, Dronc est probablement la caspase initiatrice la plus importante. Cette caspase intervient au cours du développement de nombreux tissus comme le cerveau de larve ou la formation de l'oeil (Daish et al. 2004, Chew et al. 2004, Xu et al. 2005). Dredd apparaît plus spécialisée au niveau de la réponse immunitaire (Guntermann and Foley 2011). Quant à Strica, cette caspase peut induire l'apoptose, mais on ne connaît pas encore ces cibles (Doumanis et al. 2001). L'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices est requise pour induire l'apoptose.

Les caspases effectrices interviennent après les caspases initiatrices. D'ailleurs les caspases effectrices ne peuvent pas s'autocliver et nécessitent d'être activées par les caspases initiatrices. Chez les mammifères, il y a trois caspases effectrices : caspases-3, -6 et -7. Chez la mouche, DRICE et Dcp-1 sont les deux caspases effectrices. Il a été montré que Dronc peut cliver et activer Drice (Meier et al. 2000). On sait aussi que Dcp-1 ARNi peut inhiber l'apoptose induite par la surexpression de Dronc (Leulier et al. 2006). Les caspases effectrices DRICE et Dcp-1 agissent ainsi en aval de Dronc.

### 1.2.3 LES CIBLES DES CASPASES EFFECTRICES

Une fois activées, les caspases effectrices vont cliver des substrats cellulaires. Des centaines de substrats ont été identifiés (Lüthi and Martin 2007, Crawford and Wells 2011). Par exemple, la fragmentation de l'ADN observée dans une cellule apoptotique est liée à l'activation d'une DNase (DFF, DNA Fragementation Factor) par la caspase-3. La caspase-3 permet le clivage de DFF, donnant une forme active de cette DNase, et conduisant ainsi à la fragmentation de l'ADN (Liu et al. 1998). Toutefois il n'est pas encore clair



**Fig. 1.7. Les caspases initiatrices et effectrices chez la *Drosophila* et les mammifères.** Seules les caspases ayant une activité démontrée dans l'induction de la mort cellulaire sont présentées. Small (petite) et Large (grande) sous-unités, ainsi que les domaines d'interaction protéiques (comme DED et CARD) sont présentés. La taille des différents domaines est arbitraire et n'est pas proportionnelle à la longueur réelle de ces domaines.

quant aux substrats requis pour la progression de l'apoptose et comment les caspases provoquent les phénotypes observés lors de l'apoptose (condensation de la chromatine, rétraction cellulaire...)(Fig. 1.6).

Toutes nos cellules contiennent la machinerie apoptotique permettant leurs destructions. Cependant, de nombreuses cellules évitent l'activation de l'apoptose pendant de nombreuses années voir même au long de toute une vie dans le cas de certains neurones. C'est pourquoi des programmes très robustes existent pour éviter toute activation aléatoire des caspases.

#### 1.2.4 LES VOIES D'ACTIVATION DE L'APOPTOSE : LES VOIES INTRINSÈQUE ET EXTRINSÈQUE

L'induction des caspases est régulée par deux différentes voies de signalisation chez les mammifères et qui dépendent de l'origine du signal de mort : les voies intrinsèque et extrinsèque. La voie extrinsèque met en jeu des récepteurs de mort de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces récepteurs répondent à des signaux de mort extérieurs. La voie intrinsèque implique les mitochondries et est activée en réponse à des signaux internes tels que le stress oxydatif, les chocs thermiques ou les signaux développementaux.

Ces deux voies d'induction de l'apoptose ont été identifiées aussi chez la mouche :

- Le signal extrinsèque de mort passe par le ligand Eiger, un membre de la famille TNF et son récepteur Wengen. L'induction de cette mort se fait via la voie de signalisation Junk. D'ailleurs la voie JNK est connue pour activer les caspases (Moreno et al. 2002). Toutefois la mort induite par cette voie n'est pas complètement sauvée par l'expression de p35, suggérant que cette mort pourrait être indépendante des caspases (Igaki et al. 2002).
- En réponse à un stress oxydatif, génotoxique ou lors de phase développementale, l'apoptose peut être activée au sein de la cellule via une voie intrinsèque. Chez les mammifères la mitochondrie joue un rôle pivot dans cette voie. Des facteurs clés sont contenus dans la mitochondrie comme le Cytochrome-c ou SMAC/Diablo. Lorsque l'apoptose est induite, ces facteurs sont libérés de la mitochondrie. Le Cyt-c va permettre la multimérisation de Apaf1. Ce complexe va alors recruter la caspase-9, ce qui va former l'apoptosome. La caspase-9 peut alors s'autoactiver et ensuite activer les caspases effectrices (Shi 2008).

Chez la Drosophile le rôle de la mitochondrie est controversé. Les homologues de l'apoptosome ont été identifiés chez la Drosophile, toutefois le

rôle du Cyt-c dans l'activation de l'apoptose est limité. Par exemple l'inactivation du Cyt-c par RNAi ne permet pas d'éviter l'apoptose induite par *grim*, *rpr* ou un stress oxydatif (Zimmermann et al. 2002). Des expériences *in vitro* ont montré aussi que le Cyt-c n'était pas requis à l'activation de DRONC et DRICE. Aussi, l'expression ectopique du Cyt-c n'induit pas les caspases (Dorstyn et al. 2004). Cependant le Cyt-c serait requis de manière tissu-spécifique pour l'activation des caspases et l'élimination des cellules interommatidiales lors du développement de la rétine de *Drosophile* (Mendes et al. 2006). Pour le moment, les mécanismes qui permettent l'activation de l'apoptosome indépendamment du Cyt-c restent à être éclaircis.

Il a été proposé en revanche un modèle chez la mouche qui consisterait à réguler l'activité des caspases par des protéines appelées IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Salvesen and Abrams 2004, Steller 1995). Selon ce modèle, l'apoptosome serait activé de manière constitutive et l'activation des caspases par les IAPs. Ainsi en présence d'un signal apoptotique, les IAPs seraient inhibés résultant en l'activation des caspases.

### 1.2.5 LES IAPs (INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEINS)

Dans les cellules saines, les caspases sont exprimées mais leur activation est inhibée par les protéines IAPs. Ces protéines ont été initialement découvertes chez certains virus. Les virus doivent en effet maintenir une cellule en vie en bloquant l'apoptose pour permettre la dissémination des virions. Par exemple la protéine p35 du baculovirus a cette faculté de bloquer les caspases effectrices (Clem et al. 1996). Chez la *Drosophile*, deux IAPs sont connues : DIAP1 et DIAP2. Par exemple, DIAP1 limite l'apoptose développementale dans l'œil de *Drosophile* (Hay et al. 1995).

Les IAPs bloquent les caspases soit en se fixant à elles, soit en induisant leur dégradation après ubiquitination. En se fixant aux caspases, les IAPs peuvent soit bloquer le clivage du zymogène et donc son activation, soit blo-

quer directement les caspases activées en empêchant le clivage des substrats cibles. Par ailleurs les IAPs ont une activité E3 ubiquitine ligase, permettant de cibler au protéasome des protéines pro-apoptotiques. Par exemple, DIAP1 régule l'apoptose en ubiquitinylant la caspase effectrice Dronc (Wilson et al. 2002). Les niveaux cellulaires des IAPs déterminent les différences de sensibilité aux stimuli induits par l'apoptose. Pour cette raison, la régulation du niveau des IAPs devient un enjeu majeur dans les mécanismes d'apoptose.

### 1.2.6 LES PROTÉINES ANTAGONISTES DES IAPS : LES PROTÉINES RHG

Chez la *Drosophila*, les principaux inducteurs de l'apoptose sont les inhibiteurs des IAPs. On compte trois inhibiteurs des IAPs : *reaper* (*rpr*), *hid*, et *grim* (appelées par la suite protéines RHG). Chacun a la faculté d'activer l'apoptose. L'expression ectopique de *rpr* conduit par exemple à un excès d'apoptose (Nordstrom et al. 1996). Ce phénotype est sauvé par l'expression de p35 ce qui montre que c'est une mort totalement dépendante des caspases. Quatre homologues antagonistes des IAPs ont été décrits chez les mammifères : Smac/Diablo, Omi/HtrA2, Arts et Survivin. Ces quatre protéines peuvent supprimer la liaison des IAPs aux caspases et ainsi induire la mort cellulaire (Salvesen and Duckett 2002).

Chez la *Drosophila*, *reaper*, *hid* et *grim* peuvent inhiber les IAPs de deux manières. Ils peuvent se lier aux IAPs via un domaine IBM (IAPs binding motif), ce qui entraîne la titration des IAPs qui ne peuvent alors plus inhiber les caspases. Ce domaine IBM est retrouvé chez les mammifères et a permis d'identifier les homologues mammifères des protéines RHG. Autrement, les protéines RHG peuvent promouvoir l'ubiquitination des IAPs, ceci via leur domaine RING. L'ubiquitination des IAPs conduit à leur dégradation. Ainsi, Rpr induit l'autoubiquitination de DIAP1 qui est ensuite dégradé (Ryoo et al. 2002). En inhibant les IAPs, les protéines RHG suppriment l'inhibition des

IAPs sur les caspases, conduisant à l'apoptose. Ainsi par exemple, la surexpression de *hid* induit l'activation de DCP-1 grâce à l'inhibition de DIAP1 (Wang et al. 1999). Une étude a enfin montré qu'un mécanisme par lequel les protéines RHG pourraient diminuer le niveau des IAPs serait d'induire une suppression générale de la traduction des protéines (Yoo et al. 2002).

Les protéines RHG ont par conséquent plusieurs rôles dans la régulation de l'apoptose développementale. L'inactivation d'un des trois membres des protéines RHG supprime partiellement l'apoptose (Zhou et al. 1997, Grether et al. 1995). Ce qui montre que les protéines RHG ont des rôles redondants. Cependant dans certains contextes certains RHG peuvent être spécifiquement impliqués. Par exemple, dans l'œil de *Drosophila*, la mutation de *hid* inhibe totalement la mort développementale dans la rétine. Aux stades pupaux les caspases sont complètement inactivées, ce qui conduit à la présence de cellules interommatidiales en excès (Yu et al. 2002). Au contraire *rpr* et *grim* sont impliqués dans la régulation de la mort au cours du développement du système nerveux central au cours du développement larvaire. Les mouches mutantes pour *rpr* ont un système nerveux beaucoup plus large dû à une absence de mort de certains neuroblastes (Peterson et al. 2002). Les protéines RHG sont ainsi des régulateurs de l'apoptose ayant dans certains contextes des rôles spécifiques.

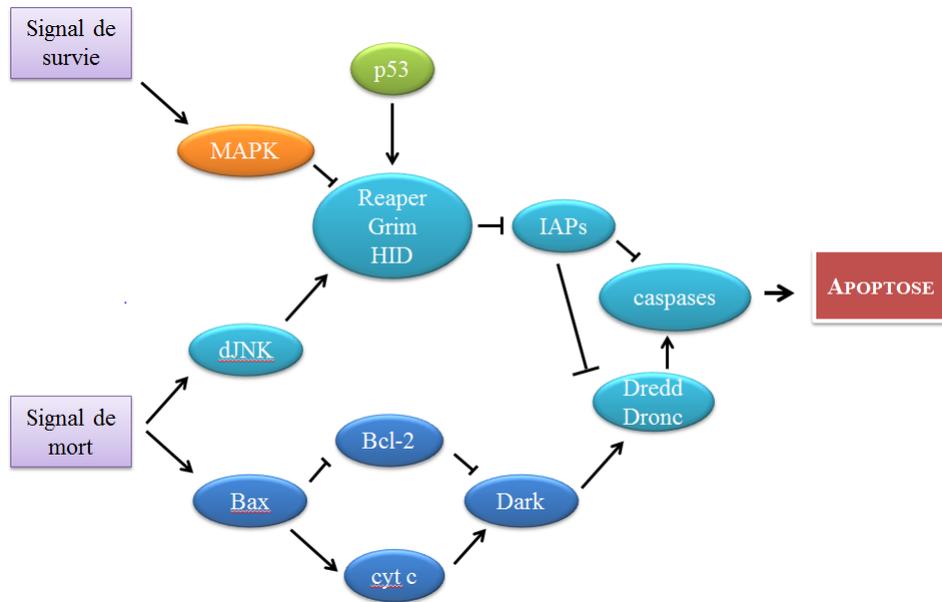
### 1.2.7 LA RÉGULATION DES PROTÉINES RHG

Les protéines RHG interviennent en aval dans le contrôle de l'apoptose. Il est ainsi important de comprendre comment elles sont régulées. L'activité des protéines RHG est régulée par leur localisation dans la cellule, leur dégradation ou encore au niveau transcriptionnel. Chez les mammifères, l'activation des protéines RHG nécessitent leurs imports dans la mitochondrie afin de cliver leur extrémité N-terminal et exposant ainsi leur domaine IBM (IAP-Binding Motif). Chez la *Drosophila*, tout comme chez les mammifères, les

protéines RHG peuvent être localisées à la mitochondrie après un stimulus apoptotique (Abdelwahid et al. 2007, Freel et al. 2008, Clavería et al. 1998). Cependant, le rôle de la localisation mitochondriale des protéines RHG chez la Drosophile dans leur fonction pro-apoptotique reste débattu. Tout d'abord une étude sur la mort de la cellule gliale au cours du développement des soies montre que Reaper et Grim doivent être localisés à la mitochondrie pour activer la mort. La surexpression de *grim* par ailleurs entraîne la fragmentation de la mitochondrie et la mort de la cellule (Wu et al. 2010). De plus *rpr* nécessite la présence de Hid pour être recruté à la membrane mitochondriale et activer la mort (Sandu et al. 2010). Plus important, affecter les mécanismes de fission mitochondriale inhibe la mort induite par *rpr* et *hid* (Abdelwahid et al. 2007, Goyal et al. 2007). *Rpr* régule la mort cellulaire en intervenant directement sur la fusion mitochondriale (Thomenius et al. 2011). Ces résultats suggèrent que les protéines RHG nécessitent d'être localisées à la mitochondrie pour activer la mort.

D'un autre côté, des études ont montré que la localisation mitochondriale des protéines RHG n'était pas nécessaire à leur activité pro-apoptotique. Une étude a ainsi montré que *rpr* pourrait activer l'apoptose seulement en dégradant les IAPs et sans perméabilisation de la mitochondrie ou relargage du Cytochrome-c (Tait et al. 2004). Ainsi le possible rôle de la localisation mitochondriale de Rpr dans la régulation de l'apoptose chez les insectes reste débattu. Par ailleurs, il s'avère que les protéines RHG sont régulées transcriptionnellement, indépendamment de la mitochondrie. Par exemple, Rpr et Hid contiennent un site de fixation p53 dans leur promoteur. Il a été montré que l'expression de Rpr et Hid suite à une irradiation dépendait de p53 (Brodsky et al. 2004, Sogame et al. 2003, Dichtel-Danjoy et al. 2013). Il s'avère en tout cas que les mécanismes permettant la régulation des protéines RHG ne sont pas parfaitement conservés au cours de l'évolution. Chez les mammifères la localisation mitochondriale des protéines RHG est centrale, alors que chez

les insectes il semble que les protéines RHG soient régulées transcriptionnellement (Fig. 1.8).



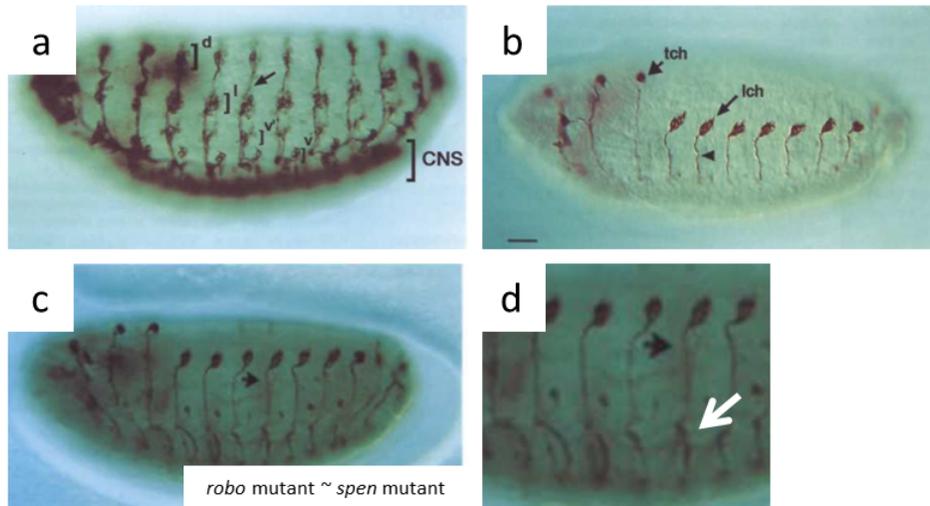
**Fig. 1.8. L'apoptose chez la Drosophile.** La mort cellulaire chez la Drosophile implique trois gènes inducteurs de mort : *hid*, *rpr* et *grim*. Ces gènes sont régulés par des signaux développementaux ou des stress environnementaux. *Hid* est négativement régulé par la voie Ras1/MAPK (signal de survie EGFR) alors que *Rpr* est régulé par p53. Eiger (signal de mort), peut aussi activer la mort en se fixant à wengen (récepteur Tumor Necrosis Factor), ceci via la voie JNK (Jun N-terminal kinase). *Rpr*, *Hid* et *Grim* contrôlent l'activation des caspases par différents moyens : la formation d'un apoptosome contenant notamment DARK (*Drosophila* Apaf-1 Related Killer), l'inhibition d'inhibiteurs de caspases d'IAPs (*Drosophila* Inhibitor of Apoptosis), et le relarguage du Cytochrome-c. La Drosophile comprend deux membres de la famille Bcl-2 : Bax/Debcl et Bcl-2/Bufy. Bax induit la mort indépendamment des protéines RHG. Bcl-2 interagit physiquement avec Bax pour bloquer l'apoptose. Sept caspases sont connues chez la Drosophile (Dcp1, Dredd, Drice, Dronc, DEWAY, DAMM et Strica. Drice et Dcp1 sont les caspases effectrices les plus abondantes et ont des séquences proches de leur homologue caspase 3 chez les mammifères. Dredd et Dronc sont les deux caspases initiatrices. Les flèches indiquent les interactions stimulatrices alors que les barres-T indiquent des interactions inhibitrices.

## 1.3 *split ends* (*spen*)

### 1.3.1 LA DÉCOUVERTE DU GÈNE *split ends* (*spen*)

La première mutation affectant le gène *spen* a été identifiée en 1995 dans un crible sur des gènes requis pour la régulation de la longueur et la fasciculation des axones dans le système nerveux périphérique (SNP) de l'embryon de *Drosophila* (Kolodziej et al. 1995). On définit la fasciculation comme le processus au cours duquel les neurones qui se développent ensemble s'associent en se chevauchant pour atteindre leurs cibles. Dans un embryon sauvage, les neurones latéraux chordotonaux (lch) sont des neurones sensoriels au nombre de 5 par groupe et situés dans chaque hémisegment abdominal. Un hémisegment est une moitié bilatérale d'un segment embryonnaire et est l'unité développementale du système nerveux. Au cours du développement du SNP, ces neurones projettent des axones qui vont rejoindre leurs cibles dans le système nerveux central (SNC). Dans ce contexte, une perte de fonction du gène *spen* conduit à des défauts d'innervation, un nombre réduit de neurones lch et une défasciculation des axones des neurones lch, d'où le nom de *split-ends* (fourche...). Dans cette étude, *spen* a uniquement été identifié dans le crible, aucune analyse détaillée de ses fonctions moléculaires n'a été réalisée (Fig. 1.9).

Des travaux plus récents ont montré qu'une dérégulation de la voie de signalisation Notch serait à l'origine du phénotype des neurones latéraux chordotonaux (Kuang et al. 2000). La mise en place des groupes de neurones chordotonaux se fait en effet par inhibition latérale via la voie Notch à partir d'un groupe de cellules précurseur exprimant le gène pro-neuronal *atonal*. Ces trois précurseurs sont isolés du tissu par inhibition latérale, se différencient en neurones puis vont alors recruter les deux derniers neurones à partir de tissus ectodermiques adjacents (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Dans des embryons mutants pour *spen*, le bon nombre de neurones chordo-



**Fig. 1.9. L'inactivation de *spen* affecte la fasciculation des axones sensoriels dans l'embryon de *Drosophile*.**(a) Vue latérale des groupes de neurones sensoriels dans un embryon au stade 16. Les neurones sont marqués avec un anticorps souris 22c10. d= neurones dorsaux, l=neurones latéraux, v et v'=neurones ventraux. CNS=système nerveux central. La flèche indique les nerfs intersegmentaux. (b) embryon au stade 16 marqué avec un anticorps souris 49C4. Cet anticorps marque 4 des 5 neurones latéraux chordotonaux (lch). (tch= neurones thoraciques chordotonaux). La tête de flèche indique l'axone qui émane des groupes de neurones pour rejoindre ventralement le CNS. (c) Défasciculation observé dans un embryon homozygote mutant pour le gène *robo*. Le phénotype est sensiblement le même pour un mutant *spen*. On note que pour les mutants *spen* ou *robo*, les axones bien que défasciculés finissent par atteindre leur cible (CNS) dans 100% des cas. (d) est un agrandissement de (c) montrant (flèche blanche) la terminaison scindée en deux (split-ends). Dans cette figure, la partie antérieure de l'embryon est à gauche et la partie dorsale en haut. La barre d'erreur (b) représente 25  $\mu$  m. Images de (Kolodziej et al. 1995).

tonaux n'est pas respecté dans chaque groupe de neurones. Certains groupes ont plus de cinq précurseurs, d'autres moins (Kuang et al. 2000). Ces aberrations en terme de nombre de cellule peuvent être expliquées soit par un défaut lors du recrutement des précurseurs, soit par un défaut de l'inhibition latérale de Notch (voir chapitre Notch). La dernière hypothèse est confortée par la diminution de l'expression du facteur de transcription spécifique de la voie Notch, *suppressor of hairless* [Su(H)]. Dans ce contexte, *spen* apparaît essentiel au maintien positif de l'activité de la voie Notch.

Par ailleurs, les cellules gliales sont nécessaires dans l'embryon pour la mise en place des systèmes nerveux central et périphérique en particulier au cours des processus de guidance axonale. En condition normale, les cellules gliales migrent à des places précises pour assurer ce rôle. Dans un mutant *spen*, les cellules gliales ne migrent pas correctement et ont des problèmes de survie. Il en résulte un défaut du nombre de cellules gliales associé à des problèmes de guidance axonale plus tard au cours du développement (Chen and Rebay 2000).

### 1.3.2 LES RÔLES PLÉIOTROPES DE *spen*

*Spen* est connu comme intervenant dans de nombreux processus biologiques au cours du développement. Ainsi l'étude de ces différents rôles permet de mieux cerner la fonction de cette protéine. Toutefois le rôle pléiotrope de *spen* en plus de son rôle dans de nombreuses voies de signalisation rend son étude délicate.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de *spen* dans la régulation de la voie EGF (MAPK). Des allèles de *spen* ont été trouvés lors d'un crible visant à identifier des acteurs de la voie EGF (Rebay et al. 2000). Comme nous le verrons dans la partie ci-après sur le rôle de *spen* dans le développement de la rétine, des mutations de *spen* modifient le phénotype induit par la surexpression d'une forme activée de *yan*, un facteur de transcription

de la voie EGF. La surexpression de *yan*, via le driver *sevenless*-GAL4 (*sev*-GAL4), donne un aspect rugueux à l'œil de Drosophile. *Sevenless* est exprimé dans les photorécepteurs 3, 4 et 7 ainsi que dans les cellules cônes. Plusieurs allèles de *spen* aggravent ce phénotype suggérant un rôle activateur de *spen* sur la voie EGF (Chen and Rebay 2000). Par la suite, une étude a confirmé le rôle de régulateur positif de *spen* de la voie EGF au cours du développement de l'œil de Drosophile (Doroquez et al. 2007). Cependant des allèles de *spen* sont apparus comme aggravant le phénotype œil rugueux de mouches exprimant une forme active de la kinase RAF (*sev*-Raf<sup>torY9</sup>) (Dickson et al. 1992; 1996). Cela indiquerait que *spen* pourrait être un régulateur négatif de la voie EGF dans certains contextes, même si la nature de cette interaction reste peu claire.

Des allèles de *spen* ont été identifiés dans plusieurs cribles sur des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Des mutations de *spen* aggravent le phénotype œil rugueux induit par la surexpression de dE2F et dDP avec le driver GMR-GAL4 (GMR-dE2FdDP). La surexpression de ces protéines entraîne un excès de division cellulaire à cause de l'induction d'entrée en phase S (synthèse) du cycle cellulaire (Du et al. 1996, Staehling-Hampton et al. 1999). Par ailleurs, des mutations affectant le gène *spen* ont été identifiées dans un autre crible chez la Drosophile, cette fois en exprimant ectopiquement dans la rétine la cycline-E (*sev*-CycE) (Lane et al. 2000). Ces trois études suggèrent que *spen* pourrait intervenir dans la régulation du cycle cellulaire, même si uniquement des liens génétiques ont été établis. Il peut alternativement être proposé que *spen* régulerait le nombre correct de cellules via un rôle dans la mort cellulaire, ce qui conduirait à des phénotypes similaires à ceux décrits précédemment.

*Spn* est aussi requis durant le développement de l'embryon. Un crible a en effet montré que *spn* interagissait avec le gène homéotique *deformed* (*dfd*). *Spn* permet le développement de sclérite (les sclérites sont des plaques

en chitine formant l'exosquelette des arthropodes) au niveau de la tête et empêche le développement de sclérites au niveau du thorax (Gellon et al. 1997, Wiellette et al. 1999). Une étude plus tard montrera que les défauts épithéliaux (sclérite) trouvés dans les mutants *spen* proviennent de la réparation suite à des défauts dans l'épithélium (Mace et al. 2005). On note qu'en réponse à ces blessures dans les embryons mutants pour *spen* la voie des MAPK est activée.

Enfin, une étude chez la Drosophile a montré par analyse clonale que *spen* est aussi impliqué dans la polarité planaire et dans la formation et le positionnement des soies (Mace and Tugores 2004).

L'ensemble de ces travaux montrent que la protéine Spen est impliquée dans de nombreux et différents processus biologiques. Nous allons décrire plus en détail les travaux autour du rôle de cette protéine dans le développement de l'œil.

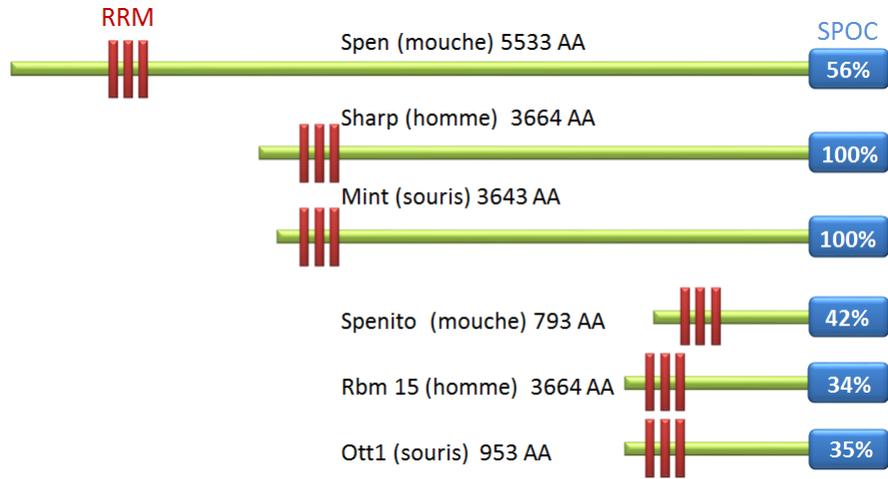
### 1.3.3 RÔLE DE *spen* DANS LES ÉTAPES PRÉCOCES DU DÉVELOPPEMENT DE L'ŒIL DE DROSOPHILE

Alors que plusieurs études dans les années 1990 ont mis en évidence des rôles de *spen* au cours de l'embryogenèse de la Drosophile, l'implication de *spen* dans le développement de l'œil de Drosophile a été découverte seulement en 2000. Comme nous l'avons mentionné précédemment, un crible visant à identifier des gènes agissant en aval de la voie de signalisation des MAPK (Rebay et al. 2000) a en effet montré le rôle putatif de *spen* dans la différenciation des photorécepteurs au cours du développement de la rétine. La voie RTK/Ras/MAPK régule un large panel de processus développementaux comme la différenciation cellulaire des photorécepteurs (PR) et des cellules cônes de la rétine (van der Geer et al. 1994). Des acteurs requis pour l'activation de RAS ou activant les MAPK ont été découverts dans de nombreux cribles, mais peu de gènes en aval de cette voie son connus. Dans cette pre-

mière étude, les auteurs ont surexprimé une forme activée de *yan*, un antagoniste de la voie RTK/Ras/MAPK et agissant en aval des MAPK, dans l'œil de *Drosophila* à l'aide du driver *sevenless-GAL4*. Yan étant essentiel à la différenciation de certains photorécepteurs et des cellules cônes, la surexpression d'une forme activée de ce gène dans l'œil donne un phénotype œil rugueux. La mutation de *spen* aggrave le phénotype œil rugueux, suggérant que *spen* est un potentiel activateur de la voie des MAPK (Rebay et al. 2000). Plus tard, un autre crible a montré que *spen* interagissait génétiquement avec le gène *corkscrew*, protéine connue pour transduire les signaux générés par l'activation des MAPK (Firth et al. 2000).

En parallèle de la voie des MAPK, la voie de signalisation Wingless (Wg) est requise pour modérer l'initiation et la progression du sillon morphogénétique. Ainsi, dans la larve, au cours du développement de l'œil, *dpp* (décapentaplégique) inhibe l'expression et la diffusion de Wg. Wg est exprimé aux bords dorso et ventraux du disque d'œil où il inhibe l'initiation du sillon morphogénétique (Ma and Moses 1995, Treisman and Rubin 1995). Lorsque *dpp* est muté, le domaine wingless est fortement élargi résultant en une inhibition du sillon morphogénétique et une réduction de la différenciation des photorécepteurs. L'œil adulte obtenu est ainsi beaucoup plus petit qu'un œil sauvage (Chanut and Heberlein 1997). Ce phénotype de l'œil est en partie corrigé en réduisant l'activation de la voie Wg (Treisman and Rubin 1995). Une étude a montré qu'inhiber *spen* (même en inactivant une seule copie du gène (mouche hétérozygote) restaurait la différenciation des photorécepteurs et le petit œil d'un mutant *dpp* (Lin 2003). Ces études suggèrent que *spen* est un activateur de la voie Wingless au cours du développement de l'œil.

Plusieurs études ont montré que l'expression de dominant négatifs de *spen* (domaine SPOC seul, ce domaine est décrit par la suite) montrait des phénotypes plus forts que des mutants *spen* (Lin 2003, Chen and Rebay 2000). Cela indiquerait que *spen* pourrait avoir un partenaire génétique redondant



**Fig. 1.10. Représentation schématique des membres de la famille de *spen*.** La taille des schémas est proportionnelle à la taille prédite des protéines. Chaque membre possède un domaine RRM (RNA Recognition motif) en extrémité N-terminal et un domaine SPOC (Spen Paralogue Orthologue C-terminus). Les pourcentages indiquent le degré de conservation des domaines SPOC comparé à la protéine SHARp (humaine). On distingue clairement les deux sous-classes “grande” et “petite” de la famille de *spen*.

partageant le même domaine fonctionnel SPOC. Dans la famille des protéines à domaine SPOC, il existe deux sous-classes en fonction de la taille des protéines : la Grande sous-classe (longues protéines) et la Petite sous-classe (courtes protéines). La Grande sous-classe comprend Spen chez la mouche, Sharp chez l’homme et Mint chez la souris. La Petite sous-classe comprend Spenito chez la mouche, et Ott1 chez l’homme et la souris (Fig. 1.10).

Chez la *Drosophila* la surexpression de *spenito* perturbe l’organisation de l’œil de *Drosophila* avec un effet décrit tour à tour antagoniste et agoniste de *spen*. En effet, la surexpression de *nito* donne le même phénotype que l’expression d’un dominant négatif de *spen* (Jemc and Rebay 2006). Cependant un autre groupe a montré que *spenito* pouvait agir en synergie avec *spen* dans le disque d’œil pour activer la voie Wingless (Chang et al. 2008). En conclusion, nous sommes pour le moment loin d’avoir compris les interactions et les rôles des liens entre *spen* et *spenito*.

Pour terminer la description des résultats sur les relations entre *spen* et le développement de l'œil de *Drosophila*, une équipe a étudié et analysé la complexe relation entre *spen*, et les voies Notch et EGF au cours du développement larvaire de l'œil (Doroquez et al. 2007). En analysant des rapporteurs de ces deux voies en particulier dans des tissus mutants pour *spen*, les auteurs ont montré que *spen* antagonise la voie Notch et favoriserait l'activité de la voie EGF. Les voies Notch et EGF étant centrales pour la régulation du développement de l'œil, *spen* aurait comme fonction d'intégrer les signaux venant de ces deux voies afin d'assurer un développement correct de l'œil.

#### 1.3.4 STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE SPEN

Chez la *Drosophila*, le locus de *spen* s'étend sur plus de 44kb et est prédit pour coder 3 longues isoformes, provenant de différents sites d'épissage. En théorie, ces trois isoformes sont traduites chacune en protéine de plus de 5400 acides aminés et font en moyenne 595 kDa (Fig. 1.10).

Chez la *Drosophila*, *spen* code pour une protéine ubiquitaire et nucléaire chez l'embryon et la larve (Kuang et al. 2000, Chen and Rebay 2000, Wielliet et al. 1999). *Spen* fait partie d'une grande famille de protéines parfaitement bien conservées du nématode jusqu'à l'homme. Chaque membre de cette famille contient deux domaines fonctionnels caractéristiques : un domaine SPOC (Spen Paralogue Ortholog C-terminus) en C-terminal, et trois domaines RRM (RNA-Recognition Motifs) en tandem en extrémité N-terminal. Plusieurs laboratoires ont tenté de comprendre le rôle exact de ces domaines, mais leur fonction reste encore incertaine.

#### **Le domaine RRM**

Le domaine RRM est impliqué dans de nombreux processus biologiques impliquant l'ARN : stabilité, épissage, transport, traduction (Siomi and Drey-

fuss 1997). Le domaine RRM est un domaine liant l'ADN très conservé d'environ 22 acides aminés (Burd and Dreyfuss 1994). Chez la Drosophile la présence de domaine RRM n'est pas spécifique à la famille du gène *spen*. Par exemple, l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'oocyte nécessite un signal de la protéine contenant un domaine RRM squid afin de spécifier la localisation de l'ARNm codant pour le ligand de EGFR *gurken* (Kelley 1993, Matunis et al. 1994). Un autre exemple de protéine à RRM est la protéine Elav (embryonic lethal abnormal visual system). Cette dernière est exprimée dans tous les neurones de la Drosophile et est requise pour déterminer et maintenir l'identité neuronale (Robinow and White 1991). Chez la souris le domaine RRM des homologues de *spen* semble avoir un rôle beaucoup plus direct dans la régulation de la transcription. Ainsi Mint (Msx2-Interacting Nuclear Target) se lie à des séquences ADN précises. Par exemple Mint se lie au promoteur de l'ostéocalcine pour directement réguler sa transcription (Newberry et al. 1999).

Cependant ce domaine ne se limite pas aux simples interactions avec l'ARN. Le domaine RRM peut également induire des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN (Samuels et al. 1998, Maris et al. 2005). Ainsi, l'orthologue humain de *spen*, SHARP (SMRT/HDAC1 associated repressor protein) et son paralogue Ott1 (One Twenty-Two 1)/Rbm15 (RNA-Binding protein 15) peuvent interagir avec des complexes du spliceosome dont la fonction est de dégrader les protéines (Zhou et al. 2002). Ce qui suggère un rôle de cette famille de protéine à domaine RRM dans l'épissage. En outre, le domaine SPOC semble lui aussi pouvoir jouer un rôle dans l'épissage. Ainsi, une autre protéine humaine orthologue de *spen*, Ott3 est un facteur qui agit après la transcription pour empêcher l'accumulation d'ARN épissés dans un contexte d'infection par le virus oncogène EBV (Hiriart et al. 2005). Cette action se fait par l'interaction entre le domaine SPOC de Ott3 et le domaine N-terminal de EB2, une protéine du virus EBV. Dans la même étude, les

auteurs ont également montré que SHARP et Ott1 peuvent se lier à EB2. Toutefois rien n'est décrit quant à l'implication du domaine RRM dans ce cas.

Pour finir, le domaine RRM ne semble pas être limité à interagir avec les processus conventionnels liés à l'ARN. Le domaine RRM de SHARP interagit par exemple avec un ARN non codant appelé SRA, un activateur des récepteurs stéroïde. SRA active la voie des hormones stéroïdes en se liant aux activateurs des récepteurs (Hubé et al. 2011). Sharp séquestre ce co-activateur limitant ainsi le signal des hormones stéroïdes.

### **Le domaine SPOC**

Le domaine SPOC est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution. Toujours placé à l'extrémité C-terminal de la protéine, il comporte 168 acides aminés. La protéine humaine SHARP a été d'abord identifiée dans un crible double-hybride utilisant SMRT (Steroid mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) comme appât, d'où son nom SHARP (SMRT/HDAC1 Associated Repressor Protein). L'interaction entre le domaine SHARP et complexe SMRT/NCoR a été validée par cristallographie (Ariyoshi and Schwabe 2003). SHARP est décrit comme un régulateur transcriptionnel interagissant directement avec SMRT mais aussi cinq membres du complexe NuRD (un complexe de désacétylation de la chromatine) incluant HDAC1 et HDAC2 (Shi et al. 2001). Les expériences menées dans cette étude ont permis de mettre en évidence un modèle d'action de SHARP quant à la régulation des récepteurs à œstrogène. Ils ont montré que SHARP contenait un domaine RID (receptor interaction domain) qui pouvait fixer le récepteur à hormone. Ainsi, en l'absence de ligand (œstrogène), SHARP se lie au récepteur et recrute ainsi le complexe NuRD (désacétylation de l'ADN), ce qui empêche toute transcription de gènes cibles. En présence de ligand, SHARP n'est plus lié au récepteur, libérant ainsi la chromatine.

Le même genre de scénario est aussi rencontré chez le nématode *c. elegans*. Le récepteur nucléaire DAF-12, connu pour son rôle dans le métabolisme des lipides ou le vieillissement est régulé par DIN-1S, un membre de la famille de *spen* (Ludewig et al. 2004). Toutefois les protéines de la famille de *spen* ne se lient pas uniquement à des récepteurs nucléaires. Par exemple Mint (homologue de *spen* chez la souris) réprime la trans-activation du collagène de type II via son interaction avec CRYBP1 (Yang et al. 2005). Un autre exemple des plus importants est l'interaction entre les homologues de *spen* et les membres de la voie Notch. Chez la souris, MINT interagit avec RBP-J et empêche par compétition la fixation du domaine Notch<sup>intra</sup> (voir section 1.4). Cela a pour conséquence de bloquer l'activation de la voie Notch (Kuroda et al. 2003). L'homologue humain de *spen*, Sharp interagit avec RBP-J(k) *in vitro*. Sharp serait ainsi un membre du complexe de répression de la voie Notch recruté par RBP-J(k) (Oswald 2002).

Pour finir, certaines études mettent en avant une possible homodimérisation des domaines SPOC. Chez la souris, une étude montre que les domaines C-terminaux de Mint interagissent *in vitro* et *in vivo*. La surexpression du domaine SPOC seul agit comme un dominant négatif et empêche l'inactivation transcriptionnelle de Notch (Li et al. 2005). Par ailleurs une étude a montré que SHARP pouvait être phosphorylé par Pak1 (p21-activated kinase 1), une sérine/thréonine kinase proche du domaine SPOC et que cette phosphorylation était importante pour la répression par SHARP des cibles de la voie Notch, peut-être via la formation de monomères (Vadlamudi et al. 2005).

### 1.3.5 LA FAMILLE DE *spen* ET LES PROBLÈMES DÉVELOPPEMENTAUX

*Spn* est un régulateur centrale de plusieurs voies de signalisation. Il n'est alors pas surprenant que des défauts au niveau de ce gène conduisent à des troubles développementaux ou même des pathologies. L'inactivation de *spn*

conduit à de graves problèmes développementaux à cause de défauts dans la régulation de la voie Notch. Les homologues de *spen* chez l'homme et la souris, Sharp et Mint, respectivement modifient l'état d'activation de transcription des cibles de Notch en agissant sur un facteur de transcription. En effet, Sharp et Mint interagissent tous les deux avec RBP-J(k), l'orthologue chez les vertébrés de Su(H) (suppressor of hairless) (Kuroda et al. 2003, Oswald 2002). RBP-J(k) est un facteur de transcription ayant deux fonctions : il peut recruter un complexe de répression limitant l'activation transcriptionnelle de Notch, ou recruter un complexe activateur dans le cas où la voie Notch est activée (i.e. présence de la forme intracellulaire de Notch) (Tanigaki and Honjo 2010). A l'heure actuelle, on considère que Mint et Sharp aide à la répression de Notch en recrutant le complexe CtBP/CtIP sur RBP-J(k). La régulation au niveau de la transcription est un passage clé pour réguler tous les signaux venant des différentes voies de signalisation au cours du développement. Ainsi, la souris KO pour Mint meurt à l'état embryonnaire (Kuroda et al. 2003). Les phénotypes associés ont été attribués à des défauts de la voie Notch : problèmes musculaires et cardiaques (Kuroda et al. 2003) et des défauts immunitaires (Tsuji et al. 2007). On note que des phénotypes similaires sont observés chez des souris mutantes pour Notch (McCright et al. 2001).

Chez la Drosophile *spen* est un régulateur positif de la voie Wingless (Lin 2003). Des dérégulations de la voie Wg/Wnt sont à la source de nombreux cancers, faisant de cette voie une cible dans la recherche de traitement contre cette maladie (Jamieson et al. 2014). Chez l'Homme certains cancers sont le résultat de l'activation constitutive du facteur de transcription TCF de la voie Wnt suite à la stabilisation de son activateur la  $\beta$ -catenin (Polakis 2000). En effet, l'activation de la voie Wnt entraîne la stabilisation de la  $\beta$ -catenin qui peut alors entrer dans le noyau pour activer TCF. Dans des cas de cancers, la suractivation de gènes cibles de TCF suite à la stabilisation de la

$\beta$ -catenin sont associés à des niveaux élevés de Sharp. L'implication de Sharp dans la progression du cancer a été validé en inhibant Sharp par ARNi (Feng et al. 2007). Enfin des études ont mis en avant un rôle de Sharp/mint et de Ott1 dans le contrôle de l'hématopoïèse, ceci via le contrôle de la voie Notch (Nagel et al. 2009, Raffel et al. 2007). Le contrôle des voies de signalisation régulant l'hématopoïèse développementale par les membres de la famille de *spen* conduisent à des formes de leucémie.

Les membres de la famille de *spen* contrôlent plusieurs voies de signalisation développementales et bien que n'importe quelle dérégulation dans l'activité de ces gènes peut causer une pathologie grave.

## 1.4 La voie de signalisation Notch

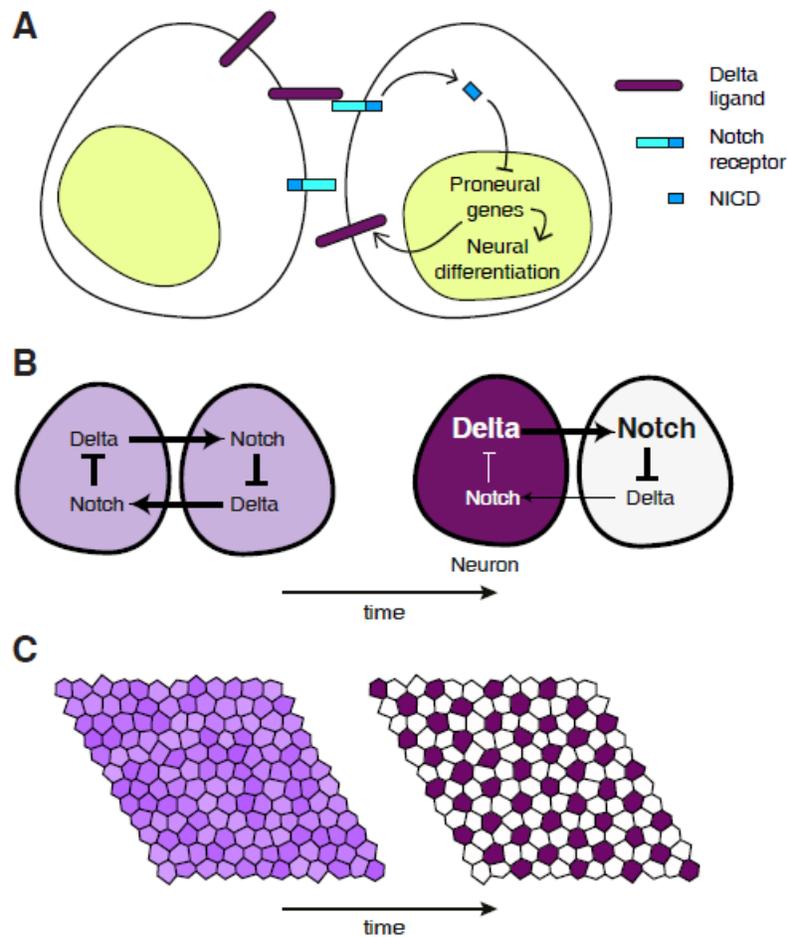
### 1.4.1 LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH CHEZ LA DROSOPHILE

La voie Notch a été identifiée génétiquement il y a presque 100 ans par Morgan grâce une mouche mutantes présentant des “notches” (encoches) dans ses ailes. La voie de signalisation Notch fait partie des voies canoniques développementales très conservées et impliquées dans de nombreux processus de développement chez les métazoaires. En particulier, la voie Notch contrôle le “destin cellulaire” (cell fate) via un processus d’inhibition latérale (Cabrera 1990). L’inhibition latérale est la capacité qu’à une cellule d’inhiber la différenciation des cellules l’entourant au sein d’un groupe (Fig. 1.11).

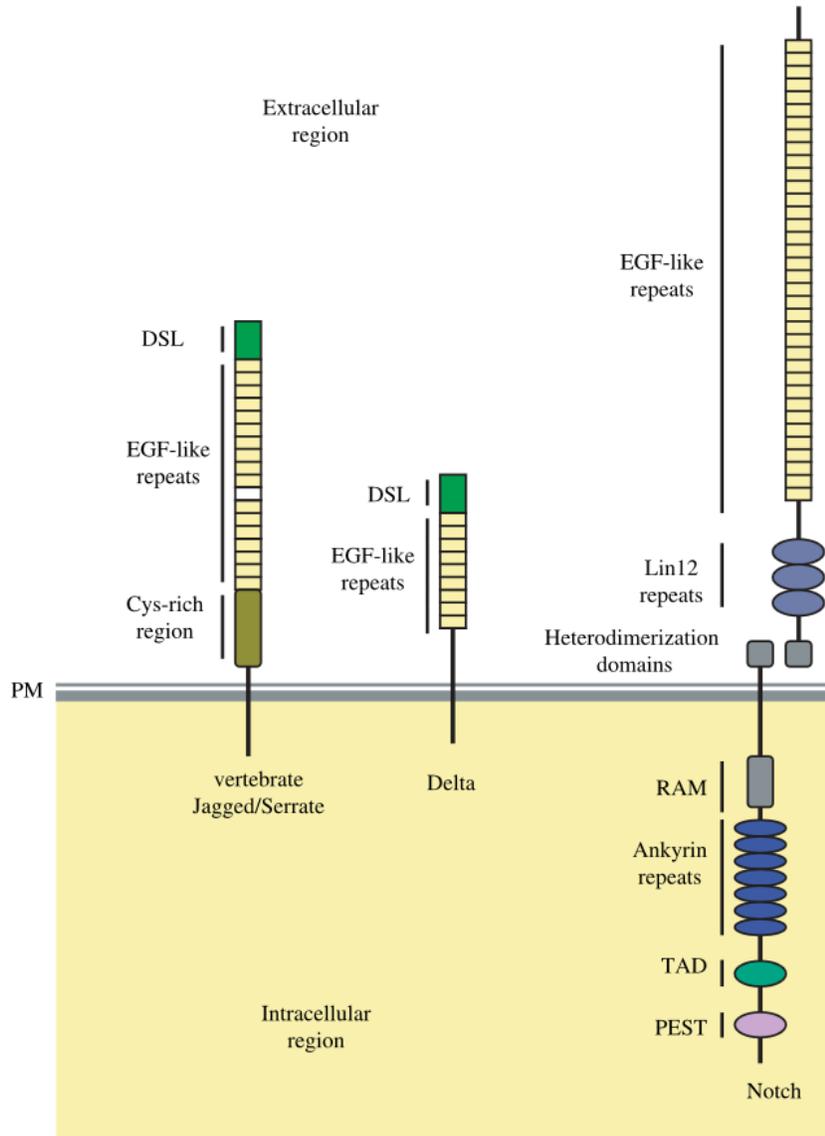
La voie Notch est aussi associée au contrôle de la neurogénèse, de la morphogénèse, de la survie, de la prolifération ou encore de l’établissement de la polarité planaire de l’œil de *Drosophila* (Lai 2004).

Globalement, l’activation de la voie Notch est induite par la fixation d’un ligand sur le récepteur Notch. Il en résulte un clivage protéolytique de ce récepteur libérant ainsi le domaine intracellulaire de la protéine (Notch<sup>intra</sup>). Ce domaine intracellulaire sera ensuite transloqué dans le noyau afin d’activer les gènes cibles de la voie en se liant à un facteur de transcription lié à l’ADN. Alors que l’activation de cette voie est très linéaire, les mécanismes nucléaires permettant l’expression des gènes cibles se révèle être très complexes. L’ensemble des étapes de la voie sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Dans la majorité des cas l’activation de la voie Notch se fait en trans, c’est-à-dire que la cellule exprimant le ligand du récepteur Notch est différente de celle recevant le signal. Dans certains cas Notch peut être activé en cis, c’est à dire que le ligand et le récepteur sont produits par la même cellule. Cette activation de Notch sur la même cellule permettrait de réguler le signal émanant (Schweisguth 2004, Fig. 1.12).



**Fig. 1.11. Schéma d'inhibition latérale au sein d'un groupe de neurones en différenciation.** A partir d'un groupe de neurones (proneural cluster), une des cellules va se différencier en exprimant plus de Delta (le ligand de Notch) que les autres (B). Les cellules voisines activeront alors la voie Notch qui bloquera les gènes de différenciations en neurone. NICD=Notch intracellular domain (A). Au final une seule cellule au sein de chaque cluster sera différenciée (C). Image adaptée de (Formosa-Jordan et al. 2013).



**Fig. 1.12. Structure de Notch et ses ligands.** Delta et Serrate possèdent des domaines DSL permettant l'interaction avec le récepteur Notch. Les répétitions EGF-like de Notch permettent d'interagir avec les ligands. Dans la partie intracellulaire de Notch, le domaine RAM (RBPjk Associate Molecule) permet l'interaction dans le noyau avec Su(H). Le domaine PEST est impliqué dans la dégradation de Notch. Image de (Fiúza and Arias 2007).

Core component	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
Ligand	LAG-2 APX-1 ARG-2 F16B12.2	Delta Serrate	Delta-like1 (DLL1) Delta-like2 (DLL2) Delta-like3 (DLL3) Jagged 1 (JAG1) Jagged 2 (JAG2)
Receptor (Notch)	LIN-12 GLP-1	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4
Transcription factor (CSL)	LAG-1	Suppressor of Hairless [Su(H)]	CBF1/RBPJ $\kappa$ RBPL

**Fig. 1.13.** Tableau présentant les différents composants de la voie Notch (ligand, récepteur, facteur de transcription) chez le nématode, la mouche et les mammifères (Lai 2004).

Chez la *Drosophile*, les ligands de Notch sont deux protéines transmembranaires Delta (Dl) et Serrate (Ser) (D'Souza et al. 2008). Les mammifères (souris et humain) possèdent cinq ligands pour Notch. Trois sont proches de Delta (DLL 1, 3 et 4) et deux sont proches de serrate (Jag 1 et 2) (Radtke and Raj 2003). Dl et Ser codent des protéines transmembranaires de Type I et contenant des motifs EGF-like dans leur domaine extracellulaire (Vässin et al. 1987, Fleming et al. 1990 ; Fig. 1.12 et 1.13).

Concernant le récepteur Notch, une seule protéine est présente chez la mouche alors que l'on trouve quatre récepteurs Notch chez les mammifères (Notch 1-4) (Radtke and Raj 2003). Chez la mouche, le récepteur Notch contient 36 répétitions EGF-like suivies par trois domaines LNR (Cys-rich Lin-12/Notch Repeat) (Lieber et al. 1993). Au niveau de son domaine intracellulaire, le récepteur Notch contient un site de liaison à RBP-j(k) (RAM pour RBP-j(k) Association Module), un NLS (Nuclear Localisation Signal),

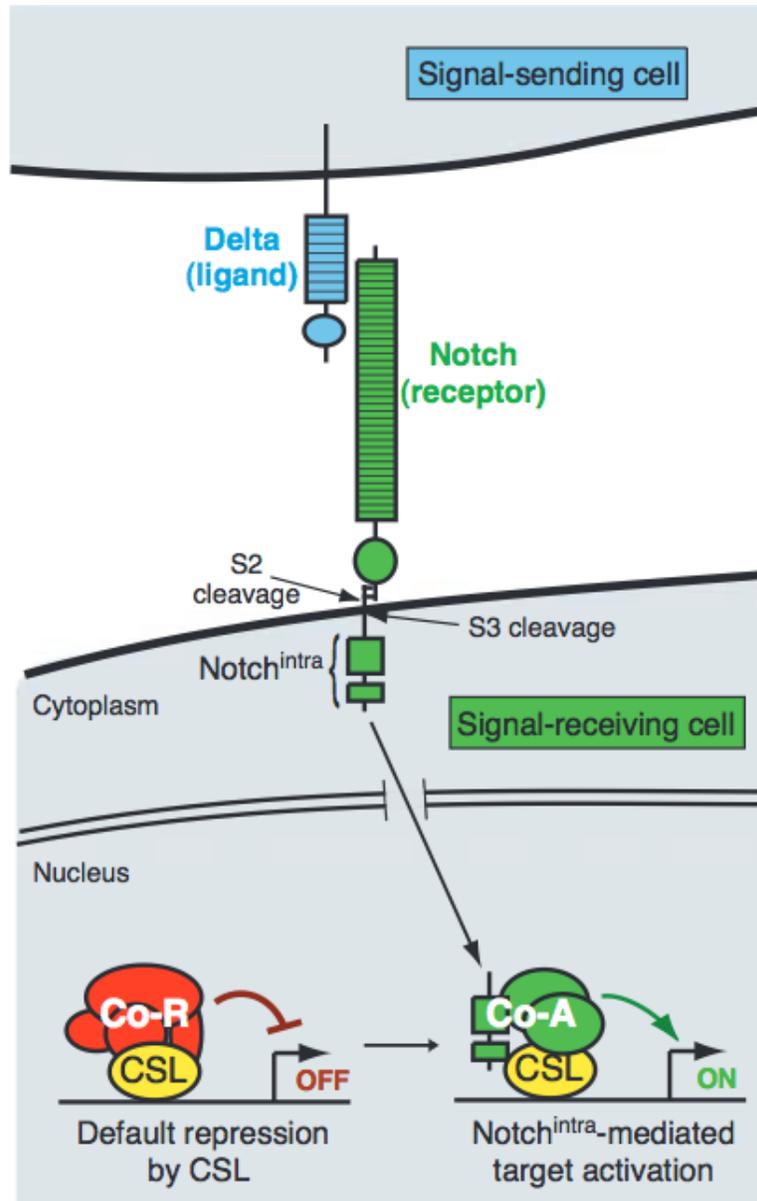
et un domaine de transactivation (Aster et al. 1997, Kurooka et al. 1998). Le récepteur Notch est traduit sous forme d'un précurseur de 300 kDa (p300) qui sera ensuite clivé au niveau du golgi par des furines. Les deux sous-unités de Notch s'associent ensuite de manière non covalente (liées via  $Ca^{2+}$ ) au niveau de la membrane pour former un récepteur hétérodimérique (Logeat et al. 1998, Fig. 1.14).

Il est important de noter ici que le récepteur Notch peut être modifié post-traductionnellement par l'ajout de sucre au niveau des répétitions EGF-like. Ces modifications permettent, même si cela n'est pas encore bien compris de discriminer les deux ligands. Par exemple, la surexpression de Ofut1, une O-fucosyl-transférase *in vivo* entraîne une sur-activation de la voie Notch via le ligand Serrate alors que la voie Delta-Notch est complètement inhibée (Okajima et al. 2003).

La fixation d'un des ligands sur le récepteur Notch conduit à une cascade de clivages protéolytiques. Le premier clivage dépend de protéases de la famille ADAM (Sapir et al. 2005). Ce clivage libère le domaine extracellulaire de Notch ( $N^{ext}$  notch extracellular truncation) (Brou et al. 2000). L'action de Y-secretase va ensuite conduire à la libération du domaine intracellulaire ( $N^{intra}$ ). Il est intéressant de noter ici que les protéases ADAM peuvent aussi cliver directement les ligands Dl et Ser (Qi et al. 1999, Six et al. 2003). A l'heure actuelle on ne connaît pas la fonction de ces domaines de ligands clivés, même il se pourrait par exemple que le domaine extracellulaire de Dl clivé puisse agir comme un ligand sécrété et agir à distance (Qi et al. 1999).

#### 1.4.2 NOTCH DANS LE NOYAU

L'activité de  $N^{intra}$  est associée à son interaction avec de nombreux facteurs présents dans le noyau. Le plus important chez la drosophile est suppressor of hairless Su(H) (Schweisguth and Posakony 1992). Cette protéine a deux fonctions : en l'absence d'activation de Notch, Su(H) agit comme ré-



**Fig. 1.14. Représentation des bases de l'activation de la voie Notch.** L'activation du récepteur Notch par ses deux ligands Delta ou Serrate entraîne deux clivages protéolytiques de Notch (S2 et S3). Le clivage S3 libère le domaine intracellulaire de Notch ( $N^{\text{intra}}$ ) qui va entrer dans le noyau.  $N^{\text{intra}}$  active alors CSL (Su(H)) qui va recruter des co-activateurs. En l'absence de signal Notch, CSL est lié à des co-répresseurs qui inhibent toute transcription des cibles de Notch. Image de (Lai 2004).

presseur transcriptionnel, alors que lorsque Notch est activé Su(H) devient un activateur de la transcription (Waltzer et al. 1995, Hsieh et al. 1996). Cette propriété peu commune permet à Su(H) d'avoir des effets différents sur les mêmes gènes cibles de manière Notch dépendante. Par exemple, chez l'embryon lors de la formation du mesectoderme, Su(H) active le gène *single-minded* (*sim*), alors qu'il va l'inhiber dans le tissu voisin (neurectoderme) où la voie Notch n'est pas activée (Morel et al. 2003).

Lorsque Notch n'est pas activé et que Su(H) inhibe la transcription, Su(H) se trouve au sein d'un complexe composé de plusieurs co-répresseurs. Chez les vertébrés, l'homologue de Su(H) est RBP-j(k)/CBF-1 et inhibe la transcription en se liant à plusieurs co-répresseurs : SMRT, NCoR, CIR et KyoT2. Un complexe répresseur se constitue ensuite avec Sin3a, SAP18, HDACs et Sharp/mint (Oswald 2002, Kao et al. 1998). Même si l'engagement du complexe activateur N<sup>intra</sup>/Su(H) est central pour l'activation des cibles de Notch, les cibles de Notch ne sont pas activées partout où Notch est lui-même activé. Cette spécificité est due à la régulation dans le noyau par des co-activateurs ou co-répresseurs d'autres voies de signalisation. Par exemple, lors du recrutement des cellules cônes dans la rétine de *Drosophila*, le facteur de transcription *dPax2* est central à la différenciation des cellules cônes mais il requiert des signaux de la voie Notch mais aussi de la voie EGF et du facteur de transcription Lozenge (Flores et al. 2000, voir section suivante sur EGF). Enfin, la protéine adaptatrice Hairless (H) peut s'associer à Su(H) pour inhiber la transcription (Schweisguth and Posakony 1994). L'inactivation de H conduit ainsi à l'expression ectopique de cibles de Notch (Morel et al. 2001). Dans ce cas l'inactivation des cibles se fait grâce aux protéines adaptatrices CtBP et Gro qui recruteront les HDACs (histone désacétylases) (Nagel et al. 2005).

Lorsque Notch est activé par la fixation d'un ligand, le domaine clivé N<sup>intra</sup> entre donc dans le noyau via son signal NLS (Hsieh et al. 1996) pour se fixer directement à Su(H) afin de faire passer ce facteur en état d'activateur. L'ac-

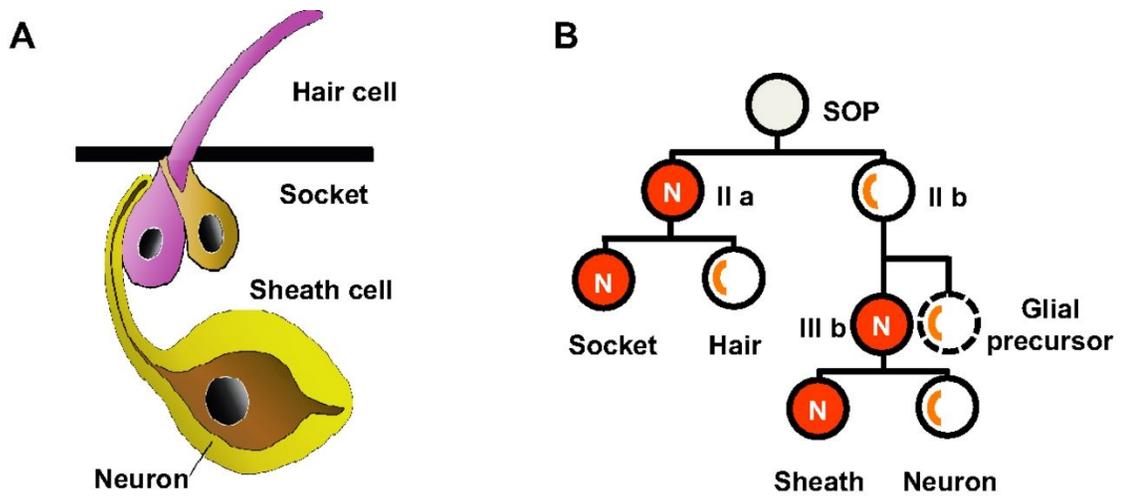
tivation des cibles par Su(H) se fait grâce à un co-activateur principal Skip (Ski-interaction protein) (Leong et al. 2004). Le complexe  $N^{\text{intra}}/\text{Skip}/\text{Su(H)}$  recrute ensuite d'autres co-activateurs comme HAT (histone Acetyl Transférase), PCAF ou GCN5 (Wallberg et al. 2002). L'activation des gènes cibles de  $N^{\text{intra}}$  nécessite enfin la présence de Mastermind (Mam). Mam complète le complexe transcriptionnel  $N^{\text{intra}}/\text{mam}/\text{Su(H)}$  pour activer les cibles (Wallberg et al. 2002). La structure cristalline de ce complexe ( $N^{\text{intra}}/\text{mam}/\text{Su(H)}$ ) a été résolue en 2006 (Nam et al. 2006). Parmi les gènes cibles de la voie Notch on trouve le complexe enhancer of split [E(spl)-C]. Ce complexe est composé de 13 gènes cibles de la voie Notch : sept facteurs de transcription bHLH (basic Helix-Loop-Helix) [E(spl)-mB, -mG, -mD, -m3, -m5, -m7, -m8] ; quatre protéines Brd (beared) [E(spl)-ma, -m2, -m4, -m6] ; le co-répresseur Gro (Groucho) et le membre de la famille Kazal E(spl)-m1 (Portin 2002). La classe de facteurs de transcription bHLH est connue pour contrôler la transcription de gènes pro-neuronaux comme *achaete* ou *scute* (Oellers et al. 1994). Il est important de souligner ici que Notch est souvent associé à la détermination du destin cellulaire des neurones via le mécanisme d'inhibition latérale (Fig. 1.11). Cependant Notch a des effets pléiotropes lors du développement du SNV. Par exemple chez la Drosophile, Notch est requis au développement des cellules gliales dans l'embryon. Une étude a montré à l'aide de mutant pour Dl que Notch permettait la formation de la glie tout en inhibant la formation d'autres neurones (Wheeler et al. 2008).

### 1.4.3 UN EXEMPLE DE PROGRAMME DÉVELOPPEMENTAL NÉCESSITANT LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH : LA DIVISION ASYMÉTRIQUE

De nombreux processus développementaux nécessitent l'activation de la voie Notch (Lai 2004), ici nous présenterons un des plus célèbre, la division asymétrique. La division asymétrique intervient lorsqu'une cellule précurseur se divise pour donner deux cellules filles différentes. C'est le cas lors de la

division des cellules précurseurs des organes sensoriels (SOP, sensory organ precursor). La cellule SOP se divise donnant deux cellules filles toutes les deux susceptibles de recevoir ou d'envoyer des signaux Notch. Toutefois la division est asymétrique, ce qui induit un biais dans l'expression de facteurs génétiques. Il en résulte que les deux cellules vont avoir des destins différents, l'une traduire le signal Notch alors que l'autre va le recevoir (Lai 2004).

Ce phénomène intervient en particulier durant la formation des soies de la *Drosophile* y compris celles présentes au niveau de la rétine et pour lesquelles les mutants *spen* ont un phénotype particulier (Roegiers and Jan 2004)(Fig. 1.15 and 3.4). La division de la cellule SOP donne en effet deux cellules filles pIIa et pIIb. Cependant cette division est asymétrique et Numb et Neur sont ségrégués uniquement dans la cellule pIIb (Le Borgne and Schweisguth 2003). Neur code pour E3 ubiquitine ligase qui active Notch probablement par l'endocytose de Delta et le récepteur Notch lié à Delta. Numb est une protéine qui inhibe le clivage de N<sup>intra</sup>. Les mécanismes conduisant à la ségrégation asymétrique de ces facteurs sont mal connus. On sait toutefois que dans les neuroblastes par exemple Numb (une protéine associée aux membranes) est localisée face au cytosol dans la partie basale de la cellule en division. Les fuseaux mitotiques s'orientent le long de l'axe apico-basal. Il en résulte que seule la cellule basale reçoit numb (Rhyu et al. 1994). Dans la cellule pIIb Neur va activer Dl alors que Numb va inhiber l'activation de Notch. Il en résulte que la cellule pIIa va exprimer le récepteur Notch et va être compétente pour transcrire le signal alors que pIIb exprimera le ligand et sera inhibée quant à l'activation de Notch. La voie Notch est alors activée dans la cellule pIIa résultant en l'activation du complexe E(spl) et l'inhibition des gènes pro-neuronaux (Heitzler et al. 1996). La cellule pIIa se divisera pour donner les cellules shaft et socket. La cellule pIIb se divisera pour donner une cellule gliale qui mourra par apoptose (Fichelson and Gho 2003) et une cellule pIIIb. Cette dernière se divisera alors pour donner une cellule



**Fig. 1.15. Division asymétrique donnant un organe sensoriel.** (A) Le complexe produisant la soie des mouches est formé de quatre cellules (socket, sheath, neuron, shaft (soie)). (B) Dans un groupe de neurones indifférenciés, une SOP est choisi par inhibition latérale (voir Fig 1.11). A partir de ce sop, plusieurs divisions asymétriques vont donner l'organe final. On note que la cellule gliale meurt par apoptose. La division asymétrique de Notch est nécessaire à chaque étape : l'inhibiteur de Notch Numb est distribué de manière asymétrique entre les cellules filles (orange). Image de (Koch et al. 2013).

neuronale et une cellule sheath. Ces quatre cellules formeront le complexe cellulaire qui permettra la formation d'une soie (Simon et al. 2009).

## 1.5 La voie de signalisation du récepteur EGF chez la *Drosophile*

La voie de signalisation du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), est utilisée de manière répétitive dans de nombreux processus développementaux. Cette voie est typiquement associée à l'instruction du destin cellulaire durant l'embryogénèse, l'oogénèse, la maturation des disques imaginaux et la formation des organes après la métamorphose (Shilo 2003). D'ailleurs, le fait que ce récepteur accomplisse autant de tâche durant le développement est illustré par la pléiade de surnom lui étant attribué : EGFR, DER (Drosophila EGF Receptor), faint little ball, torpedo, ellipse. Il serait illusoire de détailler tous les concepts associés à la voie EGFR. Dans ce paragraphe nous détaillerons l'activation canonique de cette voie en insistant sur la question de savoir comment l'activation d'un seul récepteur peut amener autant de signaux différents, sachant que ce n'est pas par l'activation de différentes cascades de signalisation, étant donné que le récepteur EGF active uniquement la voie des MAPK (RAS/Raf/MAP kinases).

### 1.5.1 LES BASES DE LA VOIE EGFR CHEZ LA DROSOPHILE

Chez la mouche, EGFR est le seul récepteur de cette voie. En aval, l'activation du récepteur émet un signal véhiculé par la voie canonique RAS/RAF/MAPK (Wasserman and Freeman 1997). Il semble que cette voie soit parfaitement linéaire et n'admette aucun branchement. L'activation des MAPK résulte en l'activation de gènes cibles via l'activateur transcriptionnel Pointed (Gabay et al. 1996). Dans de très rares cas, l'activation de la voie EGFR active des cibles de manière non transcritptionnelle : dans notre cas, il est important de mentionner l'exemple dans l'œil en développement où EGFR inhibe l'apoptose par phosphorylation (inactivation) du facteur pro-apoptotique Hid par les MAPK (Bergmann et al. 1998; 2002).

La voie EGFR est en partie régulée par la génération de différents ligands activés par clivage. Il existe quatre ligands chez la *Drosophile* : Spitz, Keren, Gurken et Vein. Vein est le seul ligand sécrété qui ne nécessite aucun clivage pour être activé (Schnepp et al. 1996). Les trois autres ligands sont produits sous une forme inactive liée à la membrane. Ce n'est qu'après un clivage que les ligands sont activés par libération du domaine EGF extracellulaire (Schweitzer et al. 1995b). Il est admis que Spitz est le ligand cardinal de la voie EGFR et qu'il est impliqué dans la majorité des cas où EGFR agit. Le ligand Spitz est exprimé de manière assez large (Rutledge et al. 1992). D'ailleurs, la régulation de Spitz ne se fait pas vraiment par une restriction de son expression, mais plutôt par le contrôle de sa sécrétion de manière spatiale et temporelle. Il est important de souligner que même si la voie EGFR est activée par Spitz qui est un ligand sécrété, cette voie est activée à courte distance, et l'action est restreinte à la cellule produisant le ligand ou au mieux aux cellules adjacentes au signal (Shilo 2005).

L'activation de Spitz nécessite deux protéines : Star et Rhomboid. Le rôle de ces deux protéines est de telle importance que les embryons mutants pour Spitz ont le même phénotype que les embryons mutés pour Star ou Rhomboid (Mayer and Nüsslein-Volhard 1988).

### 1.5.2 LA RÉGULATION DE LA VOIE EGFR VIA LE CLIVAGE DU LIGAND SPITZ

Etant donné que l'activation de Spitz est centrale pour activer la voie EGFR, la régulation des protéines qui permettent la sécrétion de ce ligand est fondamentale pour cette voie. Tout comme Spitz, la protéine Star est exprimée de manière assez stable et est peu dynamique. En revanche, l'expression de Rhomboid est très dynamique (Bier et al. 1990), et apparaît dans les tissus juste avant l'activation des MAPK (Gabay et al. 1997). Pour résumer, la plupart des composants de la voie EGFR sont ubiquitaires, et c'est l'ex-

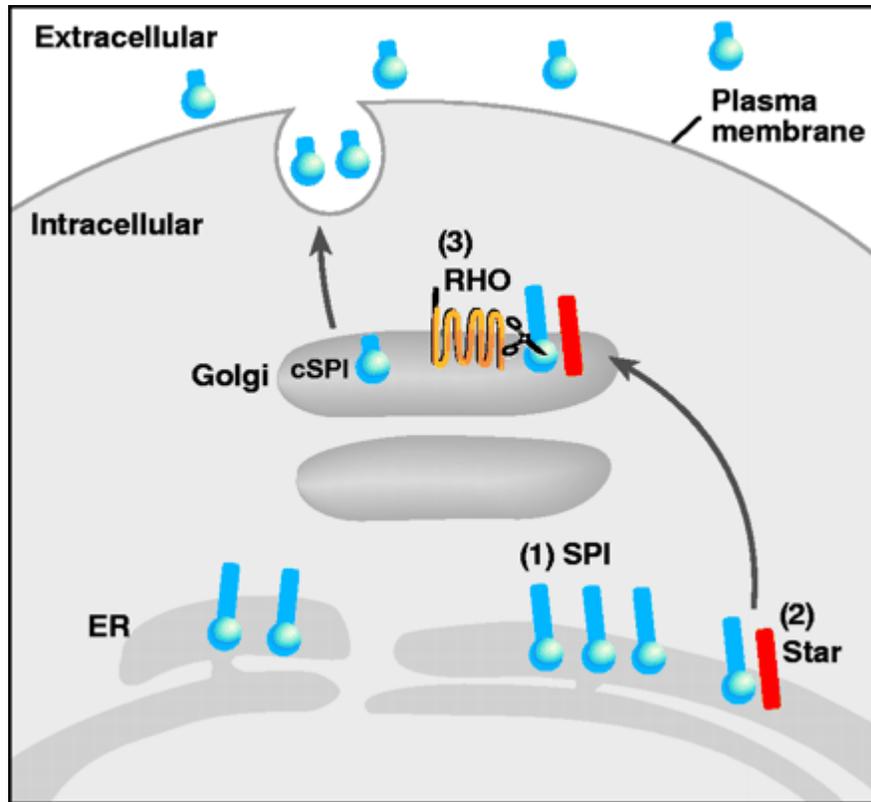
pression de *rhomboid* qui est le facteur limitant pour l'activation de la voie. La seule expression ectopique de *rhomboid* suffit à activer la voie EGFR (Golembo et al. 1996). Lors des processus développementaux, l'activation transcriptionnelle de *rhomboid* est contrôlée par d'autres voies de signalisation telles que Notch, Wingless ou Hedgehog (Alexandre et al. 1999). Le gène *rhomboid* code pour une protéase intramembranaire. Chez la Drosophile, six protéines de la famille de Rhomboid ont été identifiées (Wasserman et al. 2000), mais seulement trois, et principalement Rhomboïd 1, semblent être impliquées dans l'activation de la voie EGFR.

La sécrétion de Spitz se fait en plusieurs étapes. Le précurseur de Spitz est au début retenu dans le Réticulum Endoplasmique (RE). La protéine Star s'associe avec le précurseur de Spitz dans le RE pour permettre sa translocation vers un compartiment cellulaire (dans la plupart des cas dans l'appareil de Golgi) (Tsruya et al. 2002, Lee et al. 2001). Le précurseur Spitz est alors clivé par Rhomboid sous sa forme sécrétable (Urban et al. 2001) (Fig. 1.16).

### 1.5.3 LES MODULATEURS DE LA VOIE EGFR

L'induction transcriptionnelle de modulateurs de la voie joue un rôle majeur pour la réponse finale de la voie.

La voie EGFR est activée par la fixation d'un ligand diffusible. Le fait que cette voie ne soit activée qu'à faible distance implique la présence de régulateurs négatifs. Certains régulateurs négatifs sont exprimés constitutivement, d'autres sont induits transcriptionnellement suivant l'activation de la voie. A ce jour, les deux régulateurs négatifs constitutionnellement exprimés sont CBL et YAN. CBL code pour une liguase E3 la forme activée et endocytée du récepteur EGFR et induit son ubiquitination et sa dégradation. Dans un mutant *dbl*, la voie EGFR est ainsi hyperactivée (Pai et al. 2000). Le gène *yan* encode un répresseur transcriptionnel qui bloque le site de liaison à l'ADN de Pointed. Suivant l'activation des MAPK, YAN est phosphorylée



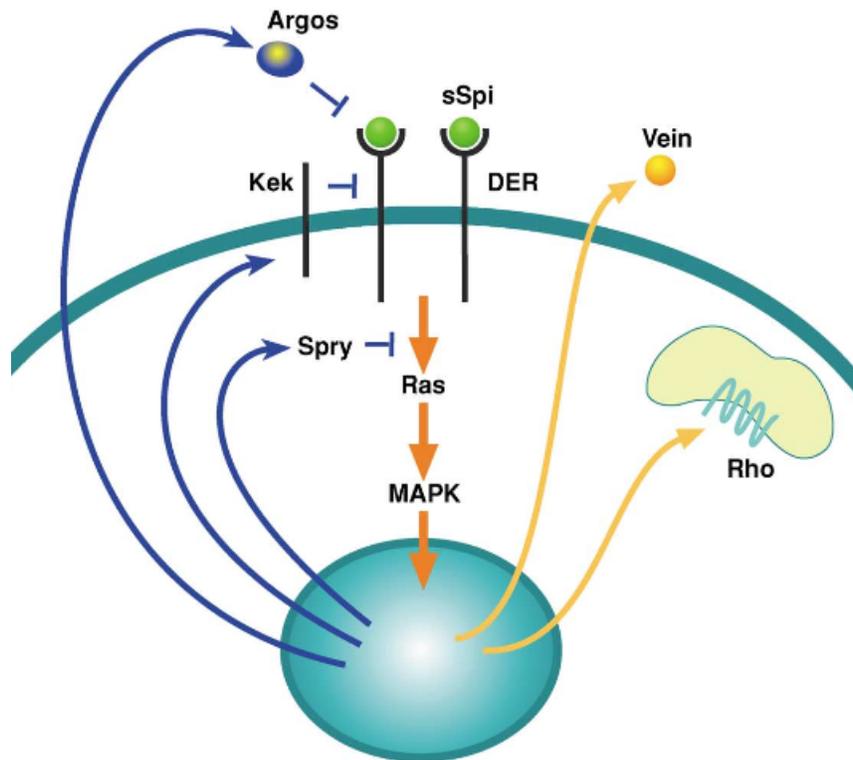
**Fig. 1.16. La régulation du clivage de Spitz par le trafic intracellulaire.** Le précurseur de Spitz (Spitz precursor SPI), contient un domaine transmembranaire et est retenu dans le Reticulum Endoplasmique (ER). Cette rétention empêche tout relargage non-spécifique du ligand après son clivage à la membrane plasmique par des métalloprotéases très peu spécifiques. La protéine Star (une protéine transmembranaire de type II) s'associe avec SPI et facilite sa translocation vers l'appareil de Golgi où il pourra être clivé par la protéase Rhomboid (RHO). Le clivage de SPI par RHO libère la forme activée de Spitz qui est destinée à la sécrétion.

ce qui conduit à sa dégradation (Rebay and Rubin 1995). Parmi les autres régulateurs négatifs de la voie EGFR, on trouve des gènes induits transcriptionnellement après l'activation de la voie, tels que *argos*, *kekkon* et *sprouty*. Leur rôle est typiquement d'inhiber la signalisation EGFR dans les cellules qui sont loin de la source.

Argos est une protéine sécrétée et qui contient un domaine EGF (Freeman et al. 1992). Argos peut s'associer avec Spitz pour former des hétérodimères non fonctionnels (Klein et al. 2004). Cette propriété permet de restreindre le champ d'action de Spitz. L'activité à courte distance de Argos est suffisante pour limiter la diffusion de Spitz et de tamponner les fluctuations du ligand (Reeves et al. 2005). Même si cela n'est pas démontré, il est tentant de penser que Argos pourrait séquestrer certains ligands et pas d'autres, afin de définir des patrons (Fig. 1.17).

Sprouty exerce son action inhibitrice en interférant avec des éléments clés de la cascade des MAPK (Kim and Bar-Sagi 2004). Sprouty est activée par la voie EGFR mais doit aussi être phosphorylée indépendamment de la voie EGFR, ce qui permet certainement de gagner en spécificité (Hanafusa et al. 2002). L'inhibiteur Kekkon est une protéine transmembranaire qui forme des hétérodimères avec le récepteur EGFR (Ghiglione et al. 1999)(Fig. 1.17).

Enfin, une étape de régulation négative se produit au niveau de la cellule envoyant le signal en limitant la production du ligand. Dans ce cas, la forme clivée de Spitz est retenue dans le reticulum endoplasmique, bloquant l'activation de la voie EGFR. Cette rétention dépend d'une phospholipase appelée Sl. Dans les mutants *sl*, la voie EGFR est exacerbée à cause d'un relargage excessif du ligand Spitz (Thackeray et al. 1998). Toutefois l'impact biologique de la séquestration du ligand Spitz est inconnu.

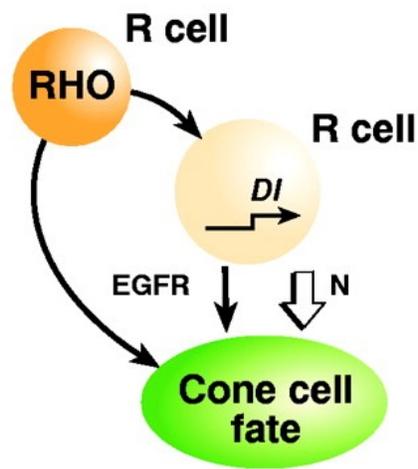


**Fig. 1.17. Signalisation à travers la voie EGFR.** L'activation de DER (Drosophila Epidermal Growth Factor Receptor) par son ligand Spitz entraîne à travers la voie des MAPK une série de boucles positives et négatives. De manière positive, Vein est induit pour aller signaler aux cellules adjacentes, et Rho (rhomboid) est activé pour permettre la sécrétion de Spitz. Au contraire, l'activation des MAPK induit plusieurs régulateurs négatifs : Argos, Kekkoon et Sprouty. La balance entre ces différents acteurs positifs et négatifs dépendra du tissu concerné. Image de (Shilo 2003).

#### 1.5.4 LES RELATIONS ENTRE NOTCH ET LA VOIE EGFR

Dans la plupart des processus développementaux, la voie EGFR agit de concert avec d'autres voies de signalisation. Nous exposons ici un exemple d'interaction entre la voie EGFR et la voie Notch dans le contexte du développement de l'œil (Fig. 1.18).

Tout comme il a été montré dans le chapitre introductif sur le développement de l'œil (Fig. 1.3), l'induction du gène *dPax2* dans les cellules cônes nécessite la fixation simultanée sur l'ADN de Pointed (résultant de l'activation de la voie EGFR) et de SU(H) (résultant de l'activation de la voie Notch) (Flores et al. 2000). Il est intéressant de noter que Spitz, en plus d'activer la voie EGFR dans les futures cellules cônes induit l'expression de Delta dans les photorécepteurs. Ces derniers pourront alors envoyer le signal Notch requis à la différenciation des cellules cônes (Tsuda et al. 2002). Ce principe d'activation nécessitant une étape intermédiaire s'appelle un "feed-forward". Cette méthode d'activation de la voie EGFR à deux endroits produit un signal final fort qui tamponne toute fluctuation du signal (Milo et al. 2002). Ainsi seul l'activation de la voie EGFR soutenue donnera une réponse dans la cellule cible.



**Fig. 1.18. Un exemple d'interaction entre la voie Notch et la voie EGFR.** La différenciation d'une cellule cône de la rétine nécessite de combiner des signaux des voies Notch et EGFR selon un motif de feed-forward. L'activation de la voie EGFR dans un photorécepteur (R cell) induit l'expression de Delta (DI). La combinaison des signaux Spitz et Delta induit le destin cellulaire de la cellule cône, cela en induisant l'expression de gènes cibles tels que *Pax2*. La flèche blanche indique l'activation de la voie Notch. Image adaptée de (Shilo 2005).

## 1.6 Les interactions neurones-glies et la maladie de Parkinson

### 1.6.1 LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies du système nerveux central caractérisées par une perte neuronale progressive touchant un ou plusieurs groupes de neurones. Ces maladies se traduisent cliniquement par des troubles fonctionnels neurologiques de nature variable selon la catégorie de neurones touchée. Ainsi la maladie d'Alzheimer atteint de façon précoce les neurones de l'hippocampe et entraîne de ce fait des troubles amnésiques aux phases initiales de la maladie. Les patients atteints de la maladie de Parkinson (Parkinson disease, PD) présenteront des troubles du contrôle moteur liés à une atteinte des neurones dopaminergiques. Les maladies neurodégénératives sont dans de rares cas des formes familiales expliquées par des mutations génétiques et peuvent survenir relativement tôt au cours de la vie adulte. Dans la plupart des cas, les maladies neurodégénératives sont sporadiques et le vieillissement est un facteur favorisant prépondérant. Ainsi, du fait que la population mondiale est vieillissante, l'incidence des maladies neurodégénératives est de plus en plus élevée, faisant de ces pathologies un enjeu de société majeur.

On considère actuellement que deux grandes catégories de mécanismes physiopathologiques sont responsables de la mort des neurones dopaminergiques au cours de la maladie de Parkinson : i) des mécanismes propres aux neurones ("cell-autonomous mechanisms") et qui sont notamment liés au contrôle du stress oxydatif et aux fonctions mitochondriales, ii) des mécanismes liés à l'environnement du neurone ("non cell autonomous-mechanisms"), notamment son environnement immunitaire. Nous exposerons par la suite successivement le rôle du stress oxydatif, et le rôle de la réaction inflammatoire induite par la microglie.

### 1.6.2 STRESS OXYDATIF ET MORT CELLULAIRE DANS LA MALADIE DE PARKINSON

Une présence anormalement élevée d'espèces oxygénées réactives ("Reactive oxygen species" ou ROS) est appelée stress oxydatif. Un stress oxydatif peut directement causer des dommages à une cellule en oxydant les lipides membranaires et en modifiant les conformations des protéines. Un stress oxydatif peut aussi directement activer la mort programmée par la voie d'apoptose intrinsèque via p53 (Culmsee and Mattson 2005, chapitre apoptose). En ce qui concerne la mort neuronale ou neurodégénérescence, la mort de certains neurones suite à un stress oxydatif a été décrite. Par exemple, des Drosophiles nourries avec de faibles doses de paraquat ou roténone (deux agents chimiques impactant la chaîne respiratoire mitochondriale et induisant ainsi un stress oxydatif) présentent une perte progressive de neurones et en particulier des neurones dopaminergiques (Coulom and Birman 2004). En revanche la relation entre stress oxydatif et apoptose dans ce cas demande encore à être éclaircie. Il semblerait que les neurones soient plus sensibles au stress du fait que ce sont des cellules post-mitotiques avec un faible renouvellement protéique. En utilisant un modèle de la maladie d'Alzheimer, les auteurs d'une étude ont montré que la perte massive de neurones serait due à l'activation de l'apoptose par le stress oxydatif. Cette mort est partiellement dépendante de la voie JNK (Marques et al. 2003). De plus, l'activation des caspases dans un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique (Amyotrophic Lateral sclerosis ou ALS) dépend de la présence de NOS et pourrait même être activées par l'oxyde nitrique même (Raoul et al. 2002).

L'utilisation d'un autre agent chimique capable d'induire un stress oxydatif et de modéliser la maladie de Parkinson a permis d'apporter des réponses quant aux mécanismes d'induction de la mort des neurones dopaminergiques. Le MPTP (1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine) est une neurotoxine capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Le MPTP est alors

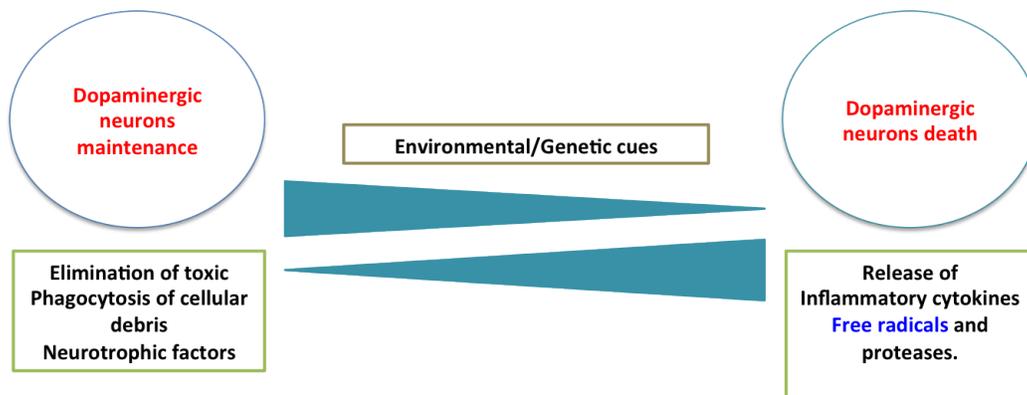
transformé en MPP<sup>+</sup> par l'enzyme MAO-B des cellules gliales. Le MPP<sup>+</sup> interfère avec le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale provoquant l'accumulation de radicaux libres. Le MPTP est classiquement utilisé comme modèle chimique de la maladie de Parkinson, car le MPP<sup>+</sup> détruit essentiellement les neurones dopaminergiques. L'activation des caspases après une intoxication au MPTP est médiée par la voie JNK (Saporito et al. 2000). De plus la mort cellulaire provoquée par le MPTP peut être atténuée par l'ajout d'inhibiteurs de la voie JNK (Wang et al. 2004). Ainsi, la voie JNK est activée par le stress oxydatif et conduit à l'apoptose des neurones. Cependant aucune étude n'a encore montré que la voie JNK est activée par les ROS dans un contexte de neurodégénérescence.

### 1.6.3 RÔLE DE LA MICROGLIE DANS LA MALADIE DE PARKINSON

La microglie constitue la population de cellules immunitaires résidentes du système nerveux central. Dans un cerveau sain, les cellules microgliales adoptent une forme ramifiée, envoyant des prolongements cytoplasmiques qui s'étendent et se rétractent en permanence afin de sonder l'état des cellules et de la matrice les entourant. Lorsqu'un neurone subit un dommage, il libère des molécules immunes qui vont activer la microglie. Cette dernière va ainsi adopter une morphologie de microglie activée (rétraction des ramifications et hypertrophie du corps cellulaire) et engager des programmes d'activation variables selon le type d'input ayant induit cet état d'activation. Schématiquement, la microglie peut adopter classiquement deux types d'état (Lucin and Wyss-Coray 2009). L'état d'activation dit "classique" correspond à une capacité cytotoxique accrue notamment via la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), d'espèces réactives nitrogénées (RNS) mais aussi de facteurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ...) qui vont se lier à des récepteurs neuronaux et induire la mort cellulaire. Dans l'état d'activation dit "alternatif", la microglie fournit un soutien trophique et immunomodulateur

via la synthèse de facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ . . .) et de neurotrophines. La microglie en état d'activation alternative présente également une capacité accrue à phagocyter les débris cellulaires, facilitant ainsi la réparation tissulaire. Ainsi en fonction de l'état d'activation de la microglie, cette dernière peut clairement être délétère ou protectrice vis-à-vis des neurones et de son microenvironnement (Ransohoff and Perry 2009) (Fig. 1.19). Dans le cadre de la maladie de Parkinson, l'activation des cellules microgliales est démontrée mais son rôle n'est pas clairement établi. Ainsi, des études post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson ont montré l'augmentation de TNF- $\alpha$ , Il-6 et IL-1 $\beta$  dérivant des cellules microgliales (Mogi et al. 1994). De plus des cellules microgliales produisant du TNF- $\alpha$  ou des espèces réactives ont été détectées dans le substantia nigra (SN), zone anatomique dans laquelle sont localisés les neurones dopaminergiques (Hunot et al. 1996). Enfin, les conséquences de la production d'espèces réactives sont observables dans ces tissus comme la présence de dommages à l'ADN et de protéines carbonylées (Alam et al. 1997), ou d'enzymes de détoxification (Lange et al. 1992). Enfin les neurones présentant des agrégats d' $\alpha$ -synuclein sont entourés de cellules microgliales activées dans la SN de cerveau de patients (Yamada et al. 1992).

Au contraire, des études ont aussi montré que des cellules microgliales ayant un rôle de soutien étaient présentes dans la SN de patients. Par exemple des cellules microgliales exprimant des marqueurs de phagocytose (CD64/68) sont détectées autour des dépôts extra-cellulaires d' $\alpha$ -synuclein (Orr et al. 2005). Ceci laisse penser que la microglie ici pourrait phagocyter les agrégats d' $\alpha$ -synuclein et limiter ses effets pro-inflammatoires ou cytotoxiques. Pour finir une étude récente a montré *in vitro* que l' $\alpha$ -synuclein n'était pas directement toxique pour les neurones, et que c'était la présence de microglie et donc de l'inflammation et du relargage d'espèces réactives qui cause la mort des neurones (Zhang et al. 2006). Ceci indiquerait que la microglie induirait



**Fig. 1.19. Représentation schématique du rôle duel de la microglie dans le maintien des neurones dopaminergiques.** A gauche, la microglie adopte des propriétés protectrices permettant le maintien des neurones dopaminergiques. Des facteurs génétiques ou environnementaux peuvent modifier cet état de la microglie lui conférant des propriétés délétères vis-à-vis des neurones dopaminergiques (droite du schéma).

une mort des neurones suivant un mécanisme non-autonome.

Pour conclure, aucune étude ne permet actuellement de trancher sur le rôle (délétère ou protecteur) des cellules microgliales quant au maintien des neurones dopaminergiques.

#### 1.6.4 LES CELLULES GLIALES CHEZ LA DROSOPHILE

La conservation des fonctions et de la localisation de la glie dans le cerveau adulte entre les insectes et les vertébrés fait de la *Drosophila* un modèle de choix pour l'étude des cellules gliales. Les cellules gliales des insectes, tout comme chez les vertébrés, sont réparties en plusieurs classes en fonction de leur position dans le cerveau et de leur rôle. La glie des insectes a de nombreuses fonctions telles que le soutien trophique des neurones, la croissance axonale ou encore la différenciation des neurones (Hartenstein 2011, Edwards and Meinertzhagen 2010). Chez la *Drosophila*, la glie peut-être divisée en trois classes distinctes :

- La glie de surface, qui entoure le cerveau entier à sa périphérie formant

une barrière.

- La glie de cortex, qui est en contact avec les corps cellulaires des neurones, et assure des fonctions de support
- La glie de neuropile, qui se situe à l’interface entre le cortex et la neuropile. La neuropile étant la zone formée par les dendrites et les synapses. Cette glie participe notamment au recyclage des neurotransmetteurs.

Plusieurs études ont directement mis en relation la mort de certains neurones après un stress oxydatif et le support des cellules gliales dans des modèles de la maladie de Huntington ou de sclérose latérale amyotrophique (Besson et al. 2010, Rival et al. 2004, Kumimoto et al. 2013). Cependant, pour le moment peu de données sont publiées quant au rôle des cellules gliales dans le soutien trophique et la protection des neurones dopaminergiques chez la mouche. Les auteurs d’une étude ont toutefois montré que tout comme chez les vertébrés, des interactions trophiques entre la glie et les neurones sont essentiels à leur maintien respectif. Les auteurs montrent que le gène *Dm-MANF*, codant pour un facteur neurotrophique (Neurotrophic Factor, NTF), et exprimé dans les cellules gliales était requis pour la survie des neurones dopaminergiques dans le système nerveux central de l’embryon (Palgi et al. 2009). Même si cette étude est limitée aux stades précoces de développement, il est possible que ces données puissent être extrapolées au cerveau adulte de la mouche.

## 1.7 Objectifs

L’élimination précise des cellules interommatidiales de l’œil de la mouche fait intervenir principalement deux voies de signalisations : Notch et EGFR. Le gène *spen* est à la croisée de ces deux voies. On propose ici de comprendre le rôle de *spen* dans la survie des cellules interommatidiales dans l’œil de la mouche.

Le stress oxydatif est à l'origine de la mort de certains neurones dans plusieurs pathologies et notamment la maladie de Parkinson. La modulation de l'expression de spen en réponse à un stress oxydatif lève la question de savoir si ce gène est important dans un autre processus de mort, à savoir la neurodégénérescence qui sera abordée dans une seconde partie.

# Chapitre 2

## Matériels et Méthodes

### 2.1 Lignées de Drosophile utilisées et génétique

Toutes les expériences réalisées ont été faites avec des mouches élevées sur du milieu de culture standard. Les mouches sont élevées à 25°C sauf dans les expériences utilisant la construction ubi-GAL80<sup>ts</sup>. Sauf indiqué, les mouches utilisées proviennent du Bloomington stock center : GMR-GAL4, FRT40A w+ ; UAS-GFP, UAS-nlsGFP, UAS-*white*<sup>RNAi</sup>, 54C-GAL4, UAS-GFP, ARM : :GFP, *en*-GAL4, UAS-LacZ, UAS-LuciféraseARNi, W<sup>1118</sup>, Canton-S, *elav*-GAL4, *repo*-GAL4, *act*<FRT-stop-FRT<LacZ. Le driver *lz*-GAL4 provient du laboratoire de Graeme Mardon (Flores et al. 2000). Le protocole d'utilisation de la lignée ubi-GAL80<sup>ts</sup> est le même que dans Napoletano et al. (2011). Deux lignées exprimant un siRNA ont été utilisées pour inactiver *spen* : ;UAS-*spen* RNAi /CyO ; ;(provenant du laboratoire de Kenneth Cadigan) et ; ;UAS-*spen*RNAi ; (provenant de VDRC , transformant 48846, bibliothèque GD). Ces deux lignées ont été testées et donnent les mêmes résultats. Deux lignées mutantes pour *spen* ont été utilisées et proviennent du centre Bloomington : *spen*<sup>5</sup> PneoFRT40A/CyO, PlacZ-un3276 (#8734) et P<sub>ry</sub>[+t7.2]=PZ*spen*[03350] *cn*[1]/CyO ; *ry*[506] (#11295). La lignée *spen*<sup>5</sup> PneoFRT40A/CyO a permis de réaliser l'intégralité des clones mitotiques dans les tissus larvaires ou de pupes. La mutation *spen*<sup>5</sup> présente une mutation non-sens qui conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré donnant une protéine nulle (Kuang et al. 2000). Afin de faciliter les analyses, le ba-

lancier Cyo a été remplacé par un balancier fluorescent Cyo,dfd : :YFP ou le balancier ST (portant le marqueur tubby).

La génération de clones mitotiques a été réalisé en utilisant la mutation *spen*<sup>5</sup> recombinaison sur un bras chromosomique FRT40A. La flipase a été induite grâce à deux lignées exprimant la flipase soit sous le contrôle du promoteur du gène *eyless* (*ey*-GAL4, UAS-FLP ; FTR-40A), soit du driver T155 (;FRT40A;T155-GAL4,UAS-fLP). La première provient du laboratoire de Graeme Mardon, la deuxième est disponible au centre Bloomington (#5074). La construction T155 est caractérisée par l'insertion d'un élément P(GawB) à ce locus. L'expression de ce driver a été étudiée (Hrdlicka et al. 2002) et a la particularité d'être exprimée tôt au cours du développement, notamment dans les disques imaginaux.

L'obtention d'œil entièrement mutant pour *spen* (clone œil entier) a été obtenu grâce à la lignée *yw* ; FRT40A GMR-*hid* CL (cell lethal) ; EGUF (*ey*-GAL4;UAS-FLP) (Stowers and Schwarz 1999). Cette méthode génétique permet de générer des yeux de Drosophiles entièrement homozygotes mutantes dans un contexte hétérozygote. Le génotype suivant a été obtenu après croisement : *ey*-GAL4-UAS-FLP ; FRT40A-*spen*<sup>5</sup>/FRT40A-GMR-*hid*. Dans ce contexte, chaque cellule ayant gardé si ce n'est qu'une seule copie de GMR-*hid* mourra par apoptose. Il en résulte un œil composé uniquement de cellules homozygotes et mutantes pour le gène d'intérêt.

## 2.2 Immunomarquages

Le même protocole d'immunomarquage a été suivi pour le marquage des disques imaginaux de larve et les disques de pupes stadés. Les dissections sont faites dans du PBS (phosphate-buffer-saline) froid. Après dissection, les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde (EMS) 4% dilué dans du PBS, 15 minutes à température ambiante. Les tissus sont ensuite rincés trois fois

10 minutes dans du PBT 0,1% (0,1% Triton X-100 (sigma-aldrich) dans du PBS). L'incubation avec l'anticorps primaire se fait sur la nuit à 4°C. Les tissus sont ensuite rincés 3 fois 10 minutes dans du PBT 0,1%. Les disques sont ensuite incubés avec l'anticorps secondaire 2 heures à température ambiante. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : rat anti-Elav (1/500 DSHB), lapin anti-Spen (1 :1000), souris anti-Arm (1 :500, DSHB), lapin anti- $\beta$ -galactosidase (1 :500, MP Cappel), and lapin anti-Dcp-1 (Asp216) (1 :500, Cell Signaling Technology). Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés (Invitrogen) : anti-lapin Alexa Fluor 405 or 488 au 1 :500, anti-rat Alexa Fluor 633 at 1 :500, and anti-souris Alexa Fluor 546 or 405 au 1 :500. Les tissus sont ensuite rincés trois fois dans du PBT 0,1%, puis montés dans du milieu de type Vectashield (Vectashield, AbCys). L'acquisition des images est faite avec des microscopes Leica LSM 710 ou LSM 780.

### **2.3 Détection de l'activité de l'enzyme $\beta$ -galactosidase**

Des sections horizontales de têtes de mouches ont été réalisées avec un cryostat microtome (Microm HM 505). Les têtes sont déposées sur des lames superfrost (Thermo). Les lames sont laissées à l'air libre pendant 10 minutes puis fixées 5 minutes dans du PBS 0.25% glutaraldehyde. Les tissus sont ensuite marqués à 37°C dans 7.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 3 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], contenant au 1/30 une dilution de X-Gal (30 mg/ml in dimethyl formamide). Après lavage au PBS (3x 10 minutes), les tissus sont montés dans du Vectashield (AbCys).

### **2.4 Microscopie électronique à balayage**

Des mouches âgées de trois jours sont collectées. Le proboscis est enlevé et les têtes sont trempées trente secondes dans une eau savonneuse (IJN,

#507482, Groupe Prop) pour rendre les têtes hydrophobes. Les têtes sont ensuite fixées 2 jours à 4°C dans une solution cacodylate 0.1M et glutaraldéhyde 2%. Après la fixation les têtes sont lavées trois fois 15 minutes dans du tampon cacodylate 0.1 M. Les têtes sont ensuite déshydratées par la méthode du point critique et ensuite métallisées (Baltec MED-020). Les têtes sont observées avec un microscope à balayage Quanta 250 FEG (FEI). Les images sont analysées avec le logiciel Adobe Photoshop.

## **2.5 Microscopie électronique à transmission**

Les protocoles suivis ont été décrits dans Dourlen et al. (2012). Brièvement, les yeux de *Drosophila* sont disséqués et fixés sur la nuit à 4°C dans du glutaraldéhyde 1,5%, paraformaldéhyde et du tampon PIPES 0,1M (pH 7,4). Après les rinçages, les yeux sont post-fixés à température ambiante dans du 1% OsO<sub>4</sub>, 0.1M PIPES (pH 7.4). Ils sont ensuite déshydratés dans des bains d'éthanol successifs puis dans de l'oxyde de propylène anhydre. Les yeux sont ensuite infiltrés avec des concentrations croissantes de résine epoxy (EMbed 812, EMS) dans de l'oxyde de propylène pendant un jour à température ambiante. Les yeux sont alors montés dans de la résine dans des moules. La polymérisation se fait pendant deux jours à 60°C. Des sections fines de 60 nm sont marquées au lead citrate et observé avec un microscope électronique à transmission Philips CM120 à 80kV.

## **2.6 Génération d'un anticorps polyclonal contre Spen**

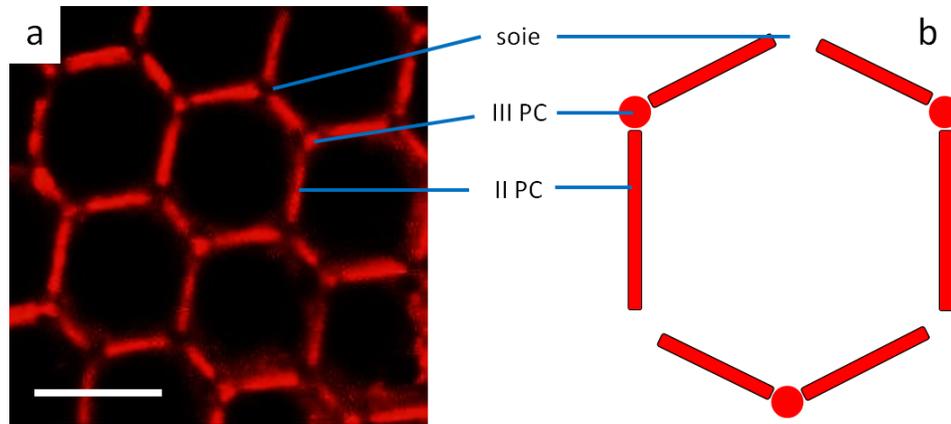
Les anticorps polyclonaux dirigés contre Spen ont été produits chez le lapin avec deux peptides correspondant aux acides aminés 238-252 (PEK-SISNNSPTPRET) et 259-273 (NVESQPKLSNESTPQ) (SpeedRabbit Eurogentec ). Les anticorps spécifiques ont été titrés par ELISA puis purifiés

par chromatographie d'affinité.

## **2.7 Visualisation des cellules interommatidiales par la méthode de neutralisation de la cornée**

L'œil de *Drosophile* est recouvert d'une cornée sécrétée par les cellules cônes. Avec l'air, la cornée forme un système dioptrique convergent qui rend les analyses microscopiques impossibles. Dans les années 80, un groupe a réussi à observer les cellules de l'œil en appliquant un film fin sur la cornée d'un milieu ayant le même indice de réfraction que la cornée (comme de l'eau par exemple). Ceci afin de neutraliser le dioptrique de la cornée (Franceschini et al. 1981). En 2001, un groupe américain optimise cette méthode en plongeant intégralement la tête de la mouche dans l'eau et en utilisant un objectif à immersion à eau. Cette approche a permis d'ouvrir de larges études via la visualisation des photorécepteurs (Pichaud and Desplan 2001). Dans cette même étude les auteurs montrent que les cellules interommatidiales peuvent être visualisées par cette technique à cause de la présence de pigments autofluorescents. Toutefois aucun groupe n'a par la suite utilisé cette approche pour l'étude des cellules interommatidiales. La microscopie à cette époque n'était probablement pas assez fine pour distinguer les cellules l'une de l'autre. D'ailleurs les auteurs ont à l'époque pensé que les soies étaient observables. La visualisation chez l'adulte des cellules interommatidiales se fait par autofluorescence grâce à la présence de pigments dans certaines cellules accessoires de l'œil (Fig. 2.1).

Environ 45 heures après la formation de la pupe, les IOC's produisent deux types de pigment majoritairement, les pigments de type I et les pigments de type II. Les granules de type I contiennent un pigment marron appelé xanthommatine ou encore ommochrome. Les granules de type I sont contenus dans toutes les cellules formant un ommatidium sauf les soies (Cagan and



**Fig. 2.1. Visualisation des cellules interommatidiales par la méthode de neutralisation de la cornée**(a) Image par microscopie confocale des cellules interommatidiales d'un œil de mouche adulte. Les cellules sont observables par autofluorescence via la technique de neutralisation de la cornée. La barre d'échelle représente  $15 \mu\text{m}$ . (b) Schéma d'une ommatidie où sont représentées les cellules pigmentaires secondaires (II PC), tertiaires (III PC). On note que les soies ne sont pas visibles par cette technique.

Ready 1989a, Shoup 1966, Wolff and Ready 1993). Les granules de type II contiennent deux pigments, la xanthommatin et la drosopterin. Ce dernier de couleur rouge, aussi appelé pteridine est trouvé principalement dans les cellules pigmentaires secondaires et tertiaires. C'est ce pigment que l'on peut visualiser avec cette approche.

Le protocole suivi au cours de ma thèse est sensiblement le même que dans l'étude pionnière (Pichaud and Desplan 2001) : Les mouches sont anesthésiées au  $\text{CO}_2$  puis fixées dans une boîte de petri 5 cm remplie à moitié d'agarose 2% chauffé à  $55^\circ\text{C}$ . Les mouches sont maintenues sous anesthésie jusqu'à ce que l'agarose devienne solide. Les mouches sont ensuite couvertes d'eau froide. L'observation des cellules interommatidiales se fait avec un microscope zeiss LSM 700 et un objectif 40x à eau. La longueur d'onde d'excitation utilisée est 554nm.

## 2.8 Extraction d'ARNm et PCR quantitative

Les extraits d'ARN totaux ont été isolés à partir de 25-35 têtes (Triazol Reagent Qiagen) traitées ou non au Paraquat. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été obtenus suite à une réaction de reverse-transcription (Bio-rad) effectuée sur 400ng d'extraits d'ARN totaux, en utilisant les primers "random". Les ADNc sont dilués 10x dans de l'eau sans RNases puis amplifier avec un kit Sybergreen (absolute qPCR SYBR Green ROX mix, Roche, 4913850) avec le cycle suivant : 95 °C 15 min ; 40 cycles à 95 °C 15s, 59 °C, 15s, 72 °C 30s ; 1 cycle 95 °C 30s ; 1 cycle 50 °C 30s et la "melting curve" 50 °C à 95 °C à 1 °C/10s afin de vérifier la spécificité du produit amplifié. Tous les échantillons ont été analysés sur un instrument Roche StepOnePlus. Nous avons utilisé le gène de ménage *rp49* qui s'avère être le plus stable dans nos expériences. L'expression relative des gènes a été obtenue en suivant la méthode de Pfaffl (Pfaffl 2001), les graphes ont été faits avec le logiciel Prism.

Séquence des primers utilisés :

pale-F AGTACGAGCCCGATTTGGACATGA

pale-R TCCGTA CTTGTAGGCGAATGCGAT

vmat-F TTCACCGTAAACGCAAACACCACC

vmat-R GTTGATTGCTGTCCA ACTGCTGCT

dat-F GCAACTACATGATTTGAGCTTGA

dat-R CCTTGACCCAAAATGTGGAG

ddc-F TCTGGAGAATATACGCGAAAGG

ddc-R CACTTCTCCGGCTTCTCG

spen-F TTCGTTGTGGGATAGCAGCA

spen-R CGTTCGAAGCTGTTTGTCG

rp49-F CGGATCGATATGCTAAGCTGT

rp49-R GCGCTTGTTGATCCGTA

Chaque couple de primer a été validé en réalisant une courbe de dilution

sur 11 logs avec une efficacité tolérée entre 1,9 et 2,1.

## **2.9 Résistance au stress**

Afin d'induire un stress oxydatif, les mouches ont été nourries sur un milieu contenant du paraquat. Des tubes de 50 ml ont été utilisés, contenant un milieu solide composé de low melting agar 1.3%, 1% de sucrose et 10mM de paraquat (Sigma-aldrich). L'expérience contrôle est faite avec le même milieu sans paraquat. Le paraquat est ajouté à l'agar liquide en dessous de 45°C afin de ne pas dénaturer le paraquat qui est thermolabile. Pas plus de 20 mouches sont traitées par tube. Les traitements sont faits à 25°C.

## **2.10 Test de Survie**

Pour évaluer la survie des mouches, les mouches sont maintenues sur le milieu contenant le paraquat jusqu'à leur mort. Les morts sont comptés deux fois par jour au moins. Les résultats de survie sont analysés via une analyse log-rank Test grâce au logiciel Prism.

## **2.11 Analyses Statistiques**

Toutes les analyses et tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Prism (GraphPad).

# Chapitre 3

## Résultats

### 3.1 Le gène *Split ends* (*spen*) est requis pour la survie des cellules interommatidiales durant le développement pupal de la *Drosophile*

#### 3.1.1 *Spen* EST REQUIS POUR LE DÉVELOPPEMENT DES IOCS DANS LA RÉTINE

Dans l'œil en développement, les cellules interommatidiales (IOCs) en excès sont éliminées par apoptose pour obtenir une structure hexagonale parfaite. 42 heures après la formation de la puppe, la disposition des cellules est établie et chaque groupe de photorécepteur est entouré de quatre cellules cônes, trois soies, deux cellules pigmentaires primaires, six secondaires et trois tertiaires (Fig. 1.1). La visualisation des cellules de l'œil en formation a l'avantage de permettre de différencier les différents types cellulaires. Toutefois, le marquage est contraignant du moment que les pupes doivent être synchronisées dans le temps et que les expériences dans la puppe sont limitées d'un point de vue génétique. Afin de palier à ses contraintes, nous avons utilisé le fait que les IOCs expriment un pigment autofluorescent visible au microscope (voir Matériels et Méthodes). Cette approche par immersion de l'œil permet de simplement visualiser le nombre et la disposition des cellules pigmentaires secondaires et tertiaires dans l'œil adulte (Fig. 2.1).

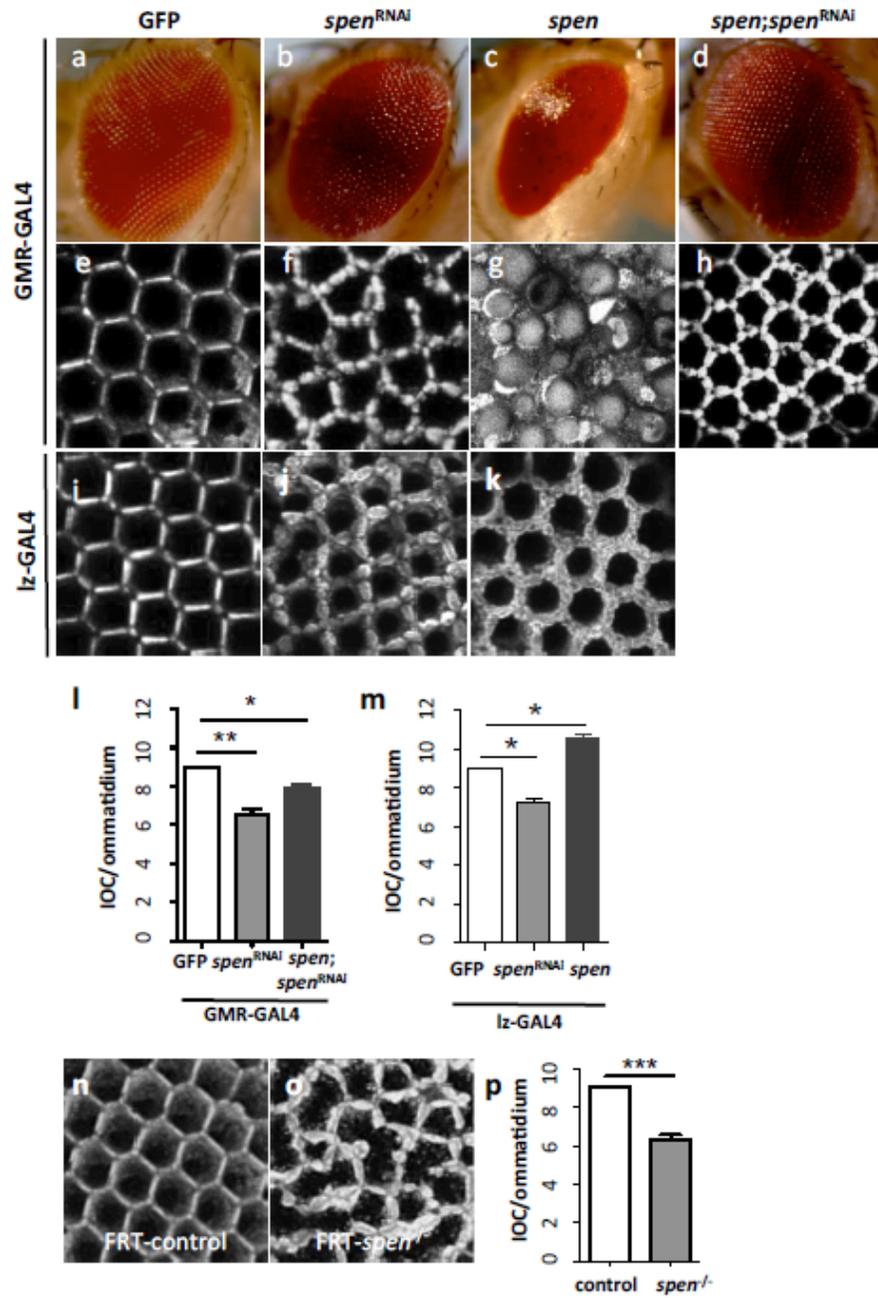
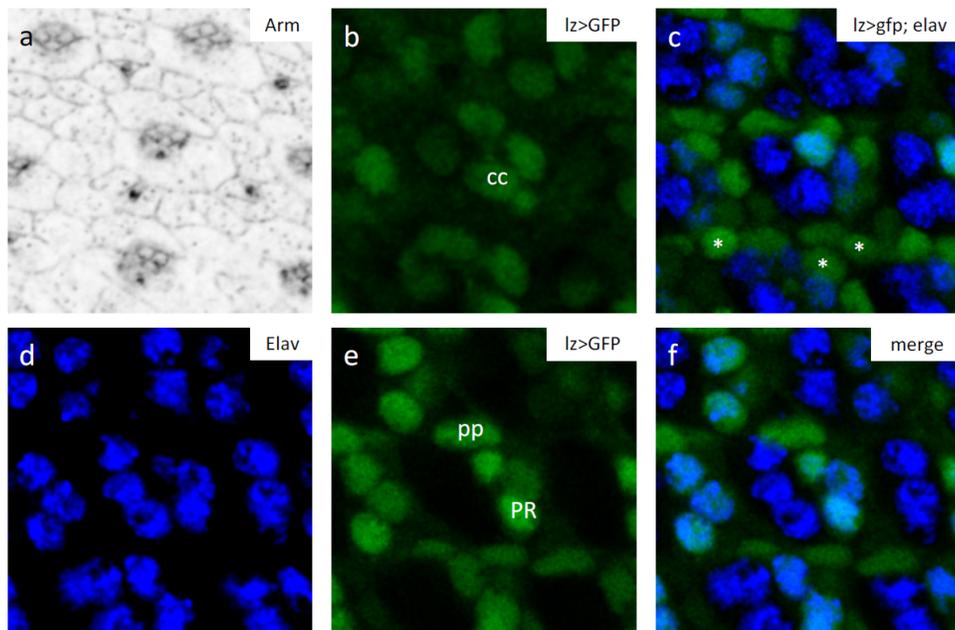


Fig. 3.1. *Spen* est requis pour la survie des IOCs.

**Fig. 3.1 :** (a-d) Images par microscopie optique d'œil adulte de *Drosophila* : (a) GMR-GAL4>UAS-GFP (GMR>GFP), (b) GMR>*spen*<sup>ARNi</sup>, (c) GMR>*spen*, and (d) GMR>*spen*;*spen*<sup>ARNi</sup>. (e-h) Visualisation des cellules interommatidiales (IOCs) pour les mêmes géotypes avec la technique de neutralisation de la cornée. La surexpression de *spen* sauve la perte des IOCs suivant l'inactivation de *spen* (comparer f and h). (i-k) IOCs d'œil adulte visualisées par la méthode de neutralisation de la cornée : (i) *lz*>GFP, (j) *lz*>*spen*<sup>ARNi</sup>, (k) *lz*>*spen*. La surexpression de *spen* (k) augmente le nombre d'IOCs comparé aux mouches contrôles (i). (l, m) Quantification des IOCs par ommatidium des rétines présentées dans (l) les panels e, f, and h ; (m) panels i, j, et k ; and (p) panels l and m. (n, o) IOCs d'œil adulte visualisées par neutralisation de la cornée : contrôle *spen* (*yw* ; FRT40A/FRT40GMR-hidCL ; EGUF) (n) et œil complet mutant pour *spen* (*yw* ; FRT40A *spen*<sup>5</sup>/FRT40GMR-hidCL ; EGUF) (o). (p) Quantification des IOCs par ommatidium dans les rétines présentées dans les panels n et o. Moyenne  $\pm$  erreur standard of  $n \geq 10$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . test-t de student.

Afin d'examiner le rôle de *spen* dans le développement pupal des IOCs, nous avons inhibé *spen* en exprimant *spen*ARNi en utilisant les drivers GMR-GAL4 et *lozenge*-GAL4 (*lz*-GAL4) (Fig. 3.1). Le driver GMR est connu pour être exprimé dans toutes les cellules différenciées de l'œil dans la larve ou la pupa. L'expression de *lz* est plus restreinte. Ce gène contrôle la différenciation de certains photorécepteurs (R1, R6 et R7), des cellules cônes et l'élimination des IOCs (Daga et al. 1996, Wildonger et al. 2005). Dans ce sens, nous avons trouvé que *lz*>GFP est exprimé dans peu de photorécepteurs et dans toutes les cellules cônes et interommatidiales dans la pupa (Fig. 3.2). L'inactivation de *spen* avec le driver GMR conduit à la perte de photorécepteur comme il l'a déjà été montré (Doroquez et al. 2007, Fig. 3.3). Ce phénotype est attribué à un rôle de *spen* dans la différenciation des photorécepteurs.

L'inactivation de *spen* dans l'œil de *Drosophila* conduit à une complète désorganisation des IOCs par rapport aux mouches contrôles. De plus les IOCs dans ce contexte paraissent plus gonflées et immatures. Avec le driver GMR-GAL4, la surexpression de *spen* est telle qu'il est impossible de caractériser la structure des IOCs. La méthode de neutralisation de la cornée



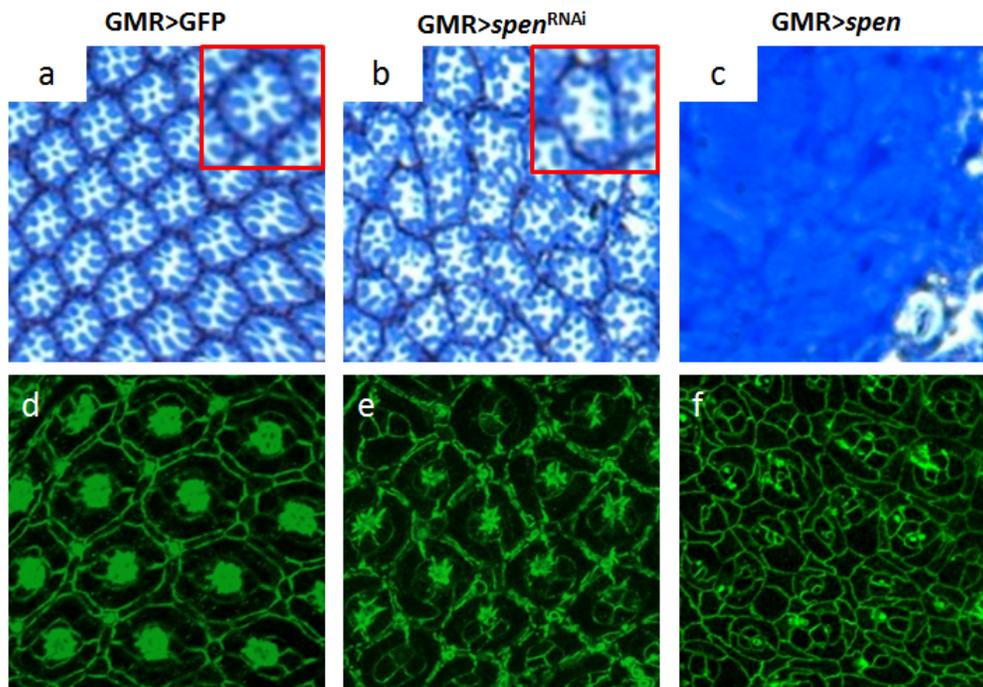
**Fig. 3.2. Profile d'expression du driver *lz*-GAL4 dans les rétines de *Drosophile*.** Toutes les images présentent des rétines de pupes 26 heures APF et exprimant *lz*>nlsGFP. (a) Marquage anti-Arm permettant de visualiser les membranes. (b) GFP nucléaire montrant l'expression de *lz*-GAL4 dans les quatre cellules cônes (cc). (c) GFP nucléaire indiquant l'expression de *lz*-GAL4 dans toutes les IOCs (plusieurs IOCs sont indiquées par \*). L'immunomarquage anti-Elav permet d'identifier les photorécepteurs (PR) (bleu). (d-f) Les photorécepteurs Elav positifs (d) présentent une expression nucléaire de *lz*-GAL4 (e). (f) Merge de (d) et (e). *Lz*-GAL4 est exprimé dans un sous-groupe de photorecepteurs. pp = cellule pigmentaire primaire.

permet de détecter les cellules interommatidiales secondaires et tertiaires, soit 9 cellules par ommatidie. L'inactivation de *spen* conduit à une perte d'environ deux cellules par ommatidies avec le driver GMR-GAL4 (Fig. 3.11). Afin de voir l'effet de la surexpression de *spen*, nous avons utilisé le driver *lozenge-GAL4* (*lz-GAL4*), qui est moins puissant que le driver GMR-GAL4. Avec *lz-GAL4*, l'inactivation de *spen* entraîne un défaut du nombre d'IOCs alors que la surexpression de *spen* conduit à un excès d'IOCs (Fig. 3.1, k et m). Ces résultats montrent que *spen* est requis pour obtenir le bon nombre d'IOCs dans l'œil adulte et qu'il aurait un rôle de survie.

Afin de mieux documenter les phénotypes obtenus en modulant l'expression de *spen*, nous avons tout d'abord réalisé des sections plastiques sur des yeux de *Drosophile* où *spen* est inactivé ou surexprimé (Fig. 3.3). Dans les mouches contrôles, les sections fines permettent d'observer la structure régulière et hexagonale des IOCs. L'inactivation par ARNi de *spen* désorganise cette structure, avec des ommatidies fusionnées entre elles certainement suite aux défauts liés aux IOCs. La surexpression de *spen* conduit à un phénotype dramatique où plus aucune structure n'est observable. Comme mentionné précédemment, il est possible de visualiser la structure du disque de puppe 42 heures APF. Pour cela nous avons utilisé des mouches exprimant la protéine Armadillo fusionnée à la GFP (*arm : :GFP*) (Fig. 3.3).

L'inactivation de *spen* désorganise la structure hexagonale des IOCs avec encore une fois un manque clair de certaines IOCs. Il est important de noter que tous les types cellulaires composant chaque ommatidie sont présents. Cependant on remarque qu'il manque dans certains cas des cellules cônes. Le résultat de la surexpression de *spen* dans la puppe est difficilement analysable étant donné que la désorganisation des ommatidies est telle que l'on ne peut plus différencier les différents types cellulaires (Fig. 3.3).

L'expression ectopique de *spen* avec le driver GMR-GAL4 induit un œil totalement désorganisé ayant un aspect vitreux. Ce phénotype est très pro-



**Fig. 3.3.** L'inactivation de *spen* affecte les photorécepteurs et les IOCs dans les rétines adultes de *Drosophile*. (a-c) Sections semi-fines d'œil exprimant (a) GMR>GFP, (b) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, et (c) GMR>*spen*. En (a) et (b), les inserts présentent les ommatidies à un plus fort grossissement. (d-f) Disques d'œil de pupes exprimant (d) GMR>GFP, (e) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, et (f) GMR>*spen* analysés 42 heures APF. Les mouches expriment la protéine fusion Arm : :GFP afin de visualiser les membranes.

bablement lié au fait que *spen* est requis pour la différenciation des photorécepteurs au cours du développement larvaire. La réexpression d'un ARNi contre *spen* dans ce contexte est suffisant pour supprimer le phénotype de l'œil et de restaurer le nombre d'IOCs proche d'un niveau normal (Fig. 3.1,d, h et l). Ce résultat montre la spécificité des lignées transgéniques utilisées pour moduler l'expression de *spen*.

Pour confirmer le rôle de *spen* dans la survie des IOCs, nous avons compté les IOCs dans des rétines mutantes pour *spen*, en utilisant un allèle nul de ce gène (*spen*<sup>5</sup>) (Kuang et al. 2000). Cet allèle entraîne l'apparition d'un codon stop au milieu de la protéine. La protéine est considérée comme nulle et ne complémente pas une délétion du locus *spen*. Tout comme avec l'expression d'un ARNi, les rétines mutantes pour *spen* présente une sévère diminution du nombre d'IOCs (Fig. 3.1n, o et p).

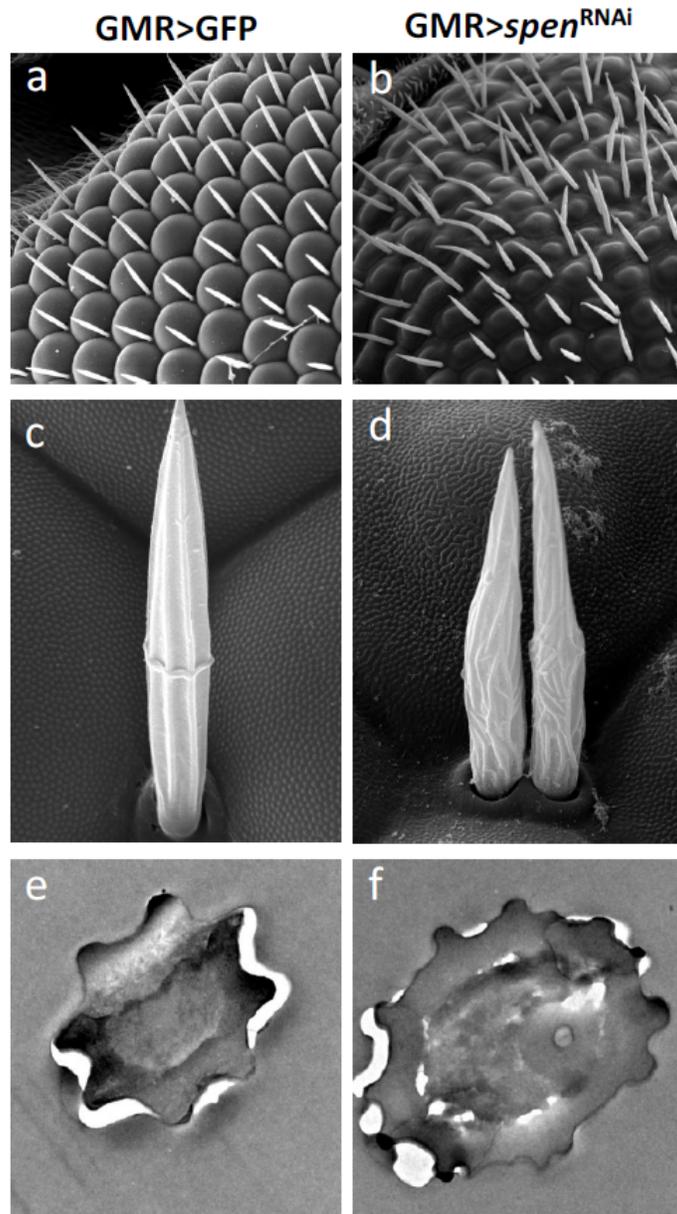
Afin de mieux décrire les phénotypes observés dans des yeux mutants pour *spen*, des images par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées sur des yeux contrôles et des yeux exprimant un ARNi contre *spen* (Fig. 3.4). Dans un œil sauvage, cette approche permet d'apprécier l'organisation régulière des soies, ainsi que des ommatidies (Fig. 3.4a et c). L'inactivation de *spen* conduit à une désorganisation des ommatidies et des soies. Les soies présentent des crêtes cytoplasmiques formées grâce au cytosquelette lors de leur formation. Une soie sauvage à des crêtes parallèles et régulières. Inactiver *spen* désorganise ces crêtes. Ces dernières sont plus nombreuses et ramifiées (Fig. 3.4b et d). Il est possible par microscopie électronique à transmission d'observer des coupes des soies (Fig. 3.4e et f). Dans une soie sauvage les crêtes sont régulièrement disposées autour du centre de la soie. Une soie provenant d'un œil où *spen* est inactivé à plus de crêtes, et ces crêtes sont plus petite et organisées de manière non-symétrique. Dans les rétines mutantes pour *spen* nous avons observé des soies par paire, contrairement à un tissu sauvage ou chaque soie est isolée. Ce phénotype est certainement dû à la

mort massive des IOCs les séparant en temps normal. Ces résultats suggèrent que *spen* est requis pour la différenciation terminale des soies.

### 3.1.2 *Spen* CONTRÔLE LA MORT PAR APOPTOSE DES IOCS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA RÉTINE

Ces premiers résultats montrent clairement que *spen* est un gène requis pour le bon développement de l'œil adulte. Inactiver *spen* conduit à des défauts à de nombreux niveaux de l'organisation de l'œil tel que la structure des rabdomères, la disposition des IOCs, et surtout le nombre d'IOCs. En effet, inactiver *spen* conduit à un défaut du nombre d'IOCs, alors que surexprimer *spen* dans l'œil conduit à un excès d'IOCs (Fig. 3.1). Une hypothèse pourrait être que *spen* intervienne dans la régulation de l'apoptose développementale des IOCs. Une seconde hypothèse pourrait être que les fonctions de *spen* dans le développement précoce de l'œil entraînent des défauts dans l'œil adulte.

Afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons inactivé *spen* dans l'œil de *Drosophila* uniquement à partir des stades pupaux, évitant ainsi tout défaut causé lors du développement larvaire. Pour cela, nous avons utilisé le système GAL4/GAL80 qui permet de contrôler l'expression dans le temps d'un transgène (voir Matériels et Méthodes). Brièvement, la protéine GAL80 est thermolabile et peut inactiver le facteur de transcription GAL4. Ainsi à 18°C, la protéine GAL80 est fonctionnelle, et le système UAS-GAL4 est inactif. Si les mouches sont mises à 30°C, la protéine GAL80 est dégradée, et le système UAS-GAL4 est activé. Les mouches contrôles expriment un ARNi contre la luciférase (lucARNi), ont un œil et une organisation des IOCs normaux, qu'elles soient élevées à 18°C ou que la protéine GAL80 soient inactivé à 30°C après la formation de la puppe. Les mouches exprimant un ARNi contre *spen* ne développe aucun phénotype de l'œil en présence de la protéine GAL80 et élevées à 18°C, ce qui prouve que le système GAL80 peut parfaitement inactiver l'expression de l'ARNi contre *spen*. En revanche,



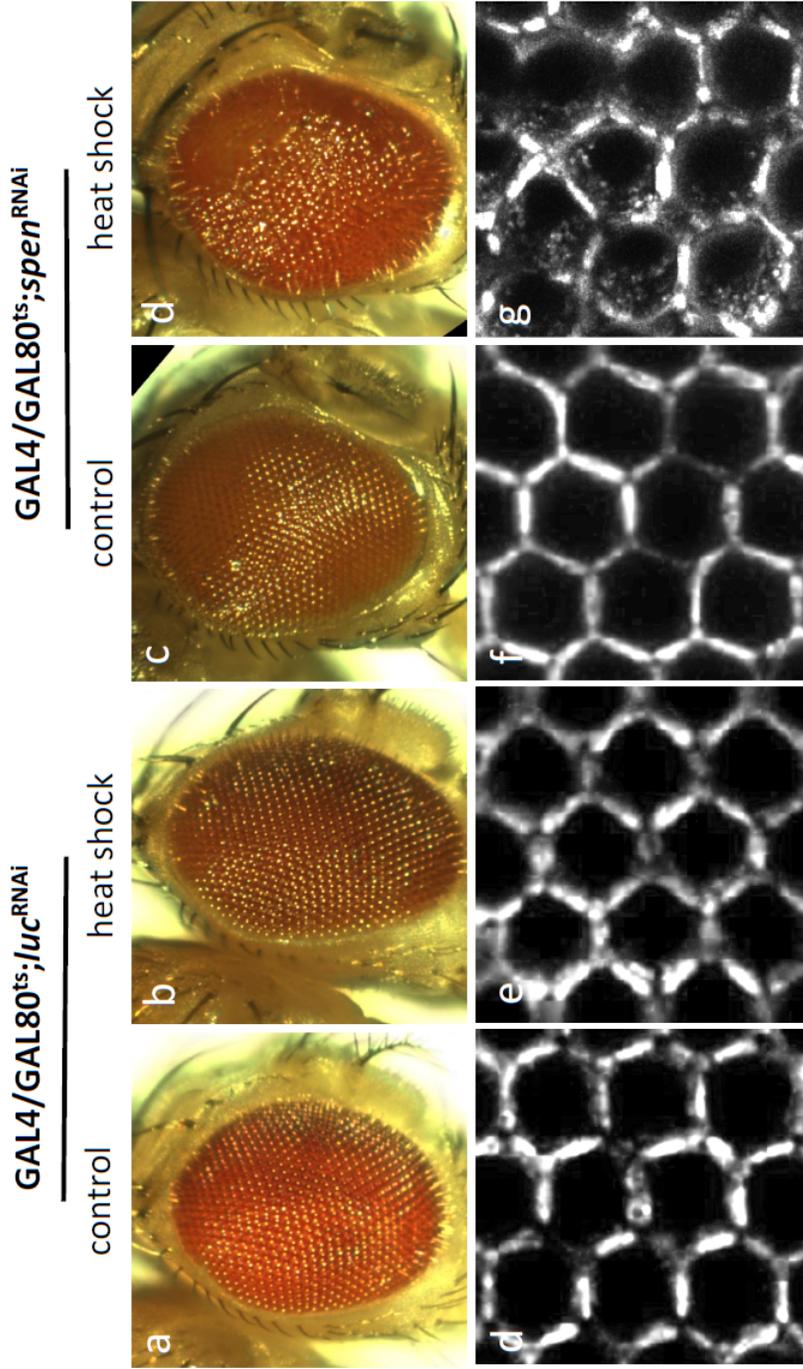
**Fig. 3.4.** *Spn* est requis pour la formation des soies de la rétine de *Drosophila*. (a-d) Images par microscopie électronique à balayage d'œil adulte GMR>GFP (a, c) et GMR>*spn*<sup>ARNi</sup> (b, d). (e, f) Sections horizontales à travers les soies de mouches GMR>GFP (e) et GMR>*spn*<sup>ARNi</sup> (f) obtenues par microscopie électronique à transmission.

si ces mouches sont mises de 18°C à 30°C après la formation de la puppe, l'œil devient rugueux, et la disposition et le nombre des IOCs sont affectés (Fig. 3.5). Après la formation de la puppe, les phases de division cellulaire et le recrutement des photorécepteurs sont achevés. A ce stade, seules les cellules cônes et les cellules pigmentaires se mettent en place. Cette expérience permet d'exclure tout effet précoce de *spen* sur le devenir des IOCs. D'ailleurs, *spen* est requis pour le recrutement correct des photorécepteurs, des cellules cônes et des cellules pigmentaires primaires dans le disque imaginal d'œil (Doroquez et al. 2007).

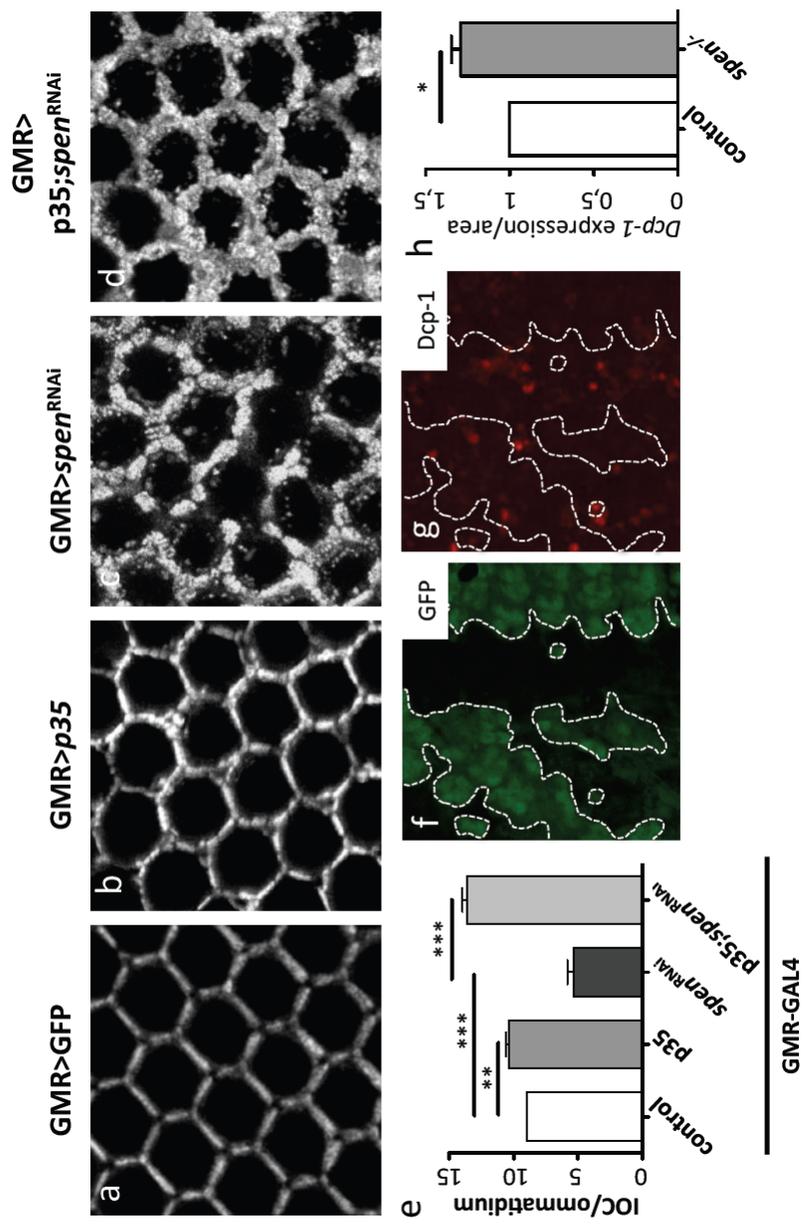
Une autre hypothèse permettant d'expliquer les IOCs manquantes lorsque *spen* est inactivé serait que ce gène participe dans la vague d'apoptose développementale. *Spn* aurait ainsi une action anti-apoptotique dans ce système. Un moyen simple de tester cette hypothèse est d'inhiber l'apoptose. En effet, si l'inactivation de *spen* conduit à un excès d'apoptose, alors bloquer l'apoptose devrait empêcher la perte excessive d'IOCs.

La protéine p35 du baculovirus a la propriété de bloquer les caspases effectrices (Hay et al. 1995). La surexpression de cette protéine dans l'œil de *Drosophila* bloque les vagues d'apoptoses sensées éliminer les IOCs. Il en résulte en un excès d'IOCs dans l'œil adulte (Fig. 3.6b et e) d'environ deux cellules par ommatidium. Exprimer un ARNi contre *spen* conduit à un excès de mort d'environ 4 cellules (Fig. 3.6 c et e). De manière intéressante, inhiber l'apoptose via la protéine p35 sauve totalement la mort des IOCs induite par l'inactivation de *spen*. En accord avec ce résultat, le marquage contre la protéine Dcp-1 clivée (un marqueur d'activation d'apoptose) augmente dans un clone *spen* mutant 28-30 heures APF (Fig. 3.6f,g et h). L'inactivation de *spen* conduit ainsi à un excès d'apoptose.

De manière surprenante, la co-expression de p35 et *spen* ARNi sauve plus d'IOCs que p35 seul. Ce résultat peut être expliqué par le fait que *spen* pourrait aussi être impliqué dans le réarrangement des cellules avant les



**Fig. 3.5. *Spen* est requis pour la survie des IOCs durant la formation de la puppe.** (a-d) Images d'oeil adultes par microscopie optique : (a, b) *GMR-GAL4/ubi-GAL80<sup>ts</sup>;UAS-luciferase<sup>ARNi</sup>* et (c, d) *GMR-GAL4/ubi-GAL80<sup>ts</sup>;UAS-spen<sup>ARNi</sup>* en (b, d) ont été élevée à 18°C jusqu'à ce que la puppe soit formée, après quoi les mouches sont placées à la température restrictive (30°C) durant 5 heures. (e-h) représentent les IOCs des mouches présentées en (a-d), visualisées par neutralisation de la cornée. L'induction de *spen<sup>ARNi</sup>* durant 5 heures APF est suffisante pour induire un phénotype œil rugueux et la perte d'IOCs dans les rétines adultes.

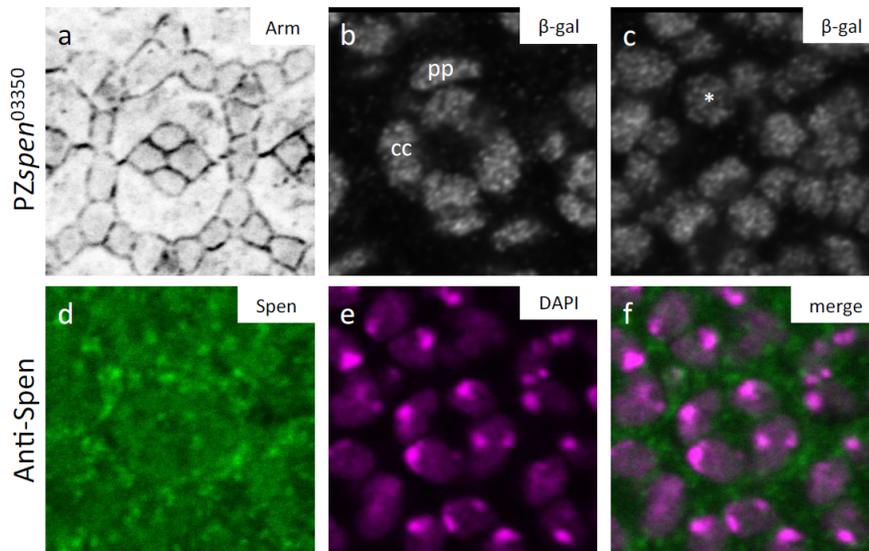


**Fig. 3.6. L'inhibition de l'apoptose sauve la mort des IOCs dans des mouches mutantes pour *spen*.** (a-d) IOCs de mouches adultes visualisées par neutralisation de la cornée : (a) GMR>GFP, (b) GMR>p35, (c) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, et (d) GMR>p35;*spen*<sup>RNAi</sup>. (e) Quantification des IOCs des rétines présentées en (a-d). Moyenne ± erreur standard pour  $n \geq 10$ .  $** p < 0.001$ ,  $* * * p < 0.0001$ , test-t de student. Inhibition de l'apoptose par l'expression de la protéine p35 augmente le nombre d'IOCs dans les mouches contrôles et sauve la perte des IOCs dans un contexte *spen* mutant. (f, g) Image par microscopie confocale de clone *spen*<sup>5</sup> mutant générés avec *ey*-FLP. (f) Les clones mutants sont marqués par l'absence de GFP. (g) Immunomarcage Dcp-1 28 heures APF. (h) Quantification du marquage Dcp-1 dans des clones sauvages ou *spen*<sup>5</sup> mutants. L'expression de Dcp-1 augmente dans les clones mutants pour *spen*. Moyenne ± erreur standard pour  $n \geq 10$ .  $* p < 0.01$ . Test de Mann-Whitney.

vagues d'apoptose. Ainsi inhiber *spen* mettrait plus d'IOCs en contact avec les signaux de survie, ce qui combiné au blocage de l'apoptose conduirait à un excès d'IOCs. D'ailleurs l'inactivation de *spen* conduit à une perte d'IOC mais aussi en une désorganisation non-homogène de la position des IOCs, ce qui suggère fortement que *spen* intervient dans le patterning des IOCs en plus de la régulation de la mort. De plus, environ 5 extra IOCs sont comptés en co-exprimant p35 et *spen* ARNi ce qui est similaire aux clones mutants *dark* ou *dronc* où l'apoptose est complètement inhibée. Ainsi, en plus de son rôle de survie, *spen* pourrait intervenir dans l'arrangement des IOCs pour leur correct positionnement et élimination (voir discussion).

### 3.1.3 *Spen* RÉGULE LA SURVIE DES IOCS DE MANIÈRE NON-AUTONOME À PARTIR DES CELLULES CÔNES

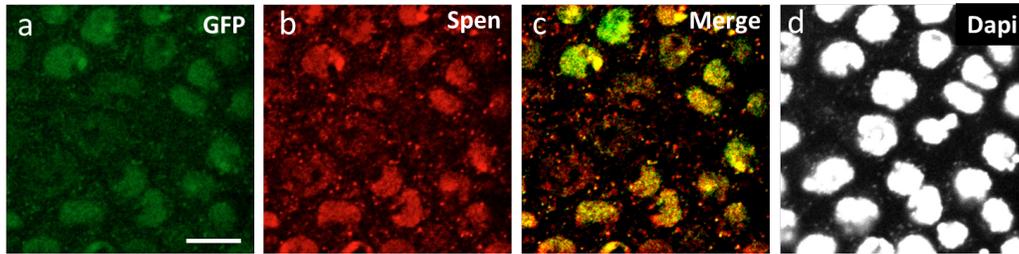
Afin de comprendre comment le gène *spen* intervient dans la régulation de l'élimination des IOCs en excès, il est intéressant de savoir dans quelles cellules *spen* intervient. Il a été proposé que l'élimination des IOCs en excès est le résultat de signaux de survie et de mort émanant des cellules pigmentaires primaires ou des cellules cônes (Miller and Cagan 1998). On s'est donc interrogé quant à la spécificité cellulaire de *spen*. A l'aide d'une lignée enhancer trap (*PZspen*<sup>03350</sup>), nous avons observé que *spen* est exprimé ubiquitairement dans le disque d'œil de puppe avant et après les vagues d'apoptose (Fig. 3.7). En parallèle, nous avons généré un anticorps dirigé contre *spen* (cet anticorps reconnaît chacune des isoformes de la protéine). La spécificité de l'anticorps a été vérifiée par analyse clonale (Fig. 3.8). Le niveau de protéine est sévèrement réduit dans les clones mutants. Le signal restant est certainement du bruit de fond. Cet anticorps a confirmé l'expression ubiquitaire de *spen* dans le disque d'œil pupal (Fig. 3.7d, e et f). Le gène *spen* code pour une protéine nucléaire. Jusque-là, les études sur ce gène ont été faites dans l'embryon et la larve de *Drosophile*. Dans tous les cas les études ont rapporté que *spen*



**Fig. 3.7. *Spen* est exprimé ubiquitairement dans le disque pupal d'œil.** (a-c) Rétines de pupe de mouche portant l'enhancer trap  $PZspen^{03350}$  et analysées 26 heures APF. (a) Marquage anti-Arm. (b, c) Marquage anti- $\beta$ -galactosidase montrant l'expression de *spen* dans les cellules pigmentaires primaires (pp) et dans les cellules cônes (cc). \* en (c) indique un noyau d'IOC. (d-f) Rétines de pupes de mouches sauvages (Canton-S) analysées 42 heures APF. (d) Marquage anti-Spen montrant son expression dans les cellules cônes. (e) marquage nucléaire au DAPI. (f) Merge de (d) et (e), montrant la localisation cytoplasmique et nucléaire de *spen*.

était exprimé ubiquitairement (Kuang et al. 2000, Wiellette et al. 1999), ce qui est en accord avec nos résultats dans le disque pupal.

Le patron d'expression de *spen* dans le disque de pupe ne permet pas d'émettre une hypothèse quant aux cellules requises pour l'action de *spen*. Afin de déterminer la contribution de chaque type cellulaire dans le rôle de *spen* dans la survie es IOCs, nous avons réalisé une analyse statistique sur des ommatidies mosaïques mutantes pour *spen* à la bordure des clones mitotiques, tout comme cela a été décrit pour les mutants *spalt* (Domingos et al. 2004). Dans ces ommatidies mosaïques la proportion de cellules mutantes ou sauvages pour chaque type cellulaire est aléatoire. Le ou les types cellulaires importants pour le rôle de survie de *spen* induiront un biais du nombre d'IOCs



**Fig. 3.8. L'expression de Spen est sévèrement réduite dans des clones *spen* mutants.** (a-d) Images par microscopie confocale de disque imaginal de troisième instar larvaire dans lequel des clones *spen*<sup>5</sup> mutant ont été induits avec T155-FLP. Les clones *spen* mutant n'expriment pas la GFP (a). (b) Immunomarquage contre la protéine Spen. (c) Merge de (a) et (b) montrant la disparition du signal Spen dans les clones mutants. (d) marquage des noyaux au DAPI. La barre d'échelle est 5 $\mu$ m.

dans chaque ommatidie en fonction du nombre de cellules mutantes. Nous avons donc analysé un grand nombre d'ommatidies mosaïques et compté le nombre d'IOC en fonction du nombre de cellules mutantes pour chaque type cellulaire (Fig. 3.10). Une hypothèse attractive serait que *spen* agit directement au niveau des IOCs pour leur survie. Cependant nous avons observé lors de cette analyse que *spen* n'est pas requis de manière cellule-autonome dans les IOCs, du moment que le nombre d'IOCs mutantes pour *spen* ou sauvage est en moyenne le même dans les ommatidies mosaïques (Fig. 3.10c). En effet, si *spen* était requis dans les IOCs pour leur survie, alors on devrait en moyenne avoir moins d'IOCs mutantes dans les ommatidies mosaïques étant donné que les IOCs mutantes meurent plus. Afin de confirmer ce résultat, nous avons utilisé un driver GAL4 spécifique des IOCs (54C-GAL4). Ce driver est exprimé uniquement dans les cellules pigmentaires primaires et secondaires dans le disque de pupa (Fig. 3.9a, b et c). Afin de vérifier si ce driver est assez puissant pour exprimer un ARNi, nous avons exprimé à l'aide de ce driver un ARNi contre le gène *white* qui code un pigment rouge présent dans les IOCs. L'expression de cet ARNi permet de sévèrement réduire le niveau des pigments (Fig. 3.9d, e et f). Cela montre que ce driver est capable

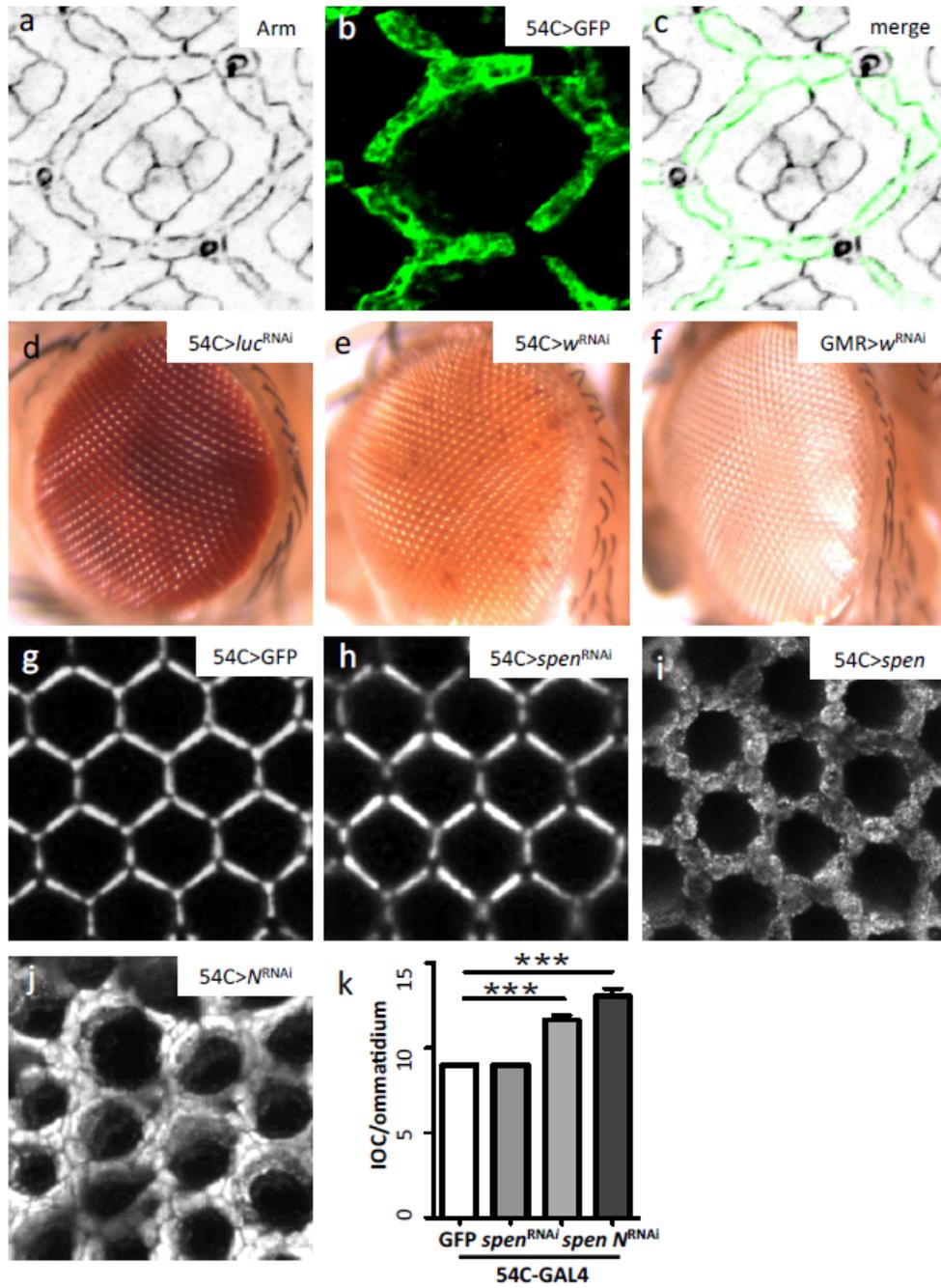


Fig. 3.9. L'inactivation de *spen* dans les IOC's n'affecte pas la survie des IOC's. Voir légende ci-dessous

**Fig. 3.9 :** (a-c) Rétines de pupes de mouche exprimant UAS-APC2 :GFP sous le contrôle de 54C-GAL4 42 heures APF. (a) Marquage anti-Arm ; (b) expression de la GFP membranaire ; et (c) merge de (a) et (b) montrant le patron d'expression de 54C-GAL4. (d-f) Image de microscopie optique d'œil de *Drosophila* exprimant un dsARNi contre la luciférase (contrôle, d) et le gène *white* (e), les deux ARNi sous le contrôle de 54C-GAL4. Œil exprimant un dsARNi contre le gène *white* (f) sous le contrôle de GMR-GAL4. Les drivers 54C-GAL4 et GMR-GAL4 permettent l'expression de *white* dsARNi dans les IOCs, résultant en une réduction de la pigmentation rouge. (g-j) IOCs de 54C>GFP (g), 54C>*spen*<sup>ARNi</sup> (h), 54C>*spen* (i), and 54C>*Notch*<sup>ARNi</sup> (j) visualisées par neutralisation de la cornée. (k) Quantification des IOCs des rétines de (g-j). Moyenne  $\pm$  erreur standard pour  $n \geq 10$ .  $***p < 0.0001$  test-t de Student. L'inactivation de *spen* dans les IOCS n'a aucun effet sur leur nombre, mais la surexpression *spen* tout comme l'inactivation de Notch conduit à un excès d'IOCs.

d'induire un ARNi dans les IOCs. L'expression d'un ARNi contre *spen* avec le driver 54C ne cause aucun défaut au niveau des IOCs, que ce soit leur nombre ou leur disposition (Fig. 3.9g et h). La même expérience a été réalisée en ajoutant une construction UAS-*dicer* afin d'amplifier la machinerie ARN interférent. De manière intéressante, l'expression de *spen* dans les IOCs augmente le nombre d'IOCs de la même manière que l'expression de Notch ARNi (Fig. 3.9i, j et k). Il a déjà été montré que l'inhibition de Notch conduit à un défaut d'apoptose des IOCs (Cagan and Ready 1989b). Notre résultat est ici en accord du moment que *spen* agit comme régulateur négatif de la voie Notch (Doroquez et al. 2007). L'ensemble de ces résultats confirment le fait que *spen* promeut la survie des IOCs de manière non cellule autonome mais à distance.

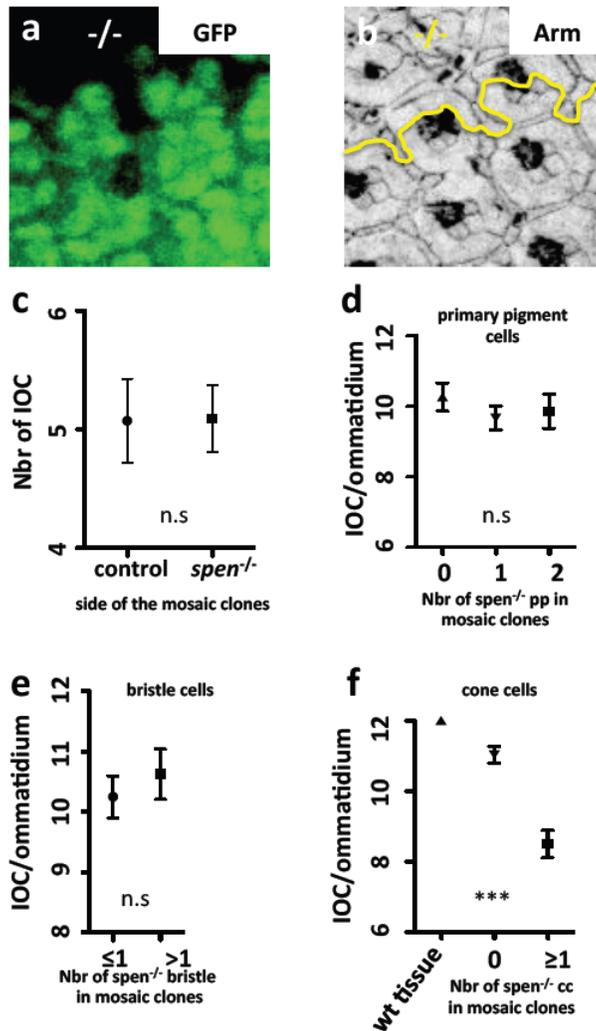
L'analyse des clones mosaïques a part ailleurs montré que ni les soies ni les cellules pigmentaires primaires n'étaient requise dans le rôle de survie de *spen* (Fig. 3.10d et e). En d'autres termes, le nombre de cellules pigmentaires primaires ou de soies mutées pour *spen* n'influence pas la survie des IOCs. En revanche, nous avons montré que le nombre d'IOCs est clairement diminué lorsqu'une ou plusieurs cellules cônes sont mutées (Fig. 3.10f). Plus il y a de cellules cônes mutantes pour *spen*, moins la survie des IOCs est assurée. Le

gène *spen* contrôle ainsi la survie des IOC's à partir des cellules cônes.

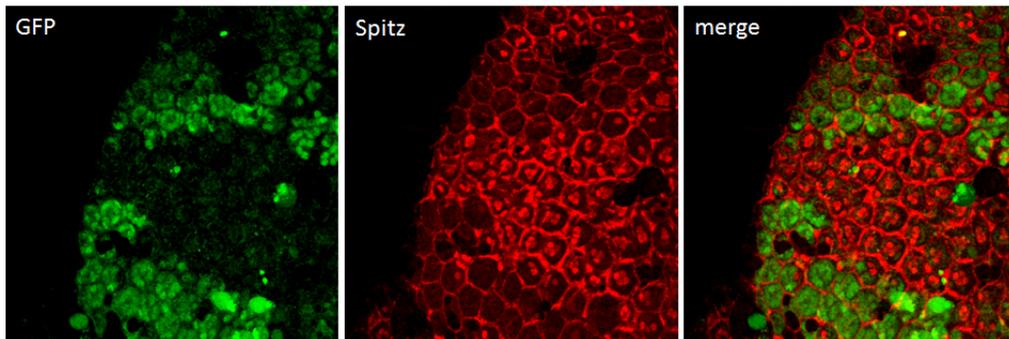
Nous montrons ici que le gène *split ends*, est requis pour la mise en place et la régulation du nombre de cellules interommatidiales dans l'œil de *Drosophila*. Son inhibition conduit à de dramatiques défauts, notamment une perte d'IOC's et une mauvaise disposition. Ce phénotype est sauvé par le blocage de l'apoptose ce qui montre que *spen* aurait une fonction anti-apoptotique. De plus *spen* agirait à partir des cellules cônes uniquement.

#### 3.1.4 *Spen* CONTRÔLERAIT LA MORT DES IOC'S EN CONTRÔLANT LE RELARGUAGE DU LIGAND SPITZ

Afin de commencer à comprendre comment *spen* régule la survie des IOC's, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation Notch et EGFR. La voie Notch est connue pour promouvoir la mort des IOC's alors que la voie EGFR enverrait des facteurs de survie. D'ailleurs, une étude a montré que *spen* antagonise la voie Notch et favorise la voie EGFR dans l'œil en développement, ce qui serait en accord avec nos résultats. Nous avons immunomarcqué des disques d'œil de pupes contenant des clones *spen* contre E(splt), un marqueur d'activation de la voie Notch. Toutefois nous n'avons vu aucune variation des niveaux de cette protéine lors de la vague d'apoptose 28-30 heures APF. Nous avons analysé l'expression de Spitz, le ligand du récepteur de la voie EGF. Dans un tissu sauvage *spitz* est exprimé dans toutes les IOC's (Miller and Cagan 1998). L'inactivation de *spen* entraîne une augmentation des niveaux de *spitz* dans les IOC's, mais surtout une accumulation de ce ligand dans les cellules cônes (Fig. 3.11). Ce résultat est d'autant plus intéressant que *spitz* serait contrôlé par rétention dans la cellule qui le produit (Schlesinger et al. 2004). Une hypothèse attractive serait que *spen* soit requis pour le relargage de Spitz à partir des cellules cônes contrôlant ainsi la survie des IOC's.



**Fig. 3.10. La survie des IOCs nécessite l'expression de *spen* dans les cellules cônes.** (a, b) Images par microscopie confocale de disque d'œil pupal 42 heures APF marqués contre Armadillo (a). Des clones *spen* mutants sont générés par T155-FLP. Les clones *spen* mutant n'expriment pas la GFP. La ligne jaune en (b) marque la bordure du clone. (c) Quantification des IOCs (cellules pigmentaires secondaires et tertiaires) par ommatidium mosaïque en comparant le côté sauvage et le côté mutant pour *spen*. (d-f) Quantification des IOCs par ommatidium de manière relative au nombre de cellules pigmentaires primaire mutantes (d), de soies mutantes (e), ou de cellules cônes mutantes (f). Moyenne  $\pm$  erreur standard pour  $n \geq 10$ . ns = non significatif et \*\*\* $p < 0.0001$ . Test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le nombre de cellules cônes mutantes pour *spen* influence le nombre total d'IOCs dans les tissus mosaïques.



**Fig. 3.11. Spitz s'accumule dans les cellules cônes et les IOCs dans les clones *spen* mutants.** (a-c) Images par microscopie confocale de disque pupaux d'œil observées 35 heures APF dans lequel des clones *spen*<sup>5</sup> mutant ont été induits avec T155-FLP. Les clones *spen* mutant n'expriment pas la GFP (a). (b) Immunomarquage contre la protéine Spitz. (c) Merge de (a) et (b) montrant l'accumulation de Spitz dans les cellules cônes dans les clones mutants. La barre d'échelle est 20 $\mu$ m.

### 3.2 *Spen* est nécessaire à la résistance au stress oxydatif dans le cerveau adulte

Nos premiers résultats générés lors de l'étude du rôle de *spen* sur le développement des cellules interommatidiales ont mis en évidence une fonction de ce gène dans la survie des cellules de manière non-autonome ("non cell-autonome"). Nous avons émis l'hypothèse que cette fonction de *spen* pourrait être conservée dans un contexte neuro-dégénératif et non plus développemental.

Dans ce contexte général, plusieurs raisons nous ont conduit à utiliser la Drosophile pour étudier le rôle des cellules gliales et notamment du gène *spen* dans la maladie de Parkinson (Parkinson Disease, PD). En premier lieu, la maladie de Parkinson est facilement modélisable chez la Drosophile. Plusieurs gènes dont la mutation conduit à la maladie chez l'homme sont très bien conservés chez la Drosophile et plusieurs modèles génétiques ont été développés chez la mouche. Par ailleurs des agents chimiques connus pour être responsable du développement de la maladie de Parkinson peuvent aussi être utilisés pour modéliser la maladie chez la mouche (Botella et al. 2009, Whitworth 2011). C'est notamment le cas du paraquat (PQ). Cet agent chimique a longtemps été utilisé comme pesticide dans le monde agricole avant d'être interdit pour des raisons de santé publique (Akhavain and Linscott 1968). Le paraquat est connu pour interagir avec la chaîne respiratoire mitochondriale et la bloquer, entraînant de ce fait un stress oxydatif. Cet agent chimique est ainsi connu pour causer les symptômes de type Parkinson (Koller 1986). De façon intéressante, la transcription du gène *spen* est modifiée en réponse à une exposition au paraquat (Girardot et al. 2004). Le gène *spen* étant nécessaire au développement et au maintien des cellules gliales chez la Drosophile (Chen and Rebay 2000), on pouvait considérer qu'il s'agisse d'un gène glial dont les fonctions reflètent pour partie celles qui sont exercées par la microglie et les

astrocytes chez les mammifères dans les situations de mort neuronale.

Dans un contexte où le rôle des cellules gliales sur la survie des neurones dopaminergiques n'est pas clair, nous avons étudié le rôle de *spen* dans la glie sur la survie neuronale dans un modèle de toxicité de type stress oxydatif induit par le paraquat.

### 3.2.1 L'EXPRESSION DU GÈNE *spen* EST MODULÉE EN RÉPONSE À UN TRAITEMENT AU PARAQUAT

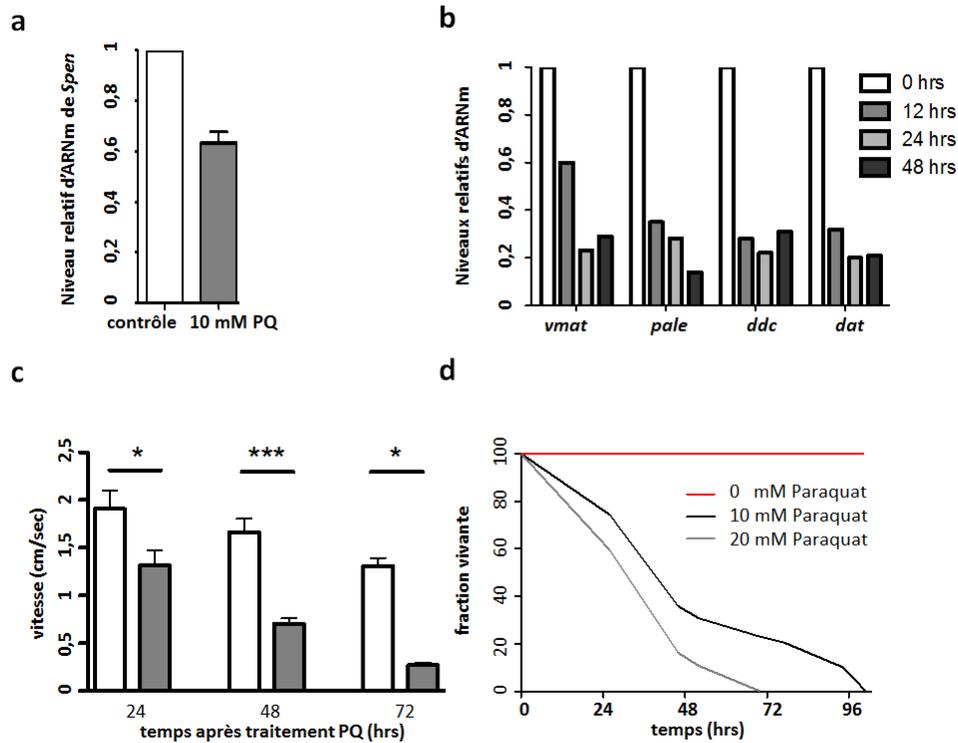
Afin de comprendre les mécanismes de réponse communs à différents stress, une équipe a analysé la réponse transcriptionnelle à l'échelle du génome à différents stress dont un stress de type oxydatif chez la mouche (Girardot et al. 2004). Des mouches adultes ont ainsi été soumises à un traitement par ingestion au paraquat connu pour conduire à la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS reactive oxygen species) et donc induisant un stress oxydatif. Cette étude a montré que 24 heures après un traitement au paraquat (10 mM), l'expression du gène *spen* était réprimée d'environ 30%. Par contre, l'expression de *spen* reste inchangée en réponse à la tunicamycine entraînant un stress du réticulum endoplasmique (RE). La modulation de *spen* semble donc spécifique à un traitement paraquat. Une simple étude transcriptomique ne suffit pas pour conclure sur les fonctions ou l'implication d'un gène dans un processus donné, d'autres études seront nécessaires pour venir confirmer ou infirmer cette observation.

Nous avons tout d'abord confirmé par q-PCR la diminution de l'expression du gène *spen* après ingestion de PQ par des mouches adultes. Le locus de *spen* code pour différents isoformes (voir introduction), ainsi nous avons choisis nos primers via un chevauchement intronique sur deux exons communs à tous les isoformes (voir matériel et méthode). Afin de reproduire le résultat de l'équipe précédemment citée, des mouches sauvages âgées de 3 jours ont été mises en présence de 10 mM de PQ pendant 24 heures. Les mouches ont

été ensuite broyées, l'ARN extrait puis reverse-transcript, et l'expression de *spen* analysée par q-PCR (Fig. 3.12a).

### 3.2.2 L'EXPOSITION AU PARAQUAT ENTRAÎNE UNE PERTE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES ET L'APPARITION DE DÉFAUTS LOCOMOTEURS ET DE SURVIE

Les défauts de locomotion visibles chez les malades atteints de Parkinson sont une conséquence de la perte des neurones dopaminergiques particulièrement sensibles au stress oxydatif (Fahn and Cohen 1992). Afin de vérifier la toxicité de l'exposition des mouches au paraquat sur les neurones dopaminergiques, nous avons mesuré la viabilité des neurones dopaminergiques en regardant l'activité transcriptionnelle de quatre gènes impliqués dans le métabolisme de la dopamine : *vmat*, *ddc*, *pale* et *dat*. *Pale* et *ddc* sont impliqués dans le métabolisme de la dopamine, *vmat* et *dat* sont impliqués dans le transport de la dopamine (Greer et al. 2005, Bertoldi 2014, Budnik and White 1987). Ces enzymes sont spécifiques des neurones dopaminergiques. Ainsi la mort de ces neurones se traduit directement par la perte d'expression de ces gènes. Nous avons analysé l'expression de ces gènes sur des extraits ARNm de têtes après avoir exposé les mouches au paraquat. Nous avons montré que dès 12 heures après le début d'un traitement au paraquat, l'activité des quatre gènes liés au métabolisme de la dopamine est sévèrement réduite (Fig. 3.12b). Ce résultat montre que l'exposition des mouches au paraquat affecte sévèrement la survie des neurones dopaminergiques. Chez l'homme, les corps cellulaires des neurones dopaminergiques situés au niveau de la substance noire projettent vers le striatum et sont essentiels à l'initiation des mouvements volontaires (Grace et al. 2007). Afin de comprendre si l'expression de *spen* est requise pour la résistance à un stress oxydatif, nous avons dans un premier temps validé plusieurs tests permettant d'évaluer la réponse des mouches à un traitement au paraquat.



**Fig. 3.12. L'expression de *spen* est modulée en réponse au paraquat (PQ), un agent chimique induisant la mort des neurones dopaminergiques.** (a) L'expression de l'ARNm de *spen* diminue en réponse à un traitement PQ (10 mM) de 24 h. Les ARNs ont été isolés à partir de 25 mouches mâles âgées de 72h puis rétro-transcrits avant d'être analysés par qPCR. Les données représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes avec l'écart-type. Test non-paramétrique de Mann-Whitney.  $*p < 0,05$ . (b) Dosage des transcrits de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de la dopamine. Les ARNm ont été isolés à partir de 25 mouches mâles après traitement au PQ (10 mM) ou en condition contrôle. Le traitement au paraquat entraîne une diminution de l'expression des 4 gènes reflétant la mort des neurones dopaminergiques. Les résultats sont issus de deux répliques biologiques indépendantes. (c) Capacités de mouches sauvages âgées de 72h à monter sur la paroi d'un tube après traitement au PQ. Chaque condition correspond à un groupe de 20 mâles après un traitement de 24, 48 ou 72h de PQ (10 mM) (histogrammes gris) ou en condition contrôle (histogrammes blancs). Test de Student :  $**p < 0,001$   $***p < 0,0001$ . (d) Evaluation de la survie de mouches sauvages exposées au PQ. Des groupes de 20 males sont placés sur différents milieux contenant différentes concentrations de paraquat. Leur survie sur ces milieux est évaluée au cours du temps.

Les deux tests utilisés sont : un premier test fonctionnel évaluant les défauts locomoteurs des mouches, et un deuxième évaluant la survie après traitement.

1) Le test locomoteur consiste à analyser la capacité des mouches à monter le long d'un tube par géotaxie négative. Pour cela, des mouches âgées de 3 jours sont traitées ou non au paraquat et placées ensuite dans des tubes vides. Leur capacité à grimper le long de ce tube est évaluée par rapport à des mouches contrôles n'ayant pas été mises en présence de paraquat. Les mouches contrôles (milieu non-supplémenté) mettent en moyenne six secondes à monter en haut du tube, que ce soit 12, 24 ou 48 heures après le traitement. En revanche, les mouches mises sur paraquat mettent environ huit secondes à monter 12 heures après le traitement et jusqu'à 30 secondes deux jours après la mise sur paraquat (Fig. 3.12c).

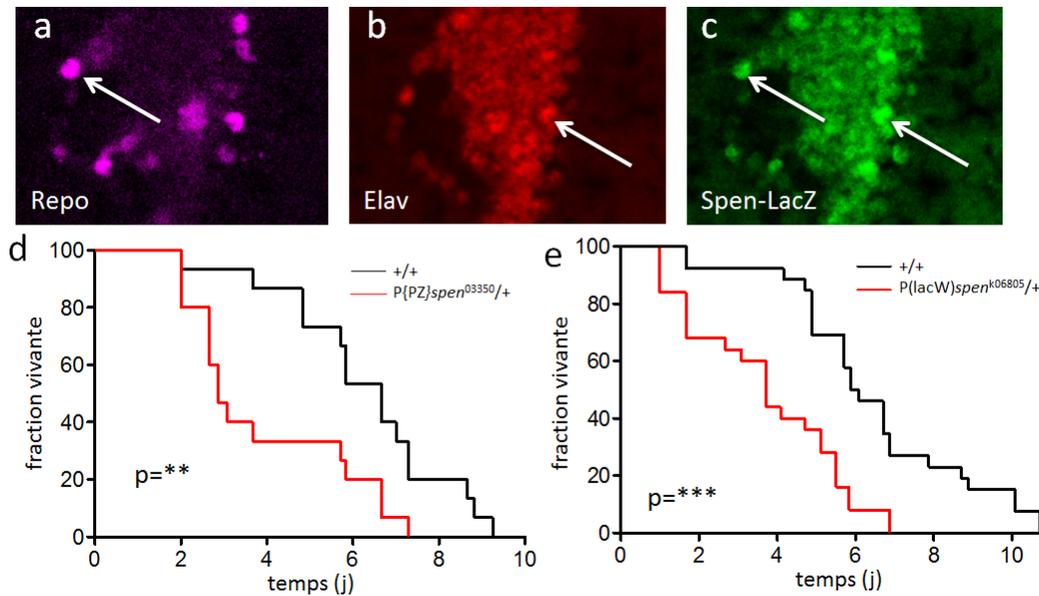
2) Le second test consiste à évaluer la survie des mouches en réponse au traitement paraquat. Pour cela des mouches âgées de 3 jours sont nourries sur du milieu contenant du paraquat ou non (contrôle). Le nombre de mouches mortes au cours du temps est évalué dans les jours suivants le traitement. Ainsi, moins de 10 jours après l'exposition à 10 mM de paraquat, l'intégralité des mouches aura succombé (Fig. 3.12d). La réponse est par ailleurs dose dépendante, car si l'on soumet les mouches à un paraquat deux fois plus concentré c'est à dire de 20 mM, les mouches meurent plus rapidement. Une équipe a également montré qu'une application directe du PQ au niveau du cerveau des drosophiles induisait une réponse beaucoup plus rapide et ce même pour des doses inférieures (Rival et al. 2004).

Nous disposons ainsi de deux tests fonctionnels permettant d'évaluer la réponse des mouches à un stress oxydatif suivant l'ingestion de paraquat.

### 3.2.3 *Spen* EST EXPRIMÉ UBIQUITAIREMENT DANS LE CERVEAU ADULTE DE LA MOUCHE

Le gène *spen* code pour une protéine nucléaire connue pour être exprimée ubiquitairement dans l'embryon et dans la larve de *Drosophile* (Chen and Rebay 2000, Wiellette et al. 1999). Jusque-là aucune étude n'a montré le rôle de *spen* chez la puppe ou dans le cerveau adulte. Afin de cartographier l'expression de *spen* dans le cerveau adulte et de déterminer dans quel type cellulaire il est exprimé, nous avons réalisé des cryosections de tête de *drosophile* provenant d'une lignée "enhancer trap" exprimant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) sous le contrôle du promoteur de *spen*. Les sections ont été marquées avec un anticorps contre la  $\beta$ -GAL, le patron d'expression de l'enzyme devant récapituler celui de *spen*. Deux autres marquages, anti-Elav et anti-Repo mettent en évidence les neurones et les cellules gliales respectivement. Le résultat montre que tout comme dans l'embryon ou la larve, *spen* est exprimé de manière ubiquitaire chez l'adulte (Fig. 3.13a-c).

Afin de confirmer ce résultat, nous avons ensuite réalisé des marquages avec l'anticorps polyclonal dirigé contre *spen* que nous avons produit au laboratoire. Malheureusement ces expériences de marquages n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat négatif : soit un problème technique de détection chez l'adulte, soit un niveau d'expression de *spen* trop faible pour être mise en évidence avec un anticorps spécifique. La détection de la  $\beta$ -GAL peut en effet s'avérer plus sensible qu'un anticorps étant donné que l'enzyme  $\beta$ -galactosidase est très stable et a une persistance tissulaire très importante.



**Fig. 3.13. Le gène *spen* est exprimé ubiquitairement dans le cerveau adulte et est requis pour la résistance à un stress oxydatif.** (a-c) Les panels a, b et c présentent des cryosections sur cerveau de mouches portant un élément-P permettant l'expression de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur de *spen* ( $PPZ_{spen}^{03350}$ ). Les coupes ont été marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine Repo spécifique des cellules gliales (a), contre la protéine Elav spécifique des neurones (b) et contre la  $\beta$ -galactosidase afin de révéler le patron d'expression de *spen* dans le cerveau adulte. *Spn* est exprimé ubiquitairement dans le cerveau adulte de la mouche. (d-e) L'inactivation d'une copie du gène *spen* rend les mouches plus sensibles au paraquat. La survie de 30 mouches par conditions mises sur un milieu contenant 10 mM de paraquat est évaluée. Deux lignées mutantes pour *spen* ont été utilisées ( $PPZ_{spen}^{03350}$ ,  $P(lacW)_{spen}^{k06805}$ ). Test Log-rank (Mantel-Cox) : \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.2.4 *Spn* EST REQUIS POUR LA RÉSISTANCE À UNE EXPOSITION AU PARAQUAT

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle *spn* pourrait être important pour la résistance à un stress oxydatif, des mouches hétérozygotes mutantes pour *spn* ou des mouches sauvages (contrôles) ont été mises en présence de paraquat (Fig. 3.13 et matériel et méthodes). Deux lignées mutantes pour *spn* différentes ont été testées en parallèle : P(PZ)*spn*<sup>03350</sup>, P(lacW)*spn*<sup>k06805</sup>. Trois jours après éclosion les mâles et les femelles ont été séparés avant de réaliser le test de survie. On observe que le fait d'inactiver une copie de *spn* (hétérozygote) rend les mouches plus sensibles au stress oxydatif; les mouches hétérozygotes mutantes meurent plus vite que les mouches contrôles et ce pour les femelles comme pour les mâles (Fig. 3.13d, e, le résultat pour les mouches femelles n'est pas montré). Ce résultat est vrai pour les deux lignées mutantes, et est indépendant du sexe (on rappelle que le gène *spn* est situé sur le second chromosome de la Drosophile).

Afin de confirmer et de développer ce résultat, nous avons ensuite testé les capacités locomotrices des mouches hétérozygotes mutantes pour *spn*. Sans traitement paraquat les mouches hétérozygotes mutantes pour *spn* ont la même vitesse pour grimper le long du tube que les mouches contrôles (sauvages). Ceci indique que la perte d'une copie du gène *spn* seule n'induit pas de défauts locomoteurs. En revanche, après un traitement au paraquat de 24 heures, la suppression d'une copie du gène *spn* induit un défaut de locomotion par rapport aux mouches contrôles (Fig. 3.14e).

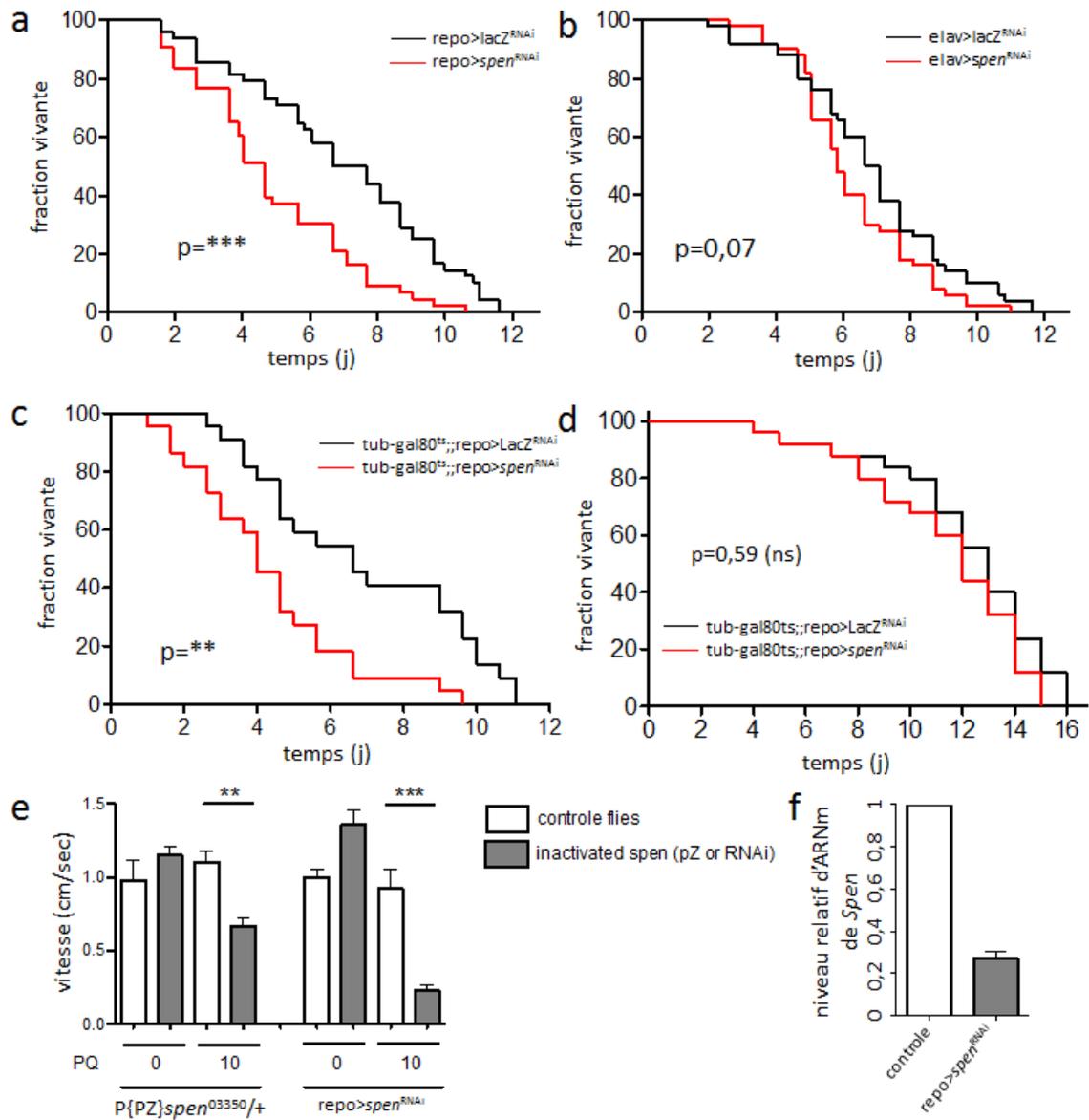


Fig. 3.14. L'expression gliale de *spen* chez l'adulte est nécessaire à la résistance à un stress au paraquat.

**Fig.3.14** : (a-b) L'inactivation de *spen* dans les cellules gliales rend les mouches plus sensibles au paraquat. Des mouches exprimant *spen*<sup>ARNi</sup> ou *LacZ*<sup>ARNi</sup> (contrôle) sous le contrôle de *repo*-GAL4 (a) ou *elav*-GAL4 (b) sont mises sur un milieu contenant 10 mM de paraquat. La survie des mouches est évaluée. \*\*\*,  $p < 0,0001$  (c-d) La susceptibilité des mouches mutantes pour *spen* n'est pas un défaut développemental. Des mouches *tub*-GAL80<sup>ts</sup>; *repo*-GAL4 sont croisées avec des mouches UAS-*spen*<sup>ARNi</sup> ou UAS-*LacZ*<sup>ARNi</sup> (contrôle). La génération F1 est mise en présence de paraquat et leur survie est évaluée. (c) Les mouches se développent à 18°C, après éclosion les mouches sont mises à 29°C pendant 5 jours, puis traitées au paraquat. (d) Les mouches se développent à 18°C, après éclosion, les mouches sont traitées sur paraquat à 18°C. A 18°C, le driver *repo*-GAL4 est inactif, aucun effet sur la survie n'est observable entre les mouches contrôles et celles exprimant un ARNi contre *spen*. Pour des raisons de croisements génétiques seules les femelles sont étudiées.  $n > 50$  mouches par condition. Test Log-rank (Mantel-Cox). \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ . (e) Test de locomotion effectué sur des mouches hétérozygotes mutantes pour *spen* ou exprimant un ARNi contre *spen* dans les cellules gliales (*repo* > *spen*<sup>ARNi</sup>).  $n > 50$  mouches par condition \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , test non paramétrique de Mann Whitney. (f) L'expression d'un ARNi contre *spen* dans les cellules gliales (*repo*-GAL4) est capable de réduire l'expression de *spen*. Les ARNs ont été isolés à partir d'environ 25 têtes de mouches âgées de 72h puis rétro-transcrits avant d'être analysés par qPCR. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec les écart-types.

Ces résultats ont été obtenus en inactivant une seule copie de *spen* et ce dans la mouche entière. Les résultats des tests locomoteurs suggèrent cependant un rôle de *spen* dans l'atteinte neuronale en réponse au paraquat. Afin de savoir si le défaut locomoteur observé est lié à un rôle spécifique de *spen* au niveau des neurones ou un effet indirect via les cellules gliales, nous avons inactivé le gène *spen* uniquement dans les cellules gliales ou dans les neurones grâce au système UAS-GAL4. Pour cela nous avons utilisé le driver *elav*-GAL4 spécifique des neurones et le driver *repo*-GAL4 spécifique des cellules gliales. La construction UAS- $\beta$ -galactosidase ARNi a été utilisée comme contrôle, et en parallèle des constructions UAS-*spen* ARNi. Les deux tests (survie et test locomoteur) ont été réalisés dans ces conditions. Nous avons montré que l'inactivation de *spen* dans les cellules gliales uniquement rendait

les mouches plus sensibles à un traitement paraquat que ce soit en survie ou en test locomoteur (Fig. 3.14a, e). Il est important de noter que sans stress oxydatif (paraquat 0 mM), l'inactivation de *spen* dans les cellules gliales ne modifie pas les capacités locomotrices de la mouche (Fig. 3.14e). En revanche, l'inactivation de *spen* dans les neurones ne modifie pas la survie des mouches en réponse au stress (Fig. 3.14b). Nous avons également contrôlé par q-PCR que nous pouvions mesurer la diminution du niveau des transcripts de *spen* dans le cerveau adulte en utilisant les drivers *repo-GAL4* pour exprimer un ARNi contre *spen* dans les cellules gliales (Fig. 3.14f). L'expression de *spen* dans le cerveau adulte est diminuée d'environ 80% suite à l'expression d'un ARNi avec le driver *repo-GAL4*. *Spn* étant exprimé dans les neurones et les cellules gliales, il est probable que l'expression restante soit liée à la présence de *spen* dans les neurones. D'ailleurs, des résultats préliminaires montrent que la même expérience avec le driver *elav-GAL4* montre une diminution de l'expression de *spen* d'environ 20%. Ces résultats pourront être confirmés en exprimant un ARNi contre *spen* dans la glie et les neurones en même temps (lignée de Drosophile *elav-GAL4;;repo-GAL4*).

L'inactivation de *spen* dans les cellules gliales entraîne une susceptibilité accrue des mouches au traitement paraquat. Nous avons alors essayé de surexprimer *spen* dans la glie afin de voir si cela n'aurait pas l'effet contraire à savoir protéger du stress oxydatif suivant le traitement au paraquat. Il s'avère cependant que la surexpression de *spen* dans la glie (*repo-GAL4>UAS-spen*) est létale, probablement en conséquence de défauts développementaux des cellules gliales. Par la suite il pourra être possible de sur-exprimer *spen* uniquement chez l'adulte en utilisant le système UAS-GAL4-tubGAL80<sup>ts</sup>.

### 3.2.5 L'EXPRESSION DE *spen* DANS LA GLIE EST REQUISE CHEZ LA MOUCHE ADULTE POUR LA RÉSISTANCE AU STRESS OXYDATIF

Le gène *spen* est connu pour interagir avec la voie de signalisation EGFR afin de contrôler la survie et la migration des cellules gliales au cours de l'embryogénèse (Chen and Rebay 2000). Les résultats obtenus que ce soit avec le test de survie ou le test locomoteur pourraient être la conséquence d'un rôle précoce de *spen* sur le développement des cellules gliales. En effet l'inactivation de *spen* dans les cellules gliales durant la formation de l'embryon pourrait compromettre le bon développement du cerveau et résulterait en des mouches adultes plus sensibles au paraquat. Afin de tester cette hypothèse, nous avons de nouveau utilisé la protéine GAL80<sup>ts</sup>. Grâce à ce système, nous avons inactivé *spen* dans les cellules gliales une fois le développement du cerveau de la mouche terminé. En présence de la protéine GAL80<sup>ts</sup> active, aucun effet n'est visible entre les mouches *repo>spen* ARNi et les mouches contrôles (Fig. 3.14d). En revanche, si on inactive la protéine GAL80<sup>ts</sup> après l'éclosion des mouches (i.e. on inactive *spen* dans la glie adulte), les mouches sont plus sensibles à un stress oxydatif comparé aux contrôles (Fig. 3.14c). Ce résultat montre que les effets observés en réponse à un stress oxydatif ne sont pas le résultat de défauts développementaux mais d'un rôle de *spen* dans le cerveau adulte.

### 3.2.6 L'EXPRESSION DE *spen* DANS LE CERVEAU ADULTE CONTRÔLE DES ACTEURS DE LA RÉPONSE ANTI-OXYDANTE ET LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

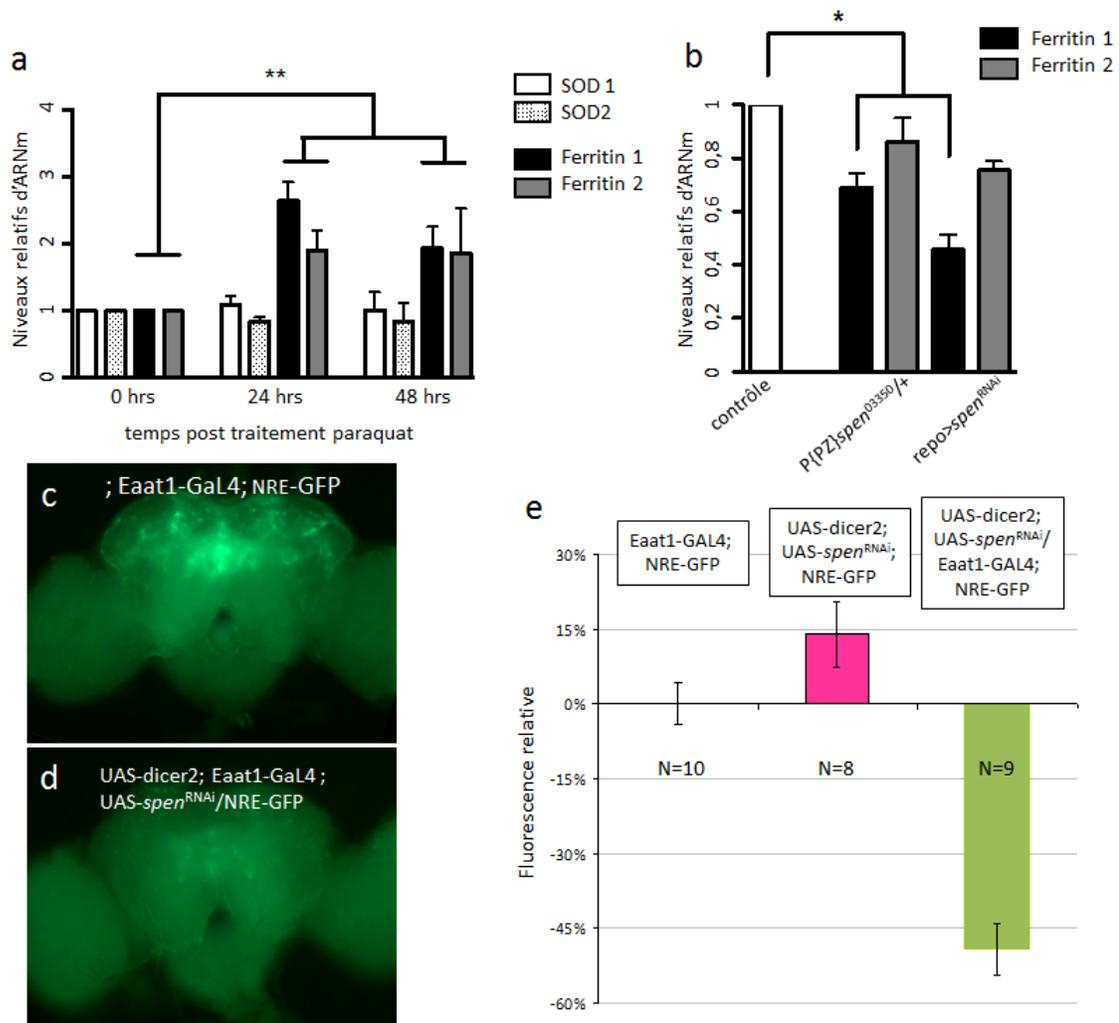
L'inactivation de *spen* conduit à une sensibilité accrue des mouches à un stress oxydatif suite à une exposition au paraquat. Afin de comprendre comment *spen* pourrait avoir un rôle protecteur, nous avons étudié l'expression de deux gènes antioxydants : *SOD* (super-oxyde dismutase) et *Ferritine* (Lio-

chev 1996). Nous avons tout d'abord évalué quels gènes antioxydants étaient impliqués dans notre modèle de stress oxydatif (paraquat). Pour cela nous avons évalué l'activité transcriptionnel de ces gènes en réponse à un traitement au paraquat. Nous montrons que les gènes *sod1* et *sod2* ne varient pas en réponse au traitement, contrairement aux gènes formant le complexe Ferritine : *ferritine1* et *ferritine2* (Fig.3.15a). En effet ces deux derniers sont surexprimés en réponse au traitement paraquat, suggérant l'implication de la Ferritine dans la réponse à ce stress. D'ailleurs le rôle de la Ferritine dans la maladie de Parkinson est activement étudiée (Quintana and Gutiérrez 2010). La ferritine est une hétéroprotéine constituée de 24 sous-unités et ayant un rôle anti-oxydant par le stockage des ions ferreux.

Nous avons alors regardé la possible interaction entre *spen* et la Ferritine. De manière surprenante, l'inactivation de *spen* conduit à une réduction de l'activité transcriptionnelle des gènes composants la Ferritine (Fig.3.15b). *Spen* pourrait ainsi réguler le stress oxydatif via son interaction avec le complexe de détoxification Ferritine.

Nous avons montré que *spen* était exprimé dans les cellules gliales et les neurones, mais que son rôle sur le contrôle de la survie des cellules neuronales en réponse à un stress oxydatif semblait être associé à son expression dans les cellules gliales. Afin de comprendre les mécanismes gliaux spécifiques responsables de la mort des neurones dopaminergiques, nous avons dans un premier temps testé le rôle de la voie Notch, en collaboration avec Dr Laurent Seugnet, spécialiste de la voie de signalisation Notch.

Nous avons utilisé un rapporteur de la voie Notch (Notch responsive element, NRE-GFP) pour mesurer l'activation de la voie dans les cellules gliales après inactivation ou non de l'expression de *spen* par ARNi. En effet, la voie Notch est impliquée dans la signalisation suivant les contacts entre deux cellules, et *spen* interagit génétiquement avec cette voie (Doroquez et al. 2007). Une expression basale de Notch a été détectée dans le cerveau adulte grâce



**Fig. 3.15. *Spn* est impliqué dans la réponse oxydative et la voie de signalisation Notch.** (a) Analyse des niveaux de transcrits de quatre gènes de la réponse anti-oxydante en réponse à un traitement au paraquat. Des mouches âgées de 3 jours sont traitées au PQ 10 mM pendant 0, 24 ou 48h. L'expression des gènes est mesuré sur des extraits ARN isolés à partir d'extraits de têtes (n>40). (b) Expression transcriptionnelle des deux gènes formant la Ferritin lorsqu'une copie de *spn* est mutée (PPZ*spn*<sup>03350/+</sup>) ou lorsque *spn* est inactivé dans la glie (*repo*>*spn*<sup>ARNi</sup>). (c-d) Cerveaux entiers exprimant le rapporteur Notch NRE-GFP. L'expression d'un ARNi contre *spn* dans les cellules gliales avec le driver Eaat1-GAL4 (d) supprime l'activation basale de la voie Notch comparé au contrôle (c). (e) Quantification des intensités de la GFP (NRE-GFP) de (c) et (d). Les barres d'erreur représentent les écart-types. "N" désigne le nombre de cerveaux analysés par condition.

au rapporteur NRE-GFP (Fig. 3.15c).

Afin de tester si l'inactivation de *spen* module l'activation de la voie Notch, nous avons utilisé un driver *eaat1*-GAL4. Ce driver est spécifique des cellules gliales de la neuropile. Par ailleurs le driver *eaat1*-GAL4 est exprimé plus tardivement que le driver *repo*-GAL4, ce qui amoindrit d'éventuels effets parasites suite au développement de la mouche. L'expression d'un ARNi contre *spen* avec le driver *eaat1*-GAL4 diminue fortement l'activité de la voie Notch (Fig. 3.15d, e). *Spn* serait ici un régulateur positif de la voie Notch.

Toutefois des expériences supplémentaires doivent être réalisées afin de vérifier si c'est bien la modulation de la voie Notch qui entraîne la sensibilité au stress oxydatif des mouches lorsque *spen* est inactivé. Afin de confirmer l'interaction génétique entre *spen* et la voie Notch en réponse à un stress oxydatif, il serait intéressant de moduler *spen* ainsi que la voie Notch en même temps dans les cellules gliales, afin d'observer s'il existe une interaction génétique et si les effets sont additifs.

Nous avons montré ici que *spen* était requis dans le cerveau adulte pour la résistance à un stress au paraquat, peut-être via son interaction avec les gènes de la réponse anti-oxydante ou avec la voie de signalisation Notch.

### 3.3 Résultats Annexes

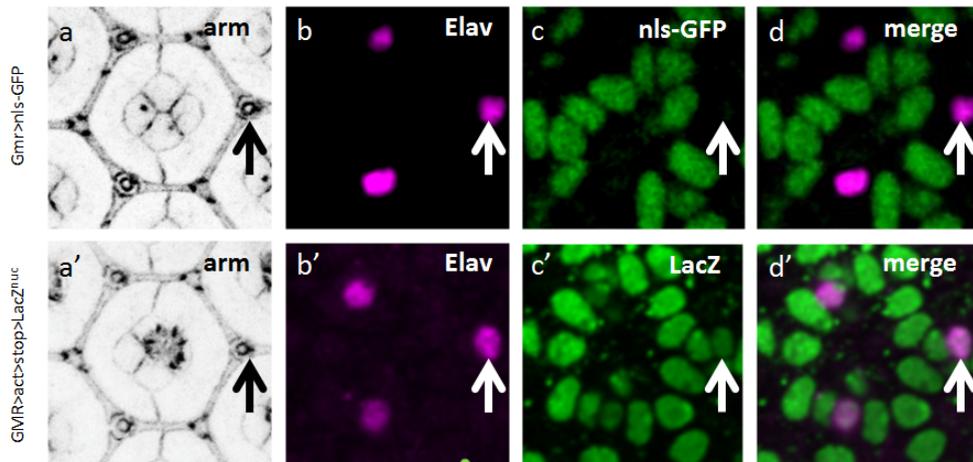
#### 3.3.1 GMR-GAL4 DRIVER ET L'AFFECTION DES SOIES

L'expression d'un ARNi contre *spen* dans les cellules de l'œil via le driver fort GMR-GAL4 conduit à un phénotype assez marqué des soies de l'œil (Fig. 3.4). Le driver GMR-GAL4 est connu pour cibler toutes les cellules de l'œil après le passage du sillon morphogénétique. Dans le but de caractériser les drivers GAL4 utilisés dans notre étude, nous avons avec surprise remarqué que le driver GMR-GAL4 ne ciblait pas les quatre cellules formant la soie dans le disque de pupa 42 heures APF (Fig. 3.16a-d). Ce driver cible en

revanche l'intégralité des autres cellules composant le disque d'œil de pupa 42 heures APF. Il est alors étonnant d'observer un phénotype au niveau des soies avec un tel driver. Cela peut-être expliqué de deux manières qui ne sont pas exclusives. En désorganisant les cellules interommatidiales, l'inhibition de *spen* peut affecter physiquement la soie en croissance et conduire à ce phénotype. Autrement, il est possible que le driver GMR-GAL4 ne soit pas exprimé dans les soies 42 heures APF, mais plus tôt au cours du développement. Pour tester cette seconde hypothèse, nous avons utilisé une construction génétique permettant de suivre le lignage cellulaire (Matériels et Méthodes). Cette approche permet de faire exprimer un marqueur héritable (LaCZ) aux cellules ayant une origine commune. Cette approche nous permet de savoir si au cours du développement de l'œil le driver GMR-GAL4 a été exprimé dans les cellules formant la soie. Il s'avère en effet que par cette approche l'intégralité des cellules formant le disque d'œil 42 heures APF expriment l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (Fig. 3.16a'-d'). Ce résultat montre que plus tôt au cours du développement de l'œil le driver GMR-GAL4 a ciblé les cellules formant les soies. D'où le phénotype observé dans les mouches GMR>*spen*ARNi.

### 3.3.2 *Spn* ET LA FORMATION DES VEINES DE L'AILE

Dans le but initial de valider notre anticorps, nous voulions surexprimer ou inhiber *spen* dans le disque imaginal d'aile, afin de vérifier la modulation du signal de Spen et donc valider l'anticorps. Pour cela, nous avons utilisé le driver *engrailed*-GAL4 (*en*-GAL4). Ce driver est spécifique du compartiment postérieur du disque d'aile alors que le compartiment antérieur reste parfaitement sauvage. Les mouches surexprimant *spen* avec ce driver (*en*>*spen*) n'éclosent pas et meurent à l'état pupal. Ce défaut d'éclosion est certainement dû à un problème au niveau des ailes. L'inactivation de *spen* par ARNi suivant le même principe n'est pas létal pour la mouche. Le résultat a été assez surprenant car les ailes obtenues sont peu affectées. Cependant les ailes



**Fig. 3.16. Le driver GMR-GAL4 cible les cellules composant les soies mais pas dans les phases tardives du développement du disque de pupe.** (a-d') Images par microscopie confocale de disque d'œil de pupe 42 heures APF et exprimant nls-GP (a-d) ou le traceur de lignage act>stop>LacZ<sup>nuc</sup> (a'-d'). (a,a') Marquage des membranes avec un anticorps anti-Armadillo. (b,b') Marquage anti-Elav. A ce focus, on distingue chaque neurone composant les soies. (c) nls-GFP récapitulant le patron de GMR-GAL4. A ce focus, on voit le noyau de chaque IOC. De manière surprenante, GMR n'est pas exprimé dans les soies. (c') Patron d'expression de GMR-GAL4 avec le traceur de lignage (act>stop>LacZ<sup>nuc</sup>). Dans ce cas, toutes les cellules y compris les cellules des soies expriment la  $\beta$ -galactosidase. Ce résultat montre que GMR-GAL4 cible les soies, mais plus 42 heures APF.



**Fig. 3.17. L'inactivation de *spen* dans l'aile de la *Drosophile* bloque la formation de la PCV.** (a-b) présentent des ailes entières de mouches imagées par loupe optique. Aile de mouche contrôle (*en>UAS-GFP*) (a), et exprimant *spen*<sup>ARNi</sup> (*en>spen*<sup>ARNi</sup>)(b). La flèche blanche indique la PCV (posterior cross vein) dans un tissu sauvage, la flèche violette montre l'absence de PCV dans un contexte où *spen* est inactivé. Grossissement x80.

des mouches apparaissent voilées et surtout la veine postérieure transversale (PCV, posterior crossed vein) est absente dans l'intégralité des cas (Fig. 3.17).

Chez la *Drosophile* c'est *dpp* (*decapentaplegic*) un morphogène qui est responsable de la mise en place de la PCV. *Dpp* est un membre de la famille des BMP (bone morphogenetic proteins) qui est sécrété à l'extérieur de la cellule pour se lier à son récepteur *tkv* (*thickvein*). Le résultat est la phosphorylation des deux facteurs Mad et Medea qui vont aller activer la transcription de facteurs cibles. La formation de la PCV est établie par une diffusion à

longue distance de *dpp* (Matsuda et al. 2013). L'implication de *spen* dans la formation de la PCV n'a jamais été montrée jusqu'à présent. En 2003, une étude chez la Drosophile concernant la voie de signalisation Wingless a établi une relation génétique entre *spen* et *dpp*. Au cours du développement de l'œil chez la larve, Wg est exprimé aux bords dorsal et ventral du disque ou il inhibe la progression du sillon morphogénétique (Ma and Moses 1995). *Dpp* est exprimé dans la partie dorsale du disque ou il inhibe Wingless (Royet and Finkelstein 1997). Ainsi, dans un mutant *dpp*, la voie Wingless n'est pas restreinte donnant un œil de petite taille. Les auteurs ont montré que l'inactivation de *spen* dans un mutant *dpp* sauvait le phénotype œil de petite taille, suggérant que *spen* est un activateur de la voie Wingless ou un antagoniste de *dpp* (Lin 2003). Le lien entre *spen* et *dpp* reste à être éclaircie et notamment dans le contexte de la formation de la PCV.

### 3.3.3 IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GÈNES GLIAUX IMPLIQUÉS DANS LA MALADIE DE PARKINSON

La maladie de Parkinson est caractérisée par une perte sélective des neurones dopaminergiques. Plusieurs études ont impliqué la neuro-inflammation dans cette pathologie. Cependant, on ne sait pas si cette inflammation (l'activation de la microglie) est une cause ou une conséquence de la maladie (voir chapitre introductif). L'identification de facteurs gliaux impliqués dans la maladie de Parkinson serait une approche pour répondre à cette question.

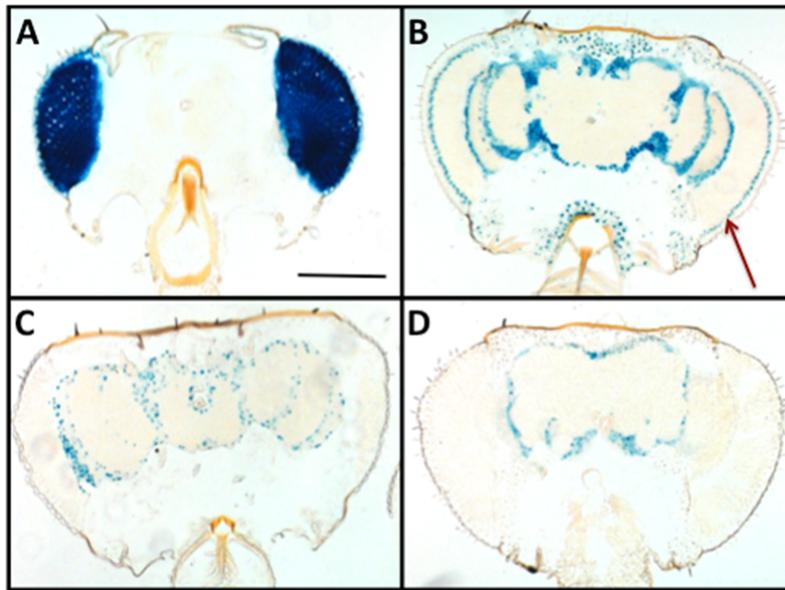
Bien que 90% des cas de Parkinson soient idiopathiques, des études génétiques ont permis d'identifier les gènes dont les mutations sont responsables de la maladie dans certaines des formes héréditaires et sporadiques. La mutation ou l'inactivation de ces gènes chez des organismes modèles tels que la souris ou *D. melanogaster* génèrent des modèles d'étude de la maladie de Parkinson. Ainsi, des mutations aboutissant par exemple à une perte de fonction du gène *Parkin*, codant pour une ubiquitine ligase et impliqué dans

des formes héréditaires de la maladie, permettent d'obtenir des souches de *Drosophiles* présentant un phénotype de type Parkinson. Ce phénotype est caractérisé par des déficits moteurs et la perte des neurones dopaminergiques chez les mouches adultes. A partir de ces modèles animaux, des cribles génétiques ont été réalisés afin d'identifier des acteurs génétiques impliqués dans la maladie de Parkinson (Greene et al. 2005, Girardot et al. 2004, Fernandes and Rao 2011).

Afin d'identifier de nouveaux gènes gliaux impliqués dans la protection ou la mort des neurones dopaminergiques, nous avons réalisé un crible à partir de gènes candidats. Une revue des résultats des cribles génétiques cités ci-dessus nous a conduit à sélectionner une liste de 100 gènes dont l'expression était modulée dans des modèles de Parkinson chez la mouche et pour lesquels il existait des protéines homologues chez l'homme. Nous avons ensuite collecté des lignées de *Drosophiles* porteuses d'un élément P dans les gènes sélectionnés. Ces lignées ont été obtenues par mutagenèse de la souche sauvage  $W^{1118}$  grâce à l'insertion aléatoire d'élément P de type "enhancer trap". Ces transposons sont très couramment utilisés en génétique de la *Drosophile* et permettent également de "capturer" l'expression du gène dans lequel ils sont insérés grâce à un gène rapporteur, dans notre cas il s'agit du gène *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase.

A l'aide de cette approche et par simple coloration sur coupe de cerveau, nous avons identifié les gènes étant exprimés dans le cerveau adulte des *drosophiles* et ayant un patron d'expression compatible avec une expression gliale (Fig. 3.18).

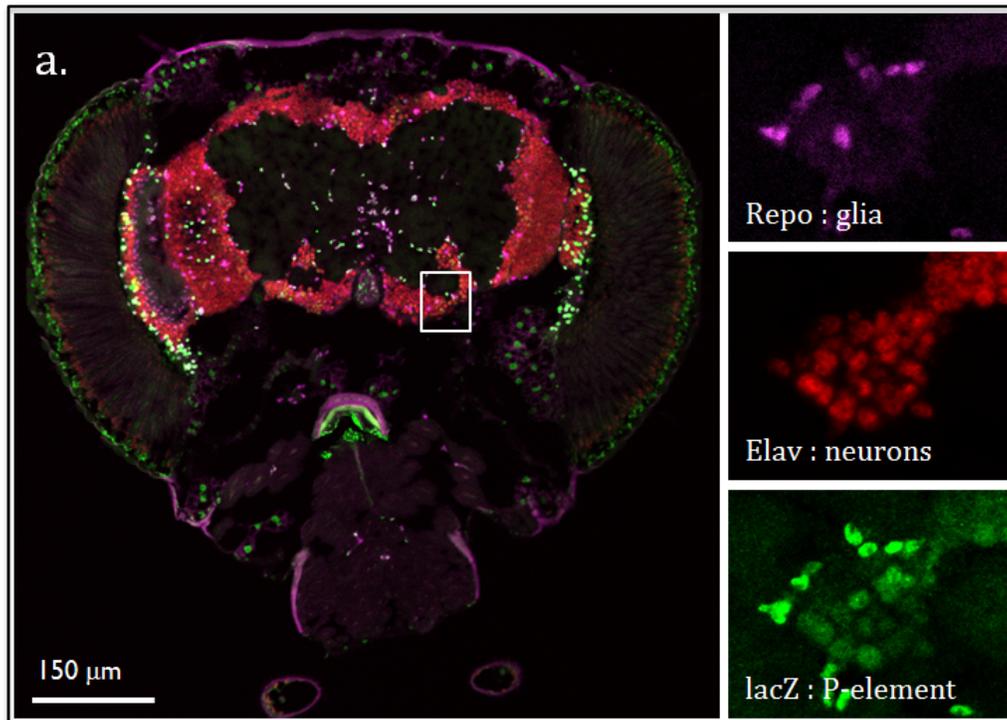
Parmi les 100 gènes sélectionnés au départ, 37 ont été validés comme étant exprimés dans le cerveau adulte. L'étape suivante a consisté à valider ces résultats par une approche de co-marquage et observation au microscope confocal. Cela nous a permis de restreindre le nombre de gènes exprimés dans la glie à 13 (Fig. 3.19).



**Fig. 3.18. Patron d'expression de gènes liés à PD dans le cerveau adulte de *Drosophile*.** Nous avons établi une liste de 100 gènes potentiellement impliqués dans la maladie de Parkinson. Nous avons ensuite analysé leur patron d'expression dans le cerveau adulte en utilisant pour chaque gène une lignée "enhancer trap" portant un élément-P exprimant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur de chaque gène. (A-D) présentent des exemples d'images par microscopie optique de cryosections de tête de *Drosophile*. Le patron de la  $\beta$ -galactosidase est révélé par marquage enzymatique. La barre d'erreur est 100  $\mu$ m. (A) Rhodopsin-1 est exprimé dans la rétine et sert de contrôle positif. (B) Ferritin est exprimé dans les neurones et la glie. La flèche indique les photorécepteurs. (C) Repo est exprimé seulement dans les cellules gliales. (D) Tbp-1 est exprimé dans un sous-groupe de neurones.

La deuxième partie du crible a consisté et ce pour les 13 gènes retenus à tester la susceptibilité de lignées mutantes à un traitement neurotoxique par le paraquat. Deux paramètres ont été quantifiés : le taux de survie des mouches après traitement et la capacité motrice des individus à l'aide du test dit de "climbing". Ce travail a été réalisé sur une lignée mutante par gène d'intérêt, une lignée mutante étant une lignée pour laquelle une copie du gène d'intérêt est porteuse d'un élément P. Ceci n'est évidemment pas suffisant pour conclure sur l'implication du gène dans le processus de mort neuronal. Pour les gènes d'intérêt il sera donc nécessaire dans un premier temps de :

- Confirmer le patron d'expression gliale avec des anticorps spécifiques ou de l'hybridation *in situ* sur des cerveaux de drosophiles sauvages.
- Tester un plus grand nombre de lignées mutantes.
- Utiliser des stratégies de sur-expression ou de siRNA avec des promoteurs gliaux ou neuronaux spécifiques.
- Quantifier de manière plus précise la perte neuronale par comptage des neurones TH positifs, ou par qPCR de transcrits impliqués dans la synthèse de dopamine.



b.

Expression	Genes
Glia	<i>nrv2, repo</i>
Neurons	<i>tbp1, fur1, idh, inr, sec23, hppy, msn, nla, stg</i>
Glia and neurons	<i>inx2, loco, ena, rpn9, pros, rosy, spen, mvl, flw, odd, lmg</i>

**Fig. 3.19. Patron d'expressions de gènes liés à PD dans le cerveau adulte.** (a) Les images présentent des cryosections sur cerveau adulte de mouches exprimant la  $\beta$ -galactosidase (PZ enhancer trap). La figure présente l'exemple du gène *inx2*. Les coupes de cerveau sont marquées avec des Ab contre :  $\beta$ -gal (*Inx2*), Repo (marqueur glial), and Elav (marqueur neuronal). Le co-marquage indique que *inx2* est exprimé dans la glie et les neurones. (b) Le tableau indique le résultat des immunomarquages : 9 gènes sont spécifiques des neurones. Parmi les 37 gènes identifiés comme étant exprimé dans le cerveau adulte, 13 sont exprimés dans les cellules gliales.

# Chapitre 4

## Discussion

### 4.1 *Spn* régule l'élimination des IOCs

L'élimination des IOCs en excès au cours du développement de l'œil permet l'arrangement de chaque ommatidie pour donner un agencement hexagonal parfait. Cette élimination nécessite des communications entre cellules et un équilibre entre des signaux de mort et de survie. Nous montrons dans cette étude que le gène *spn* est requis pour la survie des IOCs durant le développement de l'œil. L'inactivation de *spn* dans l'œil conduit à l'apparition d'IOCs en excès, alors que l'inhibition de *spn* conduit à un sévère excès de mort. Ces résultats indiquent que *spn* agit dans l'œil de puppe pour éviter une élimination excessive des IOCs. Avant leur élimination par apoptose, les IOCs sont réarrangées (Cagan and Ready 1989a). Cet arrangement des cellules positionne les IOCs de telle sorte qu'elles reçoivent les signaux de mort des cellules voisines (Monserrate and Brachmann 2007). Ainsi la mutation d'un gène requis pour le positionnement des IOCs conduit à un excès d'IOCs faute de recevoir les signaux de mort (Reiter et al. 1996). Le fait que les mutants pour *spn* présente un excès de mort et non le contraire suggère que ce gène est requis pour la survie des IOCs et n'impacterait pas le réarrangement des IOCs. Cependant, les rétines co-exprimant *spn* ARNi plus p35 présente plus d'IOCs sauvées que dans un contexte p35 seul (Fig 3.6b, d). Le fait que *spn* augmente le nombre d'IOCs en présence de p35 suggère que *spn* est requis pour l'élimination des IOCs, un rôle qui est dévoilé lorsque l'apoptose

est inhibée par p35. Nous proposons que *spen* en plus de ces fonctions de survie, soit aussi requis pour le réarrangement des cellules, mais que ce rôle est masqué par l'importante mort des IOC's dans un contexte *spen* mutant. De plus, un rôle de *spen* dans l'arrangement des cellules et leur maturation est justifié par la présence d'IOC's gonflées (immatures) et de défauts d'arrangements observés dans les rétines mutantes pour *spen* (Fig 3.1f, o). Il est aussi possible d'imaginer que les IOC's adoptent cet aspect gonflé suite à l'excès de mort par excès de place dans le tissu, les IOC's devant occuper l'espace disponible.

## 4.2 *Spen* agit en inhibant la mort cellulaire à partir des cellules cônes

Nous avons montré que la perte de *spen* induit une mort ectopique des IOC's, et cela par apoptose. Ce résultat est basé sur l'observation que la mort des IOC's est associée à une augmentation de la présence de Dcp-1 clivée dans un clone *spen* mutant, et que la perte excessive d'IOC's était inhibée par l'expression de p35 (Fig 3.6). De manière intéressante, notre analyse montre que *spen* permet la survie des IOC's à partir des cellules cônes (Fig 3.10f). Ce résultat est en accord avec une étude ayant montré le rôle des cellules cônes dans la survie des IOC's (Miller and Cagan 1998). Une seconde étude a mis en évidence le rôle du gène *Trl* (*Trithorax-like*) dans les cellules cônes lors de l'élimination des IOC's (Dos-Santos et al. 2008). *Trl* est requis dans les cellules cônes pour réduire le signal de survie ou promouvoir le signal de mort. Enfin, une étude a montré que la mutation du gène *Pax2* conduisait à un excès d'apoptose suite à un défaut de formation des cellules cônes. Tout comme dans notre analyse, cet excès de mort est sauvé par l'ajout de la protéine p35 (Siddall et al. 2003). Il a cependant aussi été proposé que les cellules pigmentaires primaires puissent avoir une fonction

dans la survie des IOC's (Monserrate and Brachmann 2007). Il est possible que des mécanismes distincts lors de l'envoi des signaux de survie ou de mort soient liés à différents types cellulaires. Enfin, une vague d'apoptose précoce nécessite un signal provenant des cellules cônes et qui active la voie Wingless. On ne peut pas exclure un éventuel rôle de *spen* dans cette vague d'apoptose précoce (18-24 heures APF). Cependant *spen* est connu pour être un régulateur positif de cette voie (Chang et al. 2008), ce qui irait dans le sens contraire de nos résultats. Par ailleurs l'augmentation de la protéine Dcp-1 clivée dans un clone *spen* mutant plus tard au cours du développement (28 heures APF) (Fig. 3.6f-h) suggère fortement un rôle de *spen* dans la vague d'apoptose débutant environ 28 heures APF et mettant en jeu les voies Notch et EGFR. Enfin, l'augmentation de l'expression de Spitz dans un clone *spen* mutant suggère un rôle de la voie EGFR dans le contrôle de la survie cellulaire arbitrée par *spen*. La voie EGFR n'étant pas nécessaire à la première vague d'apoptose (Cordero et al. 2004), il est peu probable que *spen* intervienne lors de cette phase de mort.

### 4.3 Mécanismes par lesquels *spen* contrôle la survie des IOC's

Les mécanismes par lesquels *spen* promeut la survie des IOC's de manière cellule non-autonome (à partir des cellules cônes) ne sont pas clairs. Nous avons montré que l'inactivation de *spen* dans le disque d'œil pupal conduisait à une accumulation de Spitz (Fig 3.11), le ligand activateur de la voie EGFR dans les cellules cônes. Il a été proposé par plusieurs équipes que Spitz activerait la voie EGFR/Ras/MAPK dans les IOC's (Monserrate and Brachmann 2007, Yu et al. 2002). En retour, la voie EGFR bloquerait la voie de signalisation Notch (Yu et al. 2002). Ainsi, une hypothèse simple serait que *spen* contrôle Spitz dans les cellules cônes et ainsi la survie des IOC's. Ce-

pendant et jusqu'à présent, les outils permettant de détecter l'activation des voies Notch et EGFR n'ont pas permis de voir des activations différentielles de ces voies dans les IOC's (Monserrate and Brachmann 2007). Au cours de ces travaux nous n'avons pas non plus observé de variation d'activation de la voie Notch dans des clones *spen* mutants lors de la phase d'apoptose. On se serait attendu à voir une sur-activation de la voie Notch dans les IOC's vouées à mourir. Il est possible que les outils disponibles ne soient pas assez sensibles pour la détection des variations de signalisation. L'accumulation du ligand Spitz dans les cellules cônes dans un tissu mutant pour *spen* suggère fortement que *spen* agit sur la survie des IOC's via le contrôle de la voie EGF.

#### **4.4 *Spen* influencerait la survie des IOC's en contrôlant le relarguage de Spitz**

L'inactivation de *spen* conduit à la séquestration de Spitz au niveau des membranes des cellules cônes (Fig. 3.11). Ce ligand peut diffuser à faible distance de l'ordre de trois à quatre diamètres de cellules du point de sécrétion (Golembo et al. 1996) et est donc le parfait candidat pour promouvoir la survie des IOC's une fois sécrété par les cellules cônes. Spitz est d'ailleurs connu pour être exprimé dans les cellules cônes et les IOC's (Miller and Cagan 1998). De manière générale, Spitz est exprimé très largement, et c'est Rhomboid (*rho*), une protéase nécessaire à l'activation de Spitz qui détermine la localisation de l'activité de Spitz (Strisovsky et al. 2009). Avant d'être sécrété, Spitz nécessite aussi la chaperone Star pour être véhiculer hors du RE (Lee et al. 2001) et être palmitoylé par l'acyltransférase Rasp (Miura et al. 2006).

Il n'est pas clair comment l'inactivation de *spen* conduit à l'accumulation de Spitz aux membranes. Une hypothèse serait que *spen* module l'activité de l'enzyme acyltransférase Rasp. En effet, la palmitoylation de Spitz aug-

mente son association avec les membranes et le concentre à la surface de la cellule qui le sécrète, réduisant ainsi son champ d'action (Miura et al. 2006). Spitz ne peut pas activer la voie EGFR sous sa forme trans-membranaire (Freeman 1996), si bien que lorsqu'il s'accumule dans les cellules cônes, son effet anti-apoptotique sur les IOC's est nul. L'inactivation de *spen* pourrait ainsi restreindre le champ d'action de Spitz en le séquestrant dans les cellules cônes ce qui expliquerait l'excès de mort observé dans les IOC's.

#### 4.5 *Spen* régule indirectement la mort apoptotique des IOC's

L'inactivation du gène *spen* dans la rétine de la mouche entraîne une perte significative d'IOC's comparé à une rétine sauvage (Fig 3.1). Le fait de bloquer l'apoptose par l'ajout de la protéine virale p35 sauve la perte d'IOC's suivant l'inactivation de *spen* (Fig 3.6c, d). Aussi, l'expression d'un gain de fonction de *spen* supprime la mort apoptotique des IOC's (Fig 3.1k, m). De plus la protéine Dcp-1 clivée est plus abondante dans un tissu *spen* mutant (Fig 3.6f-h). Ces résultats pourraient laisser penser à un rôle anti-apoptotique de *spen* directement au sein de la cascade d'activation de l'apoptose, tout comme les protéines IAPs par exemple.

Le domaine C-terminal SPOC de la protéine Spen présente d'importantes similitudes en termes de séquence et de structure avec les protéines de la famille DIO (death inducer-obligator) (Sánchez-Pulido et al. 2004). Les protéines de la famille DIO sont des facteurs de transcription régulés au cours du développement et qui induisent la mort cellulaire. Des études *in vitro* ont montré que DIO-1 induisait l'expression des caspases après avoir été transloqué dans le noyau. Alors que l'expression ectopique de cette protéine induit la mort, les cellules exprimant DIO-1 sans le signal NLS (nuclear localisation signal) sont protégées de l'apoptose même après son induction (García-

Domingo et al. 2003). Toutefois, les protéines de la famille DIO pourraient aussi induire la mort en passant par d'autres voies de signalisation. *Spen* pourrait partager ce type de fonctionnalité avec les protéines de la famille DIO. De plus une étude a montré que certains types cellulaires étaient manquants ou au moins réduits dans des clones *spen* mutants (Doroquez et al. 2007). Notamment les photorécepteurs détectés par l'antigène Elav ou les cellules cônes détectées par l'antigène Cut. L'absence de ces types cellulaires pourrait être liée à un défaut de survie. On peut donc émettre l'hypothèse que *spen* puisse être un acteur direct au sein de la cascade d'activation de l'apoptose.

Cette hypothèse est cependant peu probable pour différentes raisons. Tout d'abord *spen* agit à distance de manière cellule non-autonome, ce qui diffère du rôle admis des protéines anti-apoptotiques de la cascade d'activation de l'apoptose. Par ailleurs nous avons essayé de sauver soit la perte de photorécepteurs dans un contexte génétique *rh1 > rpr* (la mort des photorécepteurs est induite par *reaper*, ou alors le phénotype "œil petit" des mouches exprimant *GMR > hid* (l'œil entier est tué par apoptose) en modulant l'exprimant de *spen* sans succès. Dans ces deux modèles génétiques, la cascade apoptotique est activée. Comme la modulation de *spen* n'influence ni la perte des photorécepteurs, ni la taille de l'œil, il est peu probable que *spen* soit un membre propre de la cascade de signalisation de la mort cellulaire. Il est ainsi très probable que *spen* agisse en modulant les voies de signalisation, elles-mêmes régulatrices de la mort cellulaire.

L'élimination des IOC's en excès durant la formation de la rétine de la Drosophile fait intervenir trois vagues d'apoptose successives, la première intervient environ 24 heures APF et fait intervenir les voies de Notch et Wiggless (Cordero et al. 2004). La seconde vague, intervenant entre 28 heures et 32 heures APF, est la plus massive et fait intervenir les voies Notch et EGFR (Miller and Cagan 1998). Enfin une dernière vague, environ 40 heures APF,

fait intervenir la voie Wingless et permet de sculpter la périphérie de l'œil (Lim and Tomlinson 2006). *Spen* a été longuement étudié via ses interactions avec les voies de signalisations et est connu pour réguler plusieurs voies développementales et notamment celles importantes pour la régulation de l'apoptose dans le disque de puppe à savoir les voies Wg, Notch et EGFR. La modulation de la protéine Dcp-1 clivée 28 heures APF, ainsi que les variations du ligand Spitz de la voie EGF dans des clones *spen* mutant indique que *spen* agit principalement lors de la seconde vague d'apoptose. Il est peu probable que *spen* intervienne dans la dernière vague d'apoptose étant donné que nous observons des défauts d'IOCs avant que cette vague se produise. De plus, l'intégralité de la rétine est impactée en inhibant *spen*, or cette phase intervient en bordure de rétine. *Spen* interagit fortement avec la voie EGFR/MAPK. Or cette voie est bien connue pour permettre la survie cellulaire au cours du développement de l'œil de Drosophile (McNeill and Downward 1999). La phosphorylation directe du gène pro-apoptique *hid* par les MAPK l'empêche d'inhiber Diap1, un inhibiteur des caspases (Wang et al. 1999, Kurada and White 1998). L'ensemble des données actuelles justifient que *spen* protège les IOCs de l'apoptose non pas en modulant directement l'activation de l'apoptose mais en contrôlant génétiquement les voies de signalisation régulant la mort cellulaire.

#### **4.6 Le contrôle de la mort cellulaire par communications cellulaires**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée intervient au cours du développement ou dans des pathologies. Alors que les mécanismes moléculaires d'activation et les mécanismes effecteurs de l'apoptose sont bien connus et étudiés, de quelle manière elle est régulée par les voies de signalisation reste mal compris. Il semblerait qu'il y ait trois cas de figures envisageables pour

qu'une cellule meure. Soit la cellule reçoit un signal de mort déclenchant l'apoptose, soit elle ne reçoit pas ou pas assez de signal de survie bloquant l'apoptose, soit elle active elle-même la mort. Dans les deux premiers cas, la survie de la cellule dépend de signaux émanant d'une cellule voisine. Cette dépendance vis à vis d'un signal spécifique de survie apporte une manière très simple d'éliminer des cellules mal placées et de réguler le bon nombre de cellules.

Dans de nombreux cas il est facile de voir l'avantage du suicide cellulaire programmé dont l'activation dépend des interactions entre cellules :

- Lors de la formation des organes, des cellules sont produites en excès pour former un organe et doivent être éliminées pour sculpter un organe, c'est le cas lors de la formation des doigts des amniotes (Hammar and Mottet 1971).
- Les thymocytes qui n'ont pas un récepteur à antigène fonctionnel ou qui sont dirigés contre des antigènes du soi sont détruits (Golstein et al. 1991).
- Certaines cellules, comme les neurones, sont produites en excès et éliminées si elles ne forment pas de contact avec une cellule cible (Hamburger 1992, Cowan et al. 1984).
- Les IOC's dans la rétine de *Drosophile* s'arrangent afin d'établir des contacts avec les cellules voisines. Des signaux de mort ou de survie sont alors reçus par ces cellules dans le but d'obtenir une structure hexagonale parfaite, une fois l'apoptose terminée (Cagan and Ready 1989a).

Le fait qu'une cellule survive uniquement parce qu'elle reçoit des signaux de survie d'une cellule voisine n'est pas nouveau, on connaît comme cité ci-dessus l'exemple de la sélection des lymphocytes ou le maintien des neurones. Ce postulat pourrait être appliqué à plus grande échelle, c'est à dire qu'une cellule doit avoir des interactions avec d'autres cellules pour survivre. Une

étude a montré que des chondrocytes pouvaient survivre à des densités très basse dans un milieu contenant ni sérum ni molécules de signalisation (Tschan et al. 1990). Toutefois cette expérience n'est pas parfaite étant donné que plusieurs cellules sont en culture. En revanche, des expériences ont montré qu'un oligodendrocyte seul mourrait très rapidement, et pouvait être sauvé par des molécules sécrétées en culture par leurs voisins théoriques (Raff 1992). Il est ainsi possible d'imaginer que dans le cas de l'élimination des IOC's lors du développement de la rétine de la mouche, toutes les IOC's reçoivent le signal de mort (signalisation Notch), et que le signal de survie (voie EGFR) est donné aux cellules devant être épargnées.

La dépendance à un signal de survie externe permet aussi de réguler le bon nombre de cellules, en particulier si les cellules sont en compétition pour un facteur de survie. Le développement des neurones sympathétiques est un exemple connu. Ces neurones sont produits en grande quantité et engagent une compétition pour le facteur de survie Nerve Growth Factor (NGF) qui est sécrété par les cellules innervées. Seulement certains auront assez de NGF pour survivre, les autres mourront (Hockenbery et al. 1990). Dans le cas de la sélection des IOC's lors des phases d'apoptose, il est possible qu'un pool de Spitz (facteur de survie dans ce cas) soit produit et permette de sauver que le bon nombre d'IOC's.

Même si cela reste à être démontré, la compétition pour un facteur de survie permettrait aussi de sélectionner les cellules avec la meilleure fitness. Ainsi la cellule qui sera la plus en forme aura la meilleure capacité traductionnelle et exprimera plus de récepteur pouvant intégrer le signal de survie. Bien qu'il soit clair que dans certains cas des signaux provenant d'autres cellules régulent la survie d'une cellule, il reste encore à comprendre quels signaux sont émis et comment la quantité de signal de survie est régulée.

La régulation de la mort des cellules interommatidiales est un modèle parfait pour répondre à ces questions. Il est inutile de répertorier les avantages

d'utiliser le modèle *Drosophile*, mais ce modèle est facilement manipulable, et le processus de mort est quantifiable. De plus les cellules mises en jeu sont connues, tout comme les voies de signalisation qui interviennent dans ce processus développemental. Au cours de ma thèse j'ai démontré un rôle central des cellules cônes dans la production d'un signal anti-apoptotique. Alors que la voie Notch (pro-apoptotique) est active dans toutes les IOC's (celles qui vont mourir et celles qui vont survivre (Monserrate and Brachmann 2007)), les cellules cônes secrèteraient un signal de survie qui reste jusque-là inconnu. Nos résultats montrent que Spitz pourrait être le facteur diffusible de survie des IOC's. Pour le moment on ne sait pas comment le bon nombre d'IOC's est obtenu à la fin de la vague de mort. Une hypothèse serait que le facteur de survie soit en quantité limitée et parfaitement dosé pour permettre le maintien précis du nombre d'IOC's. *Spn* agirait sur la survie des IOC's en contrôlant une étape de la sécrétion de Spitz.

#### **4.7 Le rôle des soies dans la régulation de l'apoptose développementale**

Le rôle des cellules soies dans l'élimination des IOC's est débattu. La mort des cellules interommatidiales se produit principalement autour des soies (Monserrate and Brachmann 2007). Cependant, plusieurs études ont montré que lorsque les poils ne se forment pas l'apoptose a lieu quand même. Dans ces cas les soies se transforment typiquement en cellule pigmentaires tertiaires (Cagan and Ready 1989b, Cadigan et al. 2002, Zhai et al. 2012). Il semble ainsi admis dans la littérature que les soies ne jouent pas un rôle dans la régulation des signaux de mort ou de survie (Rusconi et al. 2000). Cependant ce constat se base uniquement sur le fait que la soie n'est pas formée et qu'elle est remplacée par une cellule pigmentaire tertiaire, suite à l'inactivation de la voie Wingless. Cette dernière contrôle l'expression de

gènes proneuronaux essentiels à la formation de la soie. Cependant on ne connaît rien quant à l'identité cellulaire de ces pseudo-cellules pigmentaires tertiaires. Il est en effet possible que la soie extérieure ne se développe pas mais que les cellules puissent encore envoyer certains signaux aux cellules interommatidiales voisines. D'ailleurs, l'affectation de gènes proneuronaux essentiels à la formation des soies peuvent conduire à la désorganisation des cellules interommatidiales voir un excès de mort (Frankfort et al. 2004). Pour le moment, le rôle des soies dans les processus d'éliminations des IOC's n'est pas clair. *Spn* est exprimé dans les quatre cellules formant la soie au cours des vagues d'apoptose. Il est important de savoir si cet effet sur les soies pourrait jouer sur l'excès de mort des cellules interommatidiales. L'analyse clonale a montré que la mutation des soies n'influçait pas le degré de mort des IOC's (Fig 3.10e). *Spn* serait requis dans les soies pour participer à leur formation, mais ce rôle serait distinct de celui joué dans les cellules cônes dans la mort des IOC's.

#### 4.8 *Spn* est requis pour la formation des soies

L'inactivation de *spn* avec le driver GMR-GAL4 entraîne des défauts de morphologie des soies (Fig 3.4) par un mécanisme encore inconnu. Une étude a montré que l'expression ectopique de *wg* (*wingless*) dans l'œil de drosophile grâce au promoteur *sevenless* (*sev*-GAL4) bloque la formation des soies interommatidiales. En effet *wg* inhibe l'expression des gènes proneuronaux (Cadigan and Nusse 1996, Cadigan et al. 2002). Il a été montré qu'inactiver *spn* bloque le phénotype induit par *sev-wg* (Lin 2003). Ce sauvetage peut être expliqué soit parce que *spn* inhibe les gènes proneuronaux à la manière de *wg*, soit parce que *spn* est un activateur de la voie *Wingless*. Les mêmes auteurs ont montrés que *achaete* (*ac*), un gène proneuronal régulé par *wg*, était fortement réprimé dans les clones *spn* alors que l'activa-

tion de la voie *wingless* restait inchangée (Lin 2003). Inactiver *spen* pourrait entraîner une diminution d'expression de gènes proneuronaux essentiels au développement des soies. Lors du développement de l'œil dans la puppe, la voie Notch est requise pour la formation des soies (Cagan and Ready 1989a). Inhiber Notch 6 heures APF conduit à des soies en trop, alors qu'inhiber Notch de 12 à 24 heures APF conduit à un œil avec presque plus aucun poil. Les poils absents semblent être remplacés par des cellules pigmentaires tertiaires. L'inactivation de *spen* ne semble pas affecter le nombre de soie mais plutôt leur structure, ce qui écarterait une implication de la voie Notch dans ce cas. De plus, Notch régule le devenir des soies par le processus de divisions asymétriques (Fig 1.15). Des défauts dans la division asymétrique donne des soies avec la cellule socket remplacée par une cellule sheath, ou le contraire (Lai 2004). Or nos observations d'œil mutant pour *spen* ne nous ont pas permis de voir de telles structures. *Spn* serait requis pour la formation des soies via son interaction génétique avec les gènes proneuronaux, ceci indépendamment de la voie Notch.

#### **4.9 Le gène *spen* contrôle la survie cellulaire de manière non cellule-autonome**

Le gène *spen* contrôle la survie des cellules interommatidiales au cours du développement de l'œil à partir des cellules cônes voisines (Fig. 3.10f et 3.9h, k). Dans le cerveau adulte, ce même gène contrôle la résistance au stress oxydatif, et donc indirectement la mort des neurones, et cela à partir des cellules gliales (Fig. 3.13f,g). Ce gène apparaît être essentiel au sein des cellules de soutien comme les cellules gliales pour assurer la survie des cellules voisines. Ce résultat soulève la question du rôle de soutien des cellules cônes dans l'œil de la mouche. Si le rôle de cellule de maintien de la glie chez la *Drosophile* a été étudié, le rôle de support des cellules cônes vis-à-vis des photorécep-

teurs est assez récent. Le système visuel de la *Drosophile* est constitué de huit photorécepteurs entourés de cellules accessoires. Ces cellules accessoires comprennent les cellules interommatidiales ainsi que les cellules pigmentaires primaires et les cellules cônes. Chez les mammifères, les photorécepteurs sont assistés par des cellules gliales (cellules gliales de Müller) ayant une fonction de support, notamment en recyclant des déchets et en assurant l'apport des nutriments aux neurones. Chez la *Drosophile* les cellules entourant les photorécepteurs ont été décrites dans des études pionnières, mais le possible rôle de ces cellules dans le support des PR est étudié depuis peu. Le gène *sparkling* (*spa*), homologue du gène *Pax2* est requis chez la *Drosophile* pour la formation des cellules cônes et des cellules pigmentaires primaires. Il est intéressant de noter que ce gène est exprimé dans les cellules cônes et les cellules pigmentaires primaires, mais aussi dans des cellules gliales, tout comme *spen*. De plus une mort des photorécepteurs est observée dans un mutant pour *spa* (Fu and Noll 1997). Ces informations suggèrent fortement un rôle des cellules cônes ou pigmentaires dans le maintien des photorécepteurs. De plus les cellules cônes expriment deux autres facteurs de transcription, *cut* et *prospero*, qui sont associés à la glie dans d'autres régions du système nerveux. Allant dans le même sens d'un rôle glial des cellules cônes, de nombreuses études ont montré que la viabilité des photorécepteurs était affectée dans des mutants affectant le développement des cellules cônes (Banerjee et al. 2008, Daga et al. 1996, Fu and Noll 1997, Siddall et al. 2003, Yan et al. 2003). Aussi, les cellules cônes entourent complètement les photorécepteurs (Cagan and Ready 1989a) à l'image par exemple des astrocytes autour des neurones. L'analyse des mécanismes génétiques contrôlés par *spen* permettra de comprendre comment ce gène intervient dans les cellules de support (cellule cône ou glie) pour assurer le maintien des cellules voisines.

## 4.10 L'expression gliale de *spen* contrôle la résistance au stress oxydatif dans le cerveau adulte

Nous avons montré que l'inactivation de *spen* conduisait à une sensibilité accrue des mouches à un stress oxydatif induit par un traitement au paraquat. L'inactivation d'une seule copie de *spen* est suffisante pour induire cette sensibilité (Fig. 3.13d, e). Plusieurs études ont d'ailleurs montré que le nombre de copies de *spen* est important dans son rôle de régulateur des voies de signalisation (Doroquez et al. 2007, Lin 2003). Par exemple, inhiber une seule copie de *spen* empêche la formation d'encoches dans l'aile de la mouche induites par l'inhibition de Notch. Toutefois, l'expression d'un ARNi contre *spen* dans la glie entraîne une sensibilité des mouches de même ampleur, ce qui suggère que c'est dans les cellules gliales que *spen* joue son rôle protecteur. De plus inhiber *spen* dans les neurones n'a aucun effet (Fig. 3.13g).

Pour le moment on ne connaît pas par quels mécanismes *spen* protège les cellules du stress oxydatif. Une première réponse viendrait de notre observation que l'activité de la voie Notch est réprimée en réponse à l'inhibition de *spen* dans les cellules gliales (Fig. 3.15c-e). A l'heure actuelle, même si les rôles précis de la voie Notch dans la résistance au stress oxydatif ou au déclenchement de maladies neurodégénératives ne sont pas certains, cette voie est connue pour permettre le maintien de l'intégrité neurale. L'inactivation de la voie Notch dans le cerveau adulte de la mouche entraîne une réduction de la survie et des capacités locomotrices de la mouche, mais ne cause pas de neurodégénérescence (Presente et al. 2001). Il est ainsi peu probable que les modulations d'activité de la voie Notch dans un contexte mutant pour *spen* puissent causer la mort de neurones.

Une seconde réponse pourrait venir du fait que la ferritine, un gène membre de la réponse anti-oxydante, soit sous-exprimée dans un mutant *spen* (Arosio and Levi 2010, Fig. 3.15b). La ferritine permet de maintenir

l'homéostasie du fer et de protéger du stress oxydatif. Une forte concentration en fer est détectée dans les zones sensibles (substance noire) dans des cas de Parkinson. Cette présence de fer causant des dommages aux cellules via un stress oxydatif. La source de fer n'est pas encore connue, mais ces différences de concentration peuvent être expliquées par la redistribution des enzymes de stockage et principalement la ferritine. Ainsi, lors de cas de Parkinson, la ferritine est localisée dans les cellules gliales et n'est plus dans les neurones (Double et al. 2000). *Spn* pourrait ainsi intervenir sur la survie des neurones en modulant l'expression de la ferritine dans la glie. Cette hypothèse peut être testée en sur-exprimant la ferritine dans la glie dans un contexte *spn* mutant. On s'attend ainsi à perdre la sensibilité au paraquat dans ces conditions. Au cours de notre étude, nous n'avons pas vu de modulation de la SOD (superoxyde dismutase) que ce soit en réponse à un traitement au paraquat ou dans un contexte mutant pour *spn*. Ce résultat est surprenant car la SOD est une enzyme de détoxification clé et est impliquée dans la maladie de Parkinson. Par exemple, l'expression ectopique de la SOD dans un modèle génétique de Parkinson chez la mouche protège de la neurodégénérescence (Wang et al. 2006).

Afin d'élargir notre compréhension sur le rôle de la glie dans la maladie de Parkinson, nous avons réalisé un crible génétique à partir de gènes candidats potentiellement liés à cette maladie. Nous avons vérifié l'expression de chaque gène dans le cerveau adulte de la mouche répertoriant ceux exprimés dans la glie, les neurones ou les deux. Cette liste de gène apporte ainsi un support pour comprendre les différents mécanismes conduisant ou aggravant la maladie de Parkinson dans un modèle *Drosophile*.

# Conclusion

Mes travaux de thèses concernent l'étude du gène *split ends* (*spen*) durant les phases tardives du développement et chez la mouche adulte. Le gène *spen* code pour une protéine nucléaire de haut poids moléculaire ayant la capacité d'intégrer des signaux de nombreuses voies de signalisation. J'ai montré que *spen* est requis lors du développement de l'œil pour promouvoir la survie des cellules interommatidiales (IOCs). *Spen* agit de manière non-autonome à partir des cellules cônes d'où il permettrait le relargage du ligand *spitz*. Ce dernier peut alors activer la voie de survie EGF dans les IOCs. De plus, *spen* régule la résistance des neurones au stress oxydatif dans le cerveau adulte à partir des cellules gliales. Des études sont pour le moment nécessaires pour comprendre à l'échelle moléculaire comment *spen* régule ces différentes voies de signalisation. Ces données permettront de savoir comment cette protéine assure de si nombreux rôles au cours du développement de la mouche.

# Bibliographie

- Abdelwahid, E., T. Yokokura, R. J. Krieser, S. Balasundaram, W. H. Fowle, and K. White, 2007. Mitochondrial disruption in *Drosophila* apoptosis. *Developmental Cell* 12 :793–806.
- Ahmed, Y., S. Hayashi, A. Levine, and E. Wieschaus, 1998. Regulation of armadillo by a *Drosophila* APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. *Cell* 93 :1171–1182.
- Akhavein, A. A. and D. L. Linscott, 1968. The dipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Residue Reviews* 23 :97–145.
- Alam, Z. I., S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden, P. Jenner, and B. Halliwell, 1997. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental lewy body disease. *Journal of Neurochemistry* 69 :1326–1329.
- Alexandre, C., M. Lecourtois, and J. Vincent, 1999. Wingless and hedgehog pattern *Drosophila* denticle belts by regulating the production of short-range signals. *Development* 126 :5689–5698.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan, 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 :171.
- Arama, E., M. Bader, M. Srivastava, A. Bergmann, and H. Steller, 2006. The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *The EMBO journal* 25 :232–243.
- Ariyoshi, M. and J. W. R. Schwabe, 2003. A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes & Development* 17 :1909–1920.
- Arosio, P. and S. Levi, 2010. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 :783–792.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake, 1999. Notch signaling : cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)* 284 :770–776.

- Aster, J. C., E. S. Robertson, R. P. Hasserjian, J. R. Turner, E. Kieff, and J. Sklar, 1997. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 272 :11336–11343.
- Baker, N. E. and S. Y. Yu, 2001. The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 104 :699–708.
- Ballard, K. J. and S. J. Holt, 1968. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot : the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *Journal of Cell Science* 3 :245–262.
- Banerjee, S., R. J. Bainton, N. Mayer, R. Beckstead, and M. A. Bhat, 2008. Septate junctions are required for ommatidial integrity and blood-eye barrier function in *Drosophila*. *Developmental Biology* 317 :585–599.
- Bao, S., 2014. Notch controls cell adhesion in the *Drosophila* eye. *PLoS genetics* 10 :e1004087.
- Bergmann, A., J. Agapite, K. McCall, and H. Steller, 1998. The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of ras-dependent survival signaling. *Cell* 95 :331–341.
- Bergmann, A., M. Tugentman, B. Z. Shilo, and H. Steller, 2002. Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis : a mechanism for trophic survival signaling. *Developmental Cell* 2 :159–170.
- Bertoldi, M., 2014. Mammalian Dopa decarboxylase : structure, catalytic activity and inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 546 :1–7.
- Besson, M.-T., P. Dupont, Y.-W. C. Fridell, and J.-C. Liévens, 2010. Increased energy metabolism rescues glia-induced pathology in a *drosophila* model of huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 19 :3372–3382.
- Bier, E., L. Y. Jan, and Y. N. Jan, 1990. *rhomboid*, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 4 :190–203.
- Botella, J. A., F. Bayersdorfer, F. Gmeiner, and S. Schneuwly, 2009. Modelling Parkinson's disease in *Drosophila*. *Neuromolecular Medicine* 11 :268–280.
- Brachmann, C. B. and R. L. Cagan, 2003. Patterning the fly eye : the role of apoptosis. *Trends in Genetics* 19 :91–96.
- Brodsky, M. H., B. T. Weinert, G. Tsang, Y. S. Rong, N. M. McGinnis, K. G. Golic, D. C. Rio, and G. M. Rubin, 2004. *Drosophila melanogaster* MNK/chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 24 :1219–1231.

- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, and A. Israel, 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling : the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 5 :207–216.
- Budnik, V. and K. White, 1987. Genetic dissection of dopamine and serotonin synthesis in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics* 4 :309–314.
- Burd, C. G. and G. Dreyfuss, 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265 :615–621.
- Cabrera, C. V., 1990. Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila* : the interactions between scute, Notch and Delta. *Development* 110 :733–742.
- Cadigan, K. M., A. D. Jou, and R. Nusse, 2002. Wingless blocks bristle formation and morphogenetic furrow progression in the eye through repression of Daughterless. *Development* 129 :3393–3402.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse, 1996. wingless signaling in the *Drosophila* eye and embryonic epidermis. *Development* 122 :2801–2812.
- Cagan, R. L. and D. F. Ready, 1989a. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Developmental Biology* 136 :346–362.
- Cagan, R. L. and D. F. Ready, 1989b. Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes & Development* 3 :1099–1112.
- Chang, J. L., H. V. Lin, T. A. Blauwkamp, and K. M. Cadigan, 2008. Spenito and Split ends act redundantly to promote Wingless signaling. *Developmental Biology* 314 :100–111.
- Chanut, F. and U. Heberlein, 1997. Role of decapentaplegic in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* retina. *Development* 124 :559–567.
- Chen, F. and I. Rebay, 2000. split ends, a new component of the *Drosophila* EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Current biology* 10 :943–946.
- Chew, S. K., F. Akdemir, P. Chen, W.-J. Lu, K. Mills, T. Daish, S. Kumar, A. Rodriguez, and J. M. Abrams, 2004. The apical caspase dronc governs programmed and unprogrammed cell death in *Drosophila*. *Developmental Cell* 7 :897–907.
- Clavería, C., J. P. Albar, A. Serrano, J. M. Buesa, J. L. Barbero, C. Martínez-A, and M. Torres, 1998. *Drosophila* grim induces apoptosis in mammalian cells. *The EMBO journal* 17 :7199–7208.
- Clem, R. J., J. M. Hardwick, and L. K. Miller, 1996. Anti-apoptotic genes of baculoviruses. *Cell Death and Differentiation* 3 :9–16.

- Copeland, J. M., I. Bosdet, J. D. Freeman, M. Guo, S. M. Gorski, and B. A. Hay, 2007. *echinus*, required for interommatidial cell sorting and cell death in the *Drosophila* pupal retina, encodes a protein with homology to ubiquitin-specific proteases. *BMC developmental biology* 7 :82.
- Cordero, J., O. Jassim, S. Bao, and R. Cagan, 2004. A role for wingless in an early pupal cell death event that contributes to patterning the *Drosophila* eye. *Mechanisms of Development* 121 :1523–1530.
- Coulom, H. and S. Birman, 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience* 24 :10993–10998.
- Cowan, W. M., J. W. Fawcett, D. D. O'Leary, and B. B. Stanfield, 1984. Regressive events in neurogenesis. *Science* 225 :1258–1265.
- Crawford, E. D. and J. A. Wells, 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual Review of Biochemistry* 80 :1055–1087.
- Culmsee, C. and M. P. Mattson, 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 :761–777.
- Daga, A., C. A. Karlovich, K. Dumstrei, and U. Banerjee, 1996. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by *Lozenge*, which shares homologous domains with *AML1*. *Genes & Development* 10 :1194–1205.
- Daish, T. J., K. Mills, and S. Kumar, 2004. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Developmental Cell* 7 :909–915.
- Dichtel-Danjoy, M.-L., D. Ma, P. Dourlen, G. Chatelain, F. Napoletano, M. Robin, M. Corbet, C. Levet, H. Hafi, P. Hainaut, H. D. Ryoo, J.-C. Bourdon, and B. Mollereau, 2013. *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death and Differentiation* 20 :108–116.
- Dickson, B., F. Sprenger, D. Morrison, and E. Hafen, 1992. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 360 :600–603.
- Dickson, B. J., A. van der Straten, M. Dominguez, and E. Hafen, 1996. Mutations modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development. *Genetics* 142 :163–171.
- Domingos, P. M., M. Mlodzik, C. S. Mendes, S. Brown, H. Steller, and B. Mollereau, 2004. Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 131 :5695–5702.
- Domínguez, M., J. D. Wasserman, and M. Freeman, 1998. Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development. *Current biology* 8 :1039–1048.

- Doroquez, D. B., T. L. Orr-Weaver, and I. Rebay, 2007. Split ends antagonizes the Notch and potentiates the EGFR signaling pathways during *Drosophila* eye development. *Mechanisms of Development* 124 :792–806.
- Dorstyn, L., K. Mills, Y. Lazebnik, and S. Kumar, 2004. The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. *The Journal of Cell Biology* 167 :405–410.
- Dos-Santos, N., T. Rubin, F. Chalvet, P. Gandille, F. Cremazy, J. Leroy, E. Boissonneau, and L. ThÃ©odore, 2008. *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene. *The International Journal of Developmental Biology* 52 :21–31.
- Double, K. L., M. Gerlach, M. B. Youdim, and P. Riederer, 2000. Impaired iron homeostasis in Parkinson’s disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum* pages 37–58.
- Doumanis, J., L. Quinn, H. Richardson, and S. Kumar, 2001. STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death and Differentiation* 8 :387–394.
- Dourlen, P., B. Bertin, G. Chatelain, M. Robin, F. Napoletano, M. J. Roux, and B. Molle-reau, 2012. *Drosophila* fatty acid transport protein regulates Rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival. *PLoS Genet* 8 :e1002833.
- D’Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27 :5148–5167.
- Du, W., J. E. Xie, and N. Dyson, 1996. Ectopic expression of dE2f and dDP induces cell proliferation and death in the *Drosophila* eye. *The EMBO journal* 15 :3684–3692.
- Edwards, T. N. and I. A. Meinertzhagen, 2010. The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Progress in Neurobiology* 90 :471–497.
- Fahn, S. and G. Cohen, 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson’s disease : evidence supporting it. *Annals of Neurology* 32 :804–812.
- Feng, Y., G. T. Bommer, Y. Zhai, A. Akyol, T. Hinoi, I. Winer, H. V. Lin, K. M. Cadigan, K. R. Cho, and E. R. Fearon, 2007. *Drosophila* split ends homologue SHARP functions as a positive regulator of Wnt/beta-catenin/T-cell factor signaling in neoplastic transformation. *Cancer Research* 67 :482–491.
- Fernandes, C. and Y. Rao, 2011. Genome-wide screen for modifiers of Parkinson’s disease genes in *Drosophila*. *Molecular Brain* 4 :17.
- Fichelson, P. and M. Gho, 2003. The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. *Development* 130 :123–133.

- Firth, L., J. Manchester, J. A. Lorenzen, M. Baron, and L. A. Perkins, 2000. Identification of genomic regions that interact with a viable allele of the *Drosophila* protein tyrosine phosphatase corkscrew. *Genetics* 156 :733–748.
- Fiúza, U.-M. and A. M. Arias, 2007. Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of Endocrinology* 194 :459–474.
- Fleming, R. J., T. N. Scottgale, R. J. Diederich, and S. Artavanis-Tsakonas, 1990. The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 4 :2188–2201.
- Flores, G. V., H. Duan, H. Yan, R. Nagaraj, W. Fu, Y. Zou, M. Noll, and U. Banerjee, 2000. Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 103 :75–85.
- Formosa-Jordan, P., M. Ibañes, S. Ares, and J.-M. Frade, 2013. Lateral inhibition and neurogenesis : novel aspects in motion. *The International Journal of Developmental Biology* 57 :341–350.
- Fortini, M. E., I. Rebay, L. A. Caron, and S. Artavanis-Tsakonas, 1993. An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing *Drosophila* eye. *Nature* 365 :555–557.
- Franceschini, N., K. Kirschfeld, and B. Minke, 1981. Fluorescence of photoreceptor cells observed in vivo. *Science* 213 :1264–1267.
- Frankfort, B. J., K. L. Pepple, M. Mamlouk, M. F. Rose, and G. Mardon, 2004. Senseless is required for pupal retinal development in *Drosophila*. *Genesis* 38 :182–194.
- Freel, C. D., D. A. Richardson, M. J. Thomenius, E. C. Gan, S. R. Horn, M. R. Olson, and S. Kornbluth, 2008. Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 283 :367–379.
- Freeman, M., 1996. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87 :651–660.
- Freeman, M., 1997. Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* 124 :261–270.
- Freeman, M., C. Klämbt, C. S. Goodman, and G. M. Rubin, 1992. The *argos* gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye. *Cell* 69 :963–975.
- Fu, W. and M. Noll, 1997. The *pax2* homolog *sparkling* is required for development of cone and pigment cells in the *Drosophila* eye. *Genes & Development* 11 :2066–2078.

- Gabay, L., H. Scholz, M. Golembo, A. Klaes, B. Z. Shilo, and C. Klämbt, 1996. EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* 122 :3355–3362.
- Gabay, L., R. Seger, and B. Z. Shilo, 1997. In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 277 :1103–1106.
- García-Domingo, D., D. Ramírez, G. González de Buitrago, and C. Martínez-A, 2003. Death inducer-obliterator 1 triggers apoptosis after nuclear translocation and caspase upregulation. *Molecular and Cellular Biology* 23 :3216–3225.
- Gellon, G., K. W. Harding, N. McGinnis, M. M. Martin, and W. McGinnis, 1997. A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development. *Development* 124 :3321–3331.
- Ghiglione, C., K. L. Carraway, L. T. Amundadottir, R. E. Boswell, N. Perrimon, and J. B. Duffy, 1999. The transmembrane molecule *kekkon 1* acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* 96 :847–856.
- Girardot, F., V. Monnier, and H. Tricoire, 2004. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics* 5 :74.
- Golembo, M., E. Raz, and B. Z. Shilo, 1996. The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* 122 :3363–3370.
- Golstein, P., D. M. Ojcius, and J. D. Young, 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunological Reviews* 121 :29–65.
- Goyal, G., B. Fell, A. Sarin, R. J. Youle, and V. Sriram, 2007. Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell* 12 :807–816.
- Grace, A. A., S. B. Floresco, Y. Goto, and D. J. Lodge, 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences* 30 :220–227.
- Greene, J. C., A. J. Whitworth, L. A. Andrews, T. J. Parker, and L. J. Pallanck, 2005. Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Human Molecular Genetics* 14 :799–811.
- Greenwood, S. and G. Struhl, 1999. Progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye : the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development* 126 :5795–5808.

- Greer, C. L., A. Grygoruk, D. E. Patton, B. Ley, R. Romero-Calderon, H.-Y. Chang, R. Houshyar, R. J. Bainton, A. Diantonio, and D. E. Krantz, 2005. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *Journal of Neurobiology* 64 :239–258.
- Grether, M. E., J. M. Abrams, J. Agapite, K. White, and H. Steller, 1995. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes & Development* 9 :1694–1708.
- Guntermann, S. and E. Foley, 2011. The protein Dredd is an essential component of the c-Jun N-terminal kinase pathway in the *Drosophila* immune response. *The Journal of Biological Chemistry* 286 :30284–30294.
- Hamburger, V., 1992. History of the discovery of neuronal death in embryos. *Journal of Neurobiology* 23 :1116–1123.
- Hammar, S. P. and N. K. Mottet, 1971. Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *Journal of Cell Science* 8 :229–251.
- Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga, and E. Nishida, 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/ MAPK signalling pathway. *Nature Cell Biology* 4 :850–858.
- Hartenstein, V., 2011. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. *Glia* 59 :1237–1252.
- Hay, B. A., D. A. Wassarman, and G. M. Rubin, 1995. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83 :1253–1262.
- Hay, B. A., T. Wolff, and G. M. Rubin, 1994. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120 :2121–2129.
- Heitzler, P., M. Bourouis, L. Ruel, C. Carteret, and P. Simpson, 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.
- Higashijima, S., T. Kojima, T. Michiue, S. Ishimaru, Y. Emori, and K. Saigo, 1992. Dual bar homeo box genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes & Development* 6 :50–60.
- Hiriart, E., H. Gruffat, M. Buisson, I. Mikaelian, S. Keppler, P. Meresse, T. Mercher, O. A. Bernard, A. Sergeant, and E. Manet, 2005. Interaction of the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 with human Spen proteins SHARP, OTT1, and a novel member of the family, OTT3, links Spen proteins with splicing regulation and mRNA export. *The Journal of Biological Chemistry* 280 :36935–36945.

- Hockenbery, D., G. Nuñez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer, 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 :334–336.
- Hrdlicka, L., M. Gibson, A. Kiger, C. Micchelli, M. Schober, F. Schöck, and N. Perrimon, 2002. Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* 34 :51–57.
- Hsieh, J. J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson, and S. D. Hayward, 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular and Cellular Biology* 16 :952–959.
- Hubé, F., G. Velasco, J. Rollin, D. Furling, and C. Francastel, 2011. Steroid receptor RNA activator protein binds to and counteracts SRA RNA-mediated activation of MyoD and muscle differentiation. *Nucleic Acids Research* 39 :513–525.
- Hunot, S., V. Bernard, B. Faucheux, F. Boissière, E. Leguern, C. Brana, P. P. Gautris, J. Guérin, B. Bloch, Y. Agid, and E. C. Hirsch, 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain : a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 103 :1043–1052.
- Igaki, T., H. Kanda, Y. Yamamoto-Goto, H. Kanuka, E. Kuranaga, T. Aigaki, and M. Miura, 2002. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *The EMBO journal* 21 :3009–3018.
- Jamieson, C., M. Sharma, and B. R. Henderson, 2014. Targeting the  $\beta$ -catenin nuclear transport pathway in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 27C :20–29.
- Jamilloux, Y. and T. Henry, 2013. The inflammasomes : platforms of innate immunity. *Médecine Sciences* 29 :975–984.
- Jenc, J. and I. Rebay, 2006. Characterization of the split ends-like gene *spenito* reveals functional antagonism between SPOC family members during *Drosophila* eye development. *Genetics* 173 :279–286.
- Kao, H. Y., P. Ordentlich, N. Koyano-Nakagawa, Z. Tang, M. Downes, C. R. Kintner, R. M. Evans, and T. Kadesch, 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes & Development* 12 :2269–2277.
- Kelley, R. L., 1993. Initial organization of the *Drosophila* dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the squid gene. *Genes & Development* 7 :948–960.
- Kerr, J. F., B. Harmon, and J. Searle, 1974. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *Journal of Cell Science* 14 :571–585.

- Kim, H. J. and D. Bar-Sagi, 2004. Modulation of signalling by Sprouty : a developing story. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 :441–450.
- Klein, D. E., V. M. Nappi, G. T. Reeves, S. Y. Shvartsman, and M. A. Lemmon, 2004. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature* 430 :1040–1044.
- Koch, U., R. Lehal, and F. Radtke, 2013. Stem cells living with a Notch. *Development* 140 :689–704.
- Koller, W. C., 1986. Paraquat and Parkinson’s disease. *Neurology* 36 :1147.
- Kolodziej, P. A., L. Y. Jan, and Y. N. Jan, 1995. Mutations that affect the length, fasciculation, or ventral orientation of specific sensory axons in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 15 :273–286.
- Kuang, B., S. C. Wu, Y. Shin, L. Luo, and P. Kolodziej, 2000. split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127 :1517–1529.
- Kumar, J. P., 2012. Building an ommatidium one cell at a time. *Developmental Dynamics* 241 :136–149.
- Kumar, S., 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14 :32–43.
- Kumimoto, E. L., T. R. Fore, and B. Zhang, 2013. Transcriptome profiling following neuronal and glial expression of ALS-linked SOD1 in *Drosophila*. *G3 (Bethesda, Md.)* .
- Kurada, P. and K. White, 1998. Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell* 95 :319–329.
- Kuroda, K., H. Han, S. Tani, K. Tanigaki, T. Tun, T. Furukawa, Y. Taniguchi, H. Kurooka, Y. Hamada, S. Toyokuni, and T. Honjo, 2003. Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18 :301–312.
- Kurooka, H., K. Kuroda, and T. Honjo, 1998. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Research* 26 :5448–5455.
- Lai, E. C., 2004. Notch signaling : control of cell communication and cell fate. *Development* 131 :965–973.
- Lane, M. E., M. Elend, D. Heidmann, A. Herr, S. Marzodko, A. Herzig, and C. F. Lehner, 2000. A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* 155 :233–244.

- Lange, K. W., M. B. Youdim, and P. Riederer, 1992. Neurotoxicity and neuroprotection in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 38 :27–44.
- Le Borgne, R. and F. Schweisguth, 2003. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Developmental Cell* 5 :139–148.
- Lee, J. R., S. Urban, C. F. Garvey, and M. Freeman, 2001. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107 :161–171.
- Leong, G. M., N. Subramaniam, L. L. Issa, J. B. Barry, T. Kino, P. H. Driggers, M. J. Hayman, J. A. Eisman, and E. M. Gardiner, 2004. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315 :1070–1076.
- Leulier, F., P. S. Ribeiro, E. Palmer, T. Tenev, K. Takahashi, D. Robertson, A. Zachariou, F. Pichaud, R. Ueda, and P. Meier, 2006. Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the *Drosophila* cell death machinery. *Cell Death and Differentiation* 13 :1663–1674.
- Li, J., J. Li, X. Yang, H. Qin, P. Zhou, Y. Liang, and H. Han, 2005. The C terminus of MINT forms homodimers and abrogates MINT-mediated transcriptional repression. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1729 :50–56.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang, 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 :479–489.
- Lieber, T., S. Kidd, E. Alcamo, V. Corbin, and M. W. Young, 1993. Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes & Development* 7 :1949–1965.
- Lim, H.-Y. and A. Tomlinson, 2006. Organization of the peripheral fly eye : the roles of Snail family transcription factors in peripheral retinal apoptosis. *Development* 133 :3529–3537.
- Lin, H. V., 2003. Splits ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development* 130 :3125–3135.
- Lin, H. V., A. Rogulja, and K. M. Cadigan, 2004. Wingless eliminates ommatidia from the edge of the developing eye through activation of apoptosis. *Development* 131 :2409–2418.
- Liochev, S. L., 1996. The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production. *Free Radical Research* 25 :369–384.

- Liu, X., P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. T. Garrard, and X. Wang, 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 :8461–8466.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israël, 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 :8108–8112.
- Lord, C. E. N. and A. H. L. A. N. Gunawardena, 2012. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *European Journal of Cell Biology* 91 :603–613.
- Lucin, K. M. and T. Wyss-Coray, 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration : too much or too little? *Neuron* 64 :110–122.
- Ludewig, A. H., C. Kober-Eisermann, C. Weitzel, A. Bethke, K. Neubert, B. Gerisch, H. Hutter, and A. Antebi, 2004. A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes & Development* 18 :2120–2133.
- Lüthi, A. U. and S. J. Martin, 2007. The CASBAH : a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 14 :641–650.
- Ma, C. and K. Moses, 1995. Wingless and patched are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila* compound eye. *Development* 121 :2279–2289.
- Mace, K. and A. Tugores, 2004. The product of the split ends gene is required for the maintenance of positional information during *Drosophila* development. *BMC developmental biology* 4 :15.
- Mace, K. A., J. C. Pearson, and W. McGinnis, 2005. An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head. *Science* 308 :381–385.
- Maris, C., C. Dominguez, and F. H.-T. Allain, 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS journal* 272 :2118–2131.
- Marques, C. A., U. Keil, A. Bonert, B. Steiner, C. Haass, W. E. Muller, and A. Eckert, 2003. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer’s disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation : oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 278 :28294–28302.
- Matsuda, S., J. Blanco, and O. Shimmi, 2013. A feed-forward loop coupling extracellular BMP transport and morphogenesis in *Drosophila* wing. *PLoS genetics* 9 :e1003403.

- Matunis, E. L., R. Kelley, and G. Dreyfuss, 1994. Essential role for a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) in oogenesis : hrp40 is absent from the germ line in the dorsoventral mutant squid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 :2781–2784.
- Mayer, U. and C. Nüsslein-Volhard, 1988. A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 2 :1496–1511.
- McCright, B., X. Gao, L. Shen, J. Lozier, Y. Lan, M. Maguire, D. Herzlinger, G. Weinmaster, R. Jiang, and T. Gridley, 2001. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 128 :491–502.
- McNeill, H. and J. Downward, 1999. Apoptosis : Ras to the rescue in the fly eye. *Current biology* 9 :R176–179.
- Meier, P., J. Silke, S. J. Leever, and G. I. Evan, 2000. The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *The EMBO journal* 19 :598–611.
- Mendes, C. S., E. Arama, S. Brown, H. Scherr, M. Srivastava, A. Bergmann, H. Steller, and B. Mollereau, 2006. Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila* retina. *EMBO reports* 7 :933–939.
- Miller, D. T. and R. L. Cagan, 1998. Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* 125 :2327–2335.
- Milo, R., S. Shen-Orr, S. Itzkovitz, N. Kashtan, D. Chklovskii, and U. Alon, 2002. Network motifs : simple building blocks of complex networks. *Science* 298 :824–827.
- Miura, G. I., J. Buglino, D. Alvarado, M. A. Lemmon, M. D. Resh, and J. E. Treisman, 2006. Palmitoylation of the EGFR ligand Spitz by Rasp increases Spitz activity by restricting its diffusion. *Developmental Cell* 10 :167–176.
- Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami, and T. Nagatsu, 1994. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters* 180 :147–150.
- Monserrate, J. P. and C. B. Brachmann, 2007. Identification of the death zone : a spatially restricted region for programmed cell death that sculpts the fly eye. *Cell Death and Differentiation* 14 :209–217.
- Morel, V., R. Le Borgne, and F. Schweisguth, 2003. Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression. *Development Genes and Evolution* 213 :65–72.

- Morel, V., M. Lecourtois, O. Massiani, D. Maier, A. Preiss, and F. Schweisguth, 2001. Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Current biology* 11 :789–792.
- Moreno, E., M. Yan, and K. Basler, 2002. Evolution of TNF signaling mechanisms : JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Current biology* 12 :1263–1268.
- Morgan, T. H., 1910. Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32 :120–122.
- Nagaraj, R. and U. Banerjee, 2007. Combinatorial signaling in the specification of primary pigment cells in the *Drosophila* eye. *Development* 134 :825–831.
- Nagel, A. C., A. Krejci, G. Tenin, A. Bravo-Patiño, S. Bray, D. Maier, and A. Preiss, 2005. Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Molecular and Cellular Biology* 25 :10433–10441.
- Nagel, S., L. Venturini, G. K. Przybylski, P. Grabarczyk, C. Meyer, M. Kaufmann, K. Battmer, C. A. Schmidt, H. G. Drexler, M. Scherr, and R. A. Macleod, 2009. NK-like homeodomain proteins activate NOTCH3-signaling in leukemic T-cells. *BMC cancer* 9 :371.
- Nam, Y., P. Sliz, L. Song, J. C. Aster, and S. C. Blacklow, 2006. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* 124 :973–983.
- Napoletano, F., S. Occhi, P. Calamita, V. Volpi, E. Blanc, B. Charroux, J. Royet, and M. Fanto, 2011. Polyglutamine Atrophin provokes neurodegeneration in *Drosophila* by repressing fat. *The EMBO journal* 30 :945–958.
- Ndozangue-Touriguine, O., J. Hamelin, and J. Bréard, 2008. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 76 :11–18.
- Newberry, E. P., T. Latifi, and D. A. Towler, 1999. The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* 38 :10678–10690.
- Nordstrom, W., P. Chen, H. Steller, and J. M. Abrams, 1996. Activation of the reaper gene during ectopic cell killing in *Drosophila*. *Developmental Biology* 180 :213–226.
- Oellers, N., M. Dehio, and E. Knust, 1994. bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Molecular & general genetics* 244 :465–473.
- Okajima, T., A. Xu, and K. D. Irvine, 2003. Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *The Journal of Biological Chemistry* 278 :42340–42345.

- Orr, C. F., D. B. Rowe, Y. Mizuno, H. Mori, and G. M. Halliday, 2005. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain : A Journal of Neurology* 128 :2665–2674.
- Oswald, F., 2002. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-jkappa signalling pathway. *The EMBO Journal* 21 :5417–5426.
- Pai, L. M., G. Barcelo, and T. Schüpbach, 2000. D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* 103 :51–61.
- Palgi, M., R. Lindström, J. Peränen, T. P. Piepponen, M. Saarma, and T. I. Heino, 2009. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 :2429–2434.
- Parks, A. L., F. R. Turner, and M. A. Muskavitch, 1995. Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development. *Mechanisms of Development* 50 :201–216.
- Peterson, C., G. E. Carney, B. J. Taylor, and K. White, 2002. reaper is required for neuroblast apoptosis during *Drosophila* development. *Development* 129 :1467–1476.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 :e45.
- Pichaud, F. and C. Desplan, 2001. A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development* 128 :815–826.
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 14 :1837–1851.
- Portin, P., 2002. General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster* : a review. *Hereditas* 136 :89–96.
- Presente, A., A. Andres, and J. S. Nye, 2001. Requirement of Notch in adulthood for neurological function and longevity. *Neuroreport* 12 :3321–3325.
- Protzer, C. E., I. Wech, and A. C. Nagel, 2008. Hairless induces cell death by downregulation of EGFR signalling activity. *Journal of Cell Science* 121 :3167–3176.
- Qi, H., M. D. Rand, X. Wu, N. Sestan, W. Wang, P. Rakic, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakonas, 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283 :91–94.
- Quintana, C. and L. Gutiérrez, 2010. Could a dysfunction of ferritin be a determinant factor in the aetiology of some neurodegenerative diseases? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 :770–782.

- Radtke, F. and K. Raj, 2003. The role of Notch in tumorigenesis : oncogene or tumour suppressor? *Nature Reviews. Cancer* 3 :756–767.
- Raff, M. C., 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356 :397–400.
- Raffel, G. D., T. Mercher, H. Shigematsu, I. R. Williams, D. E. Cullen, K. Akashi, O. A. Bernard, and D. G. Gilliland, 2007. *Ott1*(*rbm15*) has pleiotropic roles in hematopoietic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 :6001–6006.
- Ramos, R. G., G. L. Igloi, B. Lichte, U. Baumann, D. Maier, T. Schneider, J. H. Brandstätter, A. Fröhlich, and K. F. Fischbach, 1993. The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes & Development* 7 :2533–2547.
- Ransohoff, R. M. and V. H. Perry, 2009. Microglial physiology : unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology* 27 :119–145.
- Raoul, C., A. G. Estévez, H. Nishimune, D. W. Cleveland, O. deLapeyrière, C. E. Henderson, G. Haase, and B. Pettmann, 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35 :1067–1083.
- Ready, D. F., T. E. Hanson, and S. Benzer, 1976. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Developmental Biology* 53 :217–240.
- Rebay, I., F. Chen, F. Hsiao, P. A. Kolodziej, B. H. Kuang, T. Laverty, C. Suh, M. Voas, A. Williams, and G. M. Rubin, 2000. A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* 154 :695–712.
- Rebay, I., R. J. Fleming, R. G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas, and S. Artavanis-Tsakonas, 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate : implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67 :687–699.
- Rebay, I. and G. M. Rubin, 1995. Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* 81 :857–866.
- Reeves, G. T., R. Kalifa, D. E. Klein, M. A. Lemmon, and S. Y. Shvartsman, 2005. Computational analysis of EGFR inhibition by Argos. *Developmental Biology* 284 :523–535.
- Reiter, C., T. Schimansky, Z. Nie, and K. F. Fischbach, 1996. Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina : the role of the IrreC-rst protein. *Development* 122 :1931–1940.

- Rhyu, M. S., L. Y. Jan, and Y. N. Jan, 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76 :477–491.
- Rival, T., L. Soustelle, C. Strambi, M.-T. Besson, M. Iché, and S. Birman, 2004. Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the *Drosophila* brain. *Current biology* 14 :599–605.
- Robinow, S. and K. White, 1991. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *Journal of Neurobiology* 22 :443–461.
- Roegiers, F. and Y. N. Jan, 2004. Asymmetric cell division. *Current Opinion in Cell Biology* 16 :195–205.
- Royet, J. and R. Finkelstein, 1997. Establishing primordia in the *Drosophila* eye-antennal imaginal disc : the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development* 124 :4793–4800.
- Rubin, G. M., 1989. Development of the *Drosophila* retina : inductive events studied at single cell resolution. *Cell* 57 :519–520.
- Rusconi, J. C., J. L. Fink, and R. Cagan, 2004. klumpfuss regulates cell death in the *Drosophila* retina. *Mechanisms of Development* 121 :537–546.
- Rusconi, J. C., R. Hays, and R. L. Cagan, 2000. Programmed cell death and patterning in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 7 :1063–1070.
- Rutledge, B. J., K. Zhang, E. Bier, Y. N. Jan, and N. Perrimon, 1992. The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes & Development* 6 :1503–1517.
- Ryoo, H. D., A. Bergmann, H. Gonen, A. Ciechanover, and H. Steller, 2002. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nature Cell Biology* 4 :432–438.
- Sakamaki, K. and Y. Satou, 2009. Caspases : evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology* 74 :727–753.
- Salvesen, G. S. and J. M. Abrams, 2004. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? *Lessons from humans and flies. Oncogene* 23 :2774–2784.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett, 2002. IAP proteins : blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 :401–410.
- Samuels, M., G. Deshpande, and P. Schedl, 1998. Activities of the Sex-lethal protein in RNA binding and protein :protein interactions. *Nucleic Acids Research* 26 :2625–2637.

- Sánchez-Pulido, L., A. M. Rojas, K. H. van Wely, C. Martinez-A, and A. Valencia, 2004. SPOC : a widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription. *BMC bioinformatics* 5 :91.
- Sandu, C., H. D. Ryoo, and H. Steller, 2010. Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *The Journal of Cell Biology* 190 :1039–1052.
- Sapir, A., E. Assa-Kunik, R. Tsruya, E. Schejter, and B.-Z. Shilo, 2005. Unidirectional Notch signaling depends on continuous cleavage of Delta. *Development* 132 :123–132.
- Saporito, M. S., B. A. Thomas, and R. W. Scott, 2000. MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *Journal of Neurochemistry* 75 :1200–1208.
- Sawamoto, n., n. Taguchi, n. Hirota, n. Yamada, n. Jin, and n. Okano, 1998. Argos induces programmed cell death in the developing Drosophila eye by inhibition of the Ras pathway. *Cell Death and Differentiation* 5 :262–270.
- Scaffidi, C., S. Kirchhoff, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1999. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 11 :277–285.
- Schlesinger, A., A. Kiger, N. Perrimon, and B.-Z. Shilo, 2004. Small wing PLCgamma is required for ER retention of cleaved Spitz during eye development in Drosophila. *Developmental Cell* 7 :535–545.
- Schnepp, B., G. Grumblin, T. Donaldson, and A. Simcox, 1996. Vein is a novel component in the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes & Development* 10 :2302–2313.
- Schweisguth, F., 2004. Regulation of notch signaling activity. *Current biology* 14 :R129–138.
- Schweisguth, F. and J. W. Posakony, 1992. Suppressor of Hairless, the Drosophila homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* 69 :1199–1212.
- Schweisguth, F. and J. W. Posakony, 1994. Antagonistic activities of Suppressor of Hairless and Hairless control alternative cell fates in the Drosophila adult epidermis. *Development* 120 :1433–1441.
- Schweitzer, R., R. Howes, R. Smith, B. Z. Shilo, and M. Freeman, 1995a. Inhibition of Drosophila EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* 376 :699–702.
- Schweitzer, R., M. Shaharabany, R. Seger, and B. Z. Shilo, 1995b. Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes & Development* 9 :1518–1529.
- Shi, Y., 2008. Apoptosome assembly. *Methods in Enzymology* 442 :141–156.

- Shi, Y., M. Downes, W. Xie, H. Y. Kao, P. Ordentlich, C. C. Tsai, M. Hon, and R. M. Evans, 2001. Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes & Development* 15 :1140–1151.
- Shilo, B. Z., 2003. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Experimental Cell Research* 284 :140–149.
- Shilo, B.-Z., 2005. Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* 132 :4017–4027.
- Shoup, J. R., 1966. The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology* 29 :223–249.
- Siddall, N. A., K. J. Behan, J. R. Crew, T. L. Cheung, J. A. Fair, P. Batterham, and J. A. Pollock, 2003. Mutations in *lozenge* and *D-Pax2* invoke ectopic patterned cell death in the developing *Drosophila* eye using distinct mechanisms. *Development Genes and Evolution* 213 :107–119.
- Simon, F., P. Fichelson, M. Gho, and A. Audibert, 2009. Notch and Prospero repress proliferation following cyclin E overexpression in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS genetics* 5 :e1000594.
- Siomi, H. and G. Dreyfuss, 1997. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 7 :345–353.
- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel, and F. Logeat, 2003. The Notch ligand *Delta1* is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 :7638–7643.
- Sogame, N., M. Kim, and J. M. Abrams, 2003. *Drosophila* p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 :4696–4701.
- Staehling-Hampton, K., P. J. Ciampa, A. Brook, and N. Dyson, 1999. A genetic screen for modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153 :275–287.
- Steller, H., 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267 :1445–1449.
- Stowers, R. S. and T. L. Schwarz, 1999. A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics* 152 :1631–1639.
- Strisovsky, K., H. J. Sharpe, and M. Freeman, 2009. Sequence-specific intramembrane proteolysis : identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Molecular Cell* 36 :1048–1059.

- Tait, S. W. G., A. B. Werner, E. de Vries, and J. Borst, 2004. Mechanism of action of Drosophila Reaper in mammalian cells : Reaper globally inhibits protein synthesis and induces apoptosis independent of mitochondrial permeability. *Cell Death and Differentiation* 11 :800–811.
- Tanigaki, K. and T. Honjo, 2010. Two opposing roles of RBP-J in Notch signaling. *Current Topics in Developmental Biology* 92 :231–252.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, and S. J. Martin, 2008. Apoptosis : controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 :231–241.
- Thackeray, J. R., P. C. Gaines, P. Ebert, and J. R. Carlson, 1998. small wing encodes a phospholipase C-(gamma) that acts as a negative regulator of R7 development in Drosophila. *Development* 125 :5033–5042.
- Thomenius, M., C. D. Freel, S. Horn, R. Krieser, E. Abdelwahid, R. Cannon, S. Balasundaram, K. White, and S. Kornbluth, 2011. Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate Drosophila programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 18 :1640–1650.
- Tomlinson, A., Y. E. Mavromatakis, and G. Struhl, 2011. Three distinct roles for notch in Drosophila R7 photoreceptor specification. *PLoS biology* 9 :e1001132.
- Tomlinson, A. and D. F. Ready, 1987. Cell fate in the Drosophila ommatidium. *Developmental Biology* 123 :264–275.
- Treisman, J. E. and G. M. Rubin, 1995. wingless inhibits morphogenetic furrow movement in the Drosophila eye disc. *Development* 121 :3519–3527.
- Tschan, T., I. Höerler, Y. Houze, K. H. Winterhalter, C. Richter, and P. Bruckner, 1990. Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *The Journal of Cell Biology* 111 :257–260.
- Tsruya, R., A. Schlesinger, A. Reich, L. Gabay, A. Sapir, and B.-Z. Shilo, 2002. Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the Drosophila EGF receptor ligand Spitz. *Genes & Development* 16 :222–234.
- Tsuda, L., R. Nagaraj, S. L. Zipursky, and U. Banerjee, 2002. An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes delta expression by inactivating Su(h)/SMRTER repression during inductive notch signaling. *Cell* 110 :625–637.
- Tsuji, M., R. Shinkura, K. Kuroda, D. Yabe, and T. Honjo, 2007. Msx2-interacting nuclear target protein (Mint) deficiency reveals negative regulation of early thymocyte differentiation by Notch/RBP-j signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 :1610–1615.
- Urban, S., J. R. Lee, and M. Freeman, 2001. Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107 :173–182.

- Vadlamudi, R. K., B. Manavathi, R. R. Singh, D. Nguyen, F. Li, and R. Kumar, 2005. An essential role of Pak1 phosphorylation of SHARP in Notch signaling. *Oncogene* 24 :4591–4596.
- van der Geer, P., T. Hunter, and R. A. Lindberg, 1994. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual Review of Cell Biology* 10 :251–337.
- Vässin, H., K. A. Bremer, E. Knust, and J. A. Campos-Ortega, 1987. The neurogenic gene Delta of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF-like repeats. *The EMBO journal* 6 :3431–3440.
- Wallberg, A. E., K. Pedersen, U. Lendahl, and R. G. Roeder, 2002. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 22 :7812–7819.
- Waltzer, L., P. Y. Bourillot, A. Sergeant, and E. Manet, 1995. RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Research* 23 :4939–4945.
- Wang, D., L. Qian, H. Xiong, J. Liu, W. S. Neckameyer, S. Oldham, K. Xia, J. Wang, R. Bodmer, and Z. Zhang, 2006. Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 :13520–13525.
- Wang, S. L., C. J. Hawkins, S. J. Yoo, H. A. Müller, and B. A. Hay, 1999. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* 98 :453–463.
- Wang, W., L. Shi, Y. Xie, C. Ma, W. Li, X. Su, S. Huang, R. Chen, Z. Zhu, Z. Mao, Y. Han, and M. Li, 2004. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience Research* 48 :195–202.
- Wasserman, J. D. and M. Freeman, 1997. Control of EGF receptor activation in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology* 7 :431–436.
- Wasserman, J. D., S. Urban, and M. Freeman, 2000. A family of rhomboid-like genes : *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes & Development* 14 :1651–1663.
- Wheeler, S. R., S. B. Stagg, and S. T. Crews, 2008. Multiple Notch signaling events control *Drosophila* CNS midline neurogenesis, gliogenesis and neuronal identity. *Development* 135 :3071–3079.
- Whitworth, A. J., 2011. *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Advances in Genetics* 73 :1–50.

- Wiellette, E. L., K. W. Harding, K. A. Mace, M. R. Ronshaugen, F. Y. Wang, and W. McGinnis, 1999. *spen* encodes an RNP motif protein that interacts with Hhox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* 126 :5373–5385.
- Wildonger, J., A. Sosinsky, B. Honig, and R. S. Mann, 2005. *Lozenge* directly activates *argos* and *klumpfuss* to regulate programmed cell death. *Genes & Development* 19 :1034–1039.
- Wilson, R., L. Goyal, M. Ditzel, A. Zachariou, D. A. Baker, J. Agapite, H. Steller, and P. Meier, 2002. The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of *Dronc* and is indispensable for regulating apoptosis. *Nature Cell Biology* 4 :445–450.
- Wolff, T. and D. F. Ready, 1991. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113 :825–839.
- Wolff, T. and D. F. Ready, 1993. The development of *Drosophila melanogaster*, chapter Pattern formation in the *Drosophila* retina, pages 1277–1325. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wu, J. N., N. Nguyen, M. Aghazarian, Y. Tan, E. A. Sevrioukov, M. Mabuchi, W. Tang, J. P. Monserrate, K. White, and C. B. Brachmann, 2010. *grim* promotes programmed cell death of *Drosophila* microchaete glial cells. *Mechanisms of Development* 127 :407–417.
- Wyllie, A. H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 :555–556.
- Wyllie, A. H., G. J. Beattie, and A. D. Hargreaves, 1981. Chromatin changes in apoptosis. *The Histochemical Journal* 13 :681–692.
- Xu, D., Y. Li, M. Arcaro, M. Lackey, and A. Bergmann, 2005. The CARD-carrying caspase *Dronc* is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. *Development* 132 :2125–2134.
- Yamada, T., P. L. McGeer, and E. G. McGeer, 1992. Lewy bodies in Parkinson’s disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathologica* 84 :100–104.
- Yan, H., J. Canon, and U. Banerjee, 2003. A transcriptional chain linking eye specification to terminal determination of cone cells in the *Drosophila* eye. *Developmental Biology* 263 :323–329.
- Yang, L. and N. E. Baker, 2001. Role of the EGFR/Ras/Raf pathway in specification of photoreceptor cells in the *Drosophila* retina. *Development* 128 :1183–1191.

- Yang, L. and N. E. Baker, 2006. Notch activity opposes Ras-induced differentiation during the Second Mitotic Wave of the developing *Drosophila* eye. *BMC developmental biology* 6 :8.
- Yang, X., J. Li, H. Qin, H. Yang, J. Li, P. Zhou, Y. Liang, and H. Han, 2005. Mint represses transactivation of the type II collagen gene enhancer through interaction with alpha A-crystallin-binding protein 1. *The Journal of Biological Chemistry* 280 :18710–18716.
- Yoo, S. J., J. R. Huh, I. Muro, H. Yu, L. Wang, S. L. Wang, R. M. R. Feldman, R. J. Clem, H.-A. J. Müller, and B. A. Hay, 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biology* 4 :416–424.
- Yu, S.-Y., S. J. Yoo, L. Yang, C. Zapata, A. Srinivasan, B. A. Hay, and N. E. Baker, 2002. A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development* 129 :3269–3278.
- Zhai, Z., N. Ha, F. Papagiannouli, A. Hamacher-Brady, N. Brady, S. Sorge, D. Bezdan, and I. Lohmann, 2012. Antagonistic regulation of apoptosis and differentiation by the Cut transcription factor represents a tumor-suppressing mechanism in *Drosophila*. *PLoS genetics* 8 :e1002582.
- Zhang, L., V. L. Dawson, and T. M. Dawson, 2006. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics* 109 :33–41.
- Zhou, L., A. Schnitzler, J. Agapite, L. M. Schwartz, H. Steller, and J. R. Nambu, 1997. Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 :5131–5136.
- Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi, and R. Reed, 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419 :182–185.
- Zimmermann, K. C., J.-E. Ricci, N. M. Droin, and D. R. Green, 2002. The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *The Journal of Cell Biology* 156 :1077–1087.

# Appendices

## Liste des publications

Sonneville, R., M. Querenet, A. Craig, A. Gartner, and J. J. Blow, 2012. The dynamics of replication licensing in live *Caenorhabditis elegans* embryos. *The Journal of Cell Biology* 196 :233-246.

Jamilloux, Y., R. Pierini, M. Querenet, C. Juruj, A.-L. Fauchais, M.-O. Jauberteau, S. Jarraud, G. Lina, J. Etienne, C. R. Roy, T. Henry, N. Davoust, and F. Ader, 2013. In ammasome activation restricts *Legionella pneumophila* replication in primary microglial cells through flagellin detection. *Glia* 61 :539-549.

Ducuing, A. and M. Querenet, 2013. Cholesterol-free and cholesterol-bound hedgehog : Two sparring-partners working hand in hand in the *Drosophila* wing disc ? *Fly* 7 :213- 215.

Querenet, M., Chatelain, G., Davoust, N. and Mollereau B., Spen is required for pigment cell survival during *Drosophila* pupal development. (submitted)

Querenet, M., Thevenon, D., Danjoy, M.-L., Fauvarque, M.-O., Mollereau, B. and Davoust N., The dengue virus NS3 protein interacts with Cactus and interferes with Dorsal dependent gene expression in *Drosophila*. (submitted)

1 The dengue virus NS3 protein interacts with Cactus and interferes with Dorsal  
2 dependent gene expression in *Drosophila*.

3

4 Matthieu Querenet<sup>1</sup>, Dominique Thevenon<sup>2</sup>, Marie-Laure Danjoy<sup>1</sup>, Marie-Odile Fauvarque<sup>2</sup> Bertrand  
5 Mollereau<sup>1</sup> and Nathalie Davoust<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup> Université de Lyon, Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239 CNRS/Ecole Normale  
8 Supérieure de Lyon, UMS 344 Biosciences Lyon Gerland, 69007 Lyon, France.

9 <sup>2</sup> Univ. Grenoble Alpes, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble, France; CEA, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble,  
10 France; INSERM.

11

12 *Corresponding authors: Nathalie Davoust, [nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr](mailto:nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr) and Bertrand*  
13 *Mollereau Bertrand.mollereau@ens-lyon.fr*

14

15 ABSTRACT

16 Dengue virus NS3 is a multifunctional protein playing a major role during viral replication. Both NS3  
17 protease and NS3 helicase domains are interacting with human and insect host proteins. To further  
18 study the links between NS3 and the innate immune machinery of the host, we developed a  
19 *Drosophila* model in which the dengue virus NS3 protein is expressed in a tissue specific and  
20 inducible manner. We first characterized the NS3 transgenic flies showing that ubiquitous or  
21 immune-specific NS3 expression did not affect the life span or the response to a non-infectious stress  
22 of the flies. We found that the helicase domain of DENV NS3 interacts with Cactus, the *Drosophila*  
23 ortholog of I $\kappa$ B $\alpha$ . Interestingly, the *Drosophila* transgenic lines expressing NS3 showed a lower basal  
24 level of *Drosomyacin* and *Attacin* anti-microbial peptide genes suggesting an immune suppressive  
25 function of NS3 *in vivo*. However, depending on the NS3 expression conditions, flies susceptibility to  
26 infection and antimicrobial peptide genes expression were not, or only slightly modified, in the  
27 context of bacterial infection.

28

## 29 INTRODUCTION

30 The genus *Flavivirus* is a large group of arthropod-borne viruses including major human pathogens,  
31 such as West Nile (WNV), yellow fever (YFV), and the four serotypes of dengue viruses (DENV types  
32 1-4) [1,2]. DENV are mosquitoes-borne pathogens that are transmitted to human by *Aedes*  
33 mosquitoes including *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In order to develop new therapeutic  
34 approaches, a growing scientific community is working on *Aedes* with the rationale that targeting the  
35 arthropod vector to interfere with virus transmission should limit its spreading to humans [3].  
36 Indeed, recent studies have demonstrated that infection by endosymbiotic bacterium *Wolbachia*  
37 induces resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti* and suppresses its transmission [4,5]. In this  
38 context, understanding how DENV replication may be controlled in arthropods is of major  
39 importance. To achieve this goal, and to better characterize the innate immune response against the  
40 virus, several approaches have been followed using either *Aedes* or *Drosophila* models. These  
41 approaches include genome wide RNAi interference screen in *Drosophila* [6], whole-genome  
42 microarray in *Aedes aegypti* [7] and evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in  
43 disease-vector mosquitoes [8]. Importantly, the antimicrobial Toll pathway was shown to control  
44 Dengue virus infection in *Aedes aegypti* [9–11] but was not required for *Wolbachia* mediated dengue  
45 virus interference in *Drosophila* [12].

46 The evolutionary conservation of innate mechanisms of host defense has made *Drosophila* a useful  
47 model to study the genetic control of innate immune response. Indeed, the two NF- $\kappa$ B signaling  
48 cascades that regulate *Drosophila* antimicrobial defense responses share striking similarities with the  
49 vertebrate innate immune responses. Activation of the Toll pathway in particular triggers the  
50 expression of a set of antimicrobial peptide genes including *Attacin A* (Att-A) and *Drosomycin* (*Drs*) in  
51 a Cactus dependent manner [13]. Cactus is the *Drosophila* ortholog of the mammalian kinase I $\kappa$ B $\alpha$ . In  
52 steady state condition; Cactus inhibits the nuclear translocation of Dif, Dorsal-related Immunity  
53 Factor (ortholog of p65). After activation, Cactus releases Dif from the cytoplasm allowing its

54 translocation to the nucleus [14]. The Toll cascade is highly similar to the mammalian TLR (Toll-like  
55 receptor) receptor pathway [15].

56 In order to identify interactions between cellular and DENV proteins, we have constructed a  
57 Flavivirus-host interaction map using a genome-wide high-throughput yeast two-hybrid screen (Y2H)  
58 [16]. The global analysis of the cellular targets highlighted the enrichment of host proteins involved  
59 in RNA binding, transcription regulation, vesicular transport or innate immune response regulation.  
60 Using both Y2H and co-immunoprecipitation approaches, we previously found that NS3, a non-  
61 structural protein of DENV targets I $\kappa$ B $\alpha$ , TRAF4 and AZI2, three cellular proteins of the Toll-like  
62 receptor (TLR) pathway [16]. NS3 is a multifunctional protein that contains an N-terminal protease  
63 domain and a C-terminal domain that displays nucleotide 5'-triphosphatase (NTPase), RTPase, and  
64 helicase activities. In association with NS5 and NS2B, NS3 plays a crucial role in DENV RNA replication  
65 and viral protein maturation [17]. As our screen unraveled the interactions of NS3 helicase domain  
66 with I $\kappa$ B $\alpha$ , we aimed to assess the functional consequences of this interaction on the innate immune  
67 response.

68 We thus used the UAS-Gal4 system to express the dengue NS3 either as full-length protein (NS3 Fl)  
69 or as NS3 helicase (NS3 Hel) functional domain in *Drosophila melanogaster*. We found that  
70 ubiquitous or tissue-directed NS3 or NS3 Hel expression was well tolerated by the flies and did affect  
71 neither their life span nor their response to a non-infectious stress. In contrast, we showed that flies  
72 expressing NS3 or NS3 Hel in the fat body had a significantly lower basal level of transcriptional  
73 activity of *Attacin A* and *Drosomycin* antimicrobial peptides encoding genes. In addition, we observed  
74 that DENV NS3 helicase domain interacts with the *Drosophila* I $\kappa$ B $\alpha$  homologous, Cactus.  
75 Nevertheless, following a challenge with the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, we did not  
76 observe robust differences in flies survival rate or the level of anti-microbial peptide genes  
77 expression in NS3 expressing flies compared to control flies.

78

79 MATERIAL AND METHODS

80 Transgenic *Drosophila*. We cloned DENV2 NS3 helicase domain and DENV2 full-length NS3 protein  
81 cDNA into the GAL4-responsive pUAST expression vector [18], and transgenic strains were generated  
82 by embryo injection by Bestgene Company (Chino Hills, CA, USA). Both NS3 helicase and full-length  
83 NS3 cDNA carried a 3XFlag Tag in 5' [16]. Standard crosses with flies carrying appropriate balancers  
84 were performed to establish stable heterozygous or homozygous transgenic lines. The following  
85 GAL4 driver lines were obtained from Bloomington stocks: the ubiquitous drivers Act-Gal4 [19], the  
86 engrailed domain-specific driver en-Gal4 [20] the immune specific driver (fat body and hemocytes)  
87 collagen type IV-specific enhancer-promoter Cg-Gal4 [21] and the c564-Gal4 driver which is mainly  
88 expressed in the fat body, the major site of antimicrobial peptide production [22,23]. Flies expressing  
89 the Gal4 factor were used as controls: Act-Gal4>+, en-Gal4>+, Cg-Gal4>+ and c564-Gal4>+. The wild  
90 type chromosome from the control heterozygotes was derived from the *w*<sup>1118</sup> strain.

91 **Western blot.** Third instar larvae were crushed in lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 7,4; 100mM NaCl;  
92 1% NP-40; 2mM DTT) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma). Larvae lysates were  
93 incubated on ice for 30 min, and then centrifuged at 14,000g for 20 min. Total protein concentrations  
94 were then determined using the Bradford protein assay (Biorad). 15 µg of protein extracts were  
95 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels with MOPS  
96 running buffer (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane. 3XFlag- tagged proteins  
97 were detected with a mouse monoclonal peroxidase-conjugated anti-FLAG M2 antibody (Sigma) and  
98 revealed with ECL detection reagent (GE Healthcare).

99

100 **Wing imaginal discs staining.** Wing imaginal discs were dissected and stained as previously described  
101 [24]. Briefly, wandering third instar larvae were dissected using inside-out technique directly in PBS.  
102 Tissues were fixed in 4% formaldehyde in PBS 20 min at room temperature with mild agitation. Then  
103 imaginal discs were washed three times in PBS-triton, incubated for 20 minutes at room temperature

104 in blocking solution (PBS-O,1% triton, 5% BSA, 2,5% NGS) and incubated overnight with anti-flag M2  
105 antibody coupled with cya3 (Sigma) diluted in blocking solution (dilution 1/600). Tissues were then  
106 washed three times in PBS-triton 0,1% and incubated with the phalloidin-FITC 10 µg/mL (Sigma) for  
107 30 minutes at room temperature. Finally and after three additional washing imaginal discs were  
108 mounted in a 50% glycerol-PBS solution.

109 **Picture acquisition.** All microscopic pictures have been taken using an upright confocal microscope  
110 (Axioplan2 LSM510 Zeiss) and a Plan Neofluar 40x/1.3 Oil Ph3 objective. All images were processed  
111 with Adobe Photoshop or ImageJ softwares.

112 **Life span.** Act-Gal4 and Cg-Gal4 X UAS-NS3 Fl or UAS-NS3 Hel crosses were performed, newly F1  
113 eclosed female flies were collected, allowed mating for 48 hours after emerging then sorted and  
114 aged at 25°C on standard medium. Act-Gal4 and Cg-Gal4 X  $w^{1118}$  crosses were performed to generate  
115 control flies. One hundred flies per genotype were aged in individual vials containing no more than  
116 20 flies each and assayed for longevity. Food was changed every 2 or 3 days, and the number of dead  
117 flies was recorded. Statistical analysis was done on Prism software using the log rank (Mantel-Cox)  
118 test.

119 **Cold stress and recovery.** All tests were performed using synchronized 4-day-old virgin males as  
120 previously described [25]. Briefly, groups of 20 males were placed in glass vials (without food), which  
121 were immersed in a 10% glycol solution cooled to 0 °C to induce chill coma. Flies were sampled after  
122 0.5, 3, 6 and 9h of cold stress. For each cold stress duration, 40 males of each genotype ( $w^{1118}$ ;Cg-  
123 Gal4/UAS-NS3 Hel,  $w^{1118}$ ;Cg-GAL4/UAS-NS3 Fl and  $w^{1118}$ ;Cg-Gal4/UAS-LacZ) were allowed to recover  
124 at 25 °C, and the recovery time was recorded. Flies were considered to have recovered when they  
125 stood up.

126 **Drosophila infection.** *E. coli* 1106, *E. cloacae*, and *K. pneumoniae* were used as Gram-negative  
127 bacterial strains. *S. aureus* and *M. luteus* were used as pathogenic and non-pathogenic Gram-positive  
128 strains respectively, known to activate the Toll pathway. All strains were grown as previously

129 described [26]. For septic infection, 30 to 50 adult male flies of 3-5 days old were pricked in the  
130 upper part of the thorax with a thin needle previously dipped into an overnight concentrated  
131 bacterial culture. Results are expressed as percentage of surviving infected flies at different time  
132 points following infection.

133 **Immunoprecipitation and Immunoblotting.** Twenty 2 to 3-day old males ( $w^{1118};Act-Gal4/UAS-NS3$   
134  $Hel$ ,  $w^{1118};Act-GAL4/UAS-NS3$  Fl and  $w^{1118};Act-Gal4/+$ ) were homogenized (with a Precellys device)  
135 and resuspended in lysis buffer (40mM Tris at pH7,4, 150mM NaCl, 0.6% Triton and 2 mM EDTA)  
136 supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche). 1 mg of protein extracts were  
137 incubated over-night at 4°C with 30  $\mu$ l of glutathione-sepharose beads (GE Healthcare) and anti-Flag  
138 M2 antibody (A8592, Sigma) to purify 3xFlag-tagged NS3 proteins. Beads were then washed 4 times  
139 in ice-cold lysis buffer and immuno-precipitated proteins were recovered in 50  $\mu$ l of laemmli loading  
140 buffer. Immuno-precipitated proteins and cell lysates (15  $\mu$ g of protein extracts) were separated by  
141 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose  
142 membrane. 3XFlag-NS3 and cactus proteins were detected with a mouse monoclonal peroxidase-  
143 conjugated anti-FLAG M2 antibody (A8592, Sigma) and a mouse monoclonal anti-cactus antibody  
144 (DSHB 3H12-c) and revealed with ECL detection reagent (pico West, Amersham).

145 **RNA extraction, reverse transcription and qPCR.** Total RNAs were extracted from adult flies using  
146 RNA<sup>plus</sup> kit from QBiogene (Illkirch, France). cDNAs were synthesized with affinityScript QPCR cDNA  
147 Synthesis Kit (Stratagene, Amsterdam). An amount of cDNA equivalent to 0.01  $\mu$ g of total RNA was  
148 subjected to 40 cycles of PCR amplification consisting of a 10 s incubation at 95°C and 30 s at 60°C.  
149 Output was monitored using SYBR Green core reagents and the MX3000P instrument (Stratagene).  
150 All the results were normalized to the *RpL32* RNA level. The primer sequences were designed using  
151 PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) and are available on  
152 request.

153

154 RESULTS

155 Characterization of *Drosophila* lines expressing the Dengue virus NS3 protein.

156 We generated transgenic flies carrying either a UAS-NS3 full length or a UAS-NS3 helicase domain  
157 expressing transgene. The two corresponding constructs are bearing a 3Xflag tag. Two independent  
158 transgenic lines were generated for each construct using the PhiC31 recombination strategy, which  
159 allows comparing the level of expression between transgenes inserted on the same insertion site. To  
160 characterize the transgenic lines, we first crossed the UAS-NS3 flies to flies carrying the engrailed-  
161 Gal4 (en-Gal4) driver. We observed the specific expression of NS3 in the engrailed domain in the  
162 posterior part of the wing imaginal disc for all transgenic lines (figure 1). We then performed a  
163 western blot analysis and could detect the NS3 tagged proteins at the expected size, 65 kDa and 80  
164 kDa for the NS3 helicase and the NS3 respectively (figure 1F). Our data indicate that NS3 full length  
165 or NS3 helicase expression in *Drosophila* wing tissue do not affect wing development.

166 NS3 expressing flies display normal phenotype, life span and resistance to thermal stress.

167 We then crossed the UAS-NS3 flies to flies carrying either the ubiquitous Actin-Gal4 driver or the  
168 immune specific Cg-Gal4 driver. In both cases, embryonic and larval developments gave rise to NS3  
169 flies that displayed a normal phenotype. The viral protein expression either as full length or as  
170 helicase functional domain did not affect the *Drosophila* life span (figure 2A).

171 We next examined the response capacity of NS3 flies to a non-infectious thermal stress. Briefly, four-  
172 day-old transgenic or control flies were kept at 0°C for 30 minutes, 3h, 6h or 9h, and we then  
173 measured the time before waking for each genotype. We did not observe any significant difference  
174 between the control flies ( $w^{1118};Cg-Gal4/UAS-LacZ$ ) and the NS3 expressing *Drosophila* ( $w^{1118};Cg-$   
175  $Gal4/UAS-NS3 Hel$  or  $w^{1118};Cg-Gal4/UAS-NS3 FL$ ) (figure 2B).

176 DENV NS3 helicase interacts with *Drosophila* IκBα homologous, Cactus.

177 We have previously shown that NS3 helicase domain of DENV NS3 interacts with human IκBα [16].  
178 We thus looked for *Drosophila* homologous Cactus protein ability to bind to NS3 by performing coIP

179 experiments. As shown in figure 3, the NS3 helicase domain was able to bind to Cactus while we  
180 could not detect any interaction with the NS3 full-length protein. Similarly, specific interaction with  
181 I $\kappa$ B was observed with NS3 Hel but not NS3 FL in mammalian cells [16].

182 NS3 expression interferes with the steady-state level of anti-microbial peptide encoding genes  
183 expression.

184 To investigate the functional consequences of DENV NS3 expression on the activation of the Toll  
185 pathway, transgenic NS3 or NS3 Helicase flies were crossed to flies carrying either the Cg-Gal4 driver  
186 or the c564-Gal4 driver, inducing transgene expression mainly in the fat body and to some extent in  
187 the hemocytes [21] [22]. Interestingly, we observed a significant decrease of the basal level of anti-  
188 microbial peptides *Attacin* and *Drosomycin* in flies expressing either the truncated or the full length  
189 NS3 protein under the control of Cg-Gal4 or c564-Gal4 drivers (figure 4).

190 In order to examine if NS3 interference with Toll-target gene expression would be sufficient to affect  
191 flies susceptibility to bacterial infection, flies expressing NS3 full length or truncated proteins under  
192 the control of the immune Cg-Gal4 driver were infected with several bacterial species by septic  
193 injury. Age and sex match control flies were infected in the same conditions. *Escherichia coli*, and  
194 *Enterobacter aerogenes* were used as Gram-negative bacterial strains; *Staphylococcus aureus* and  
195 *Micrococcus luteus* were used as Gram-positive strains. Both wild-type and NS3 expressing flies were  
196 insensitive to non-pathogenic bacteria *E. coli*, *E. aerogenes* and *M. luteus*. Indeed, we observed  
197 normal fly viability two weeks post-infection in both flies groups (data not shown). In contrast, we  
198 found that flies expressing either the full length or the helicase domain of NS3 were slightly more  
199 sensitive than control flies to infection with the highly pathogenic bacteria *S. aureus*, a Gram-  
200 negative bacteria known to activate the Toll pathway (Figure 5A, Log-rank Mantel-Cox test, Cg>+ vs  
201 cg>UAS-NS3 Hel<0,0009 and Cg>+ vs Cg>UAS-NS3 Fl<0,0001). We then quantified by qRT-PCR the  
202 level of anti-microbial peptides genes transcripts in response to *S. aureus* infection and observed a

203 slight inhibition of *Drosomycin* transcription 6 hours post-infection in the case of NS3 Hel expressing  
204 flies (figure 5B).

205 Given the weak observed phenotypes, we further examined the sensitivity to bacterial infection of  
206 NS3-expressing flies, with a second immune driver line c564-GAL4, which is highly expressed in the  
207 fat body. However, we were not able to observe any significant differences neither in survival rate  
208 nor in anti-microbial peptide gene expression between the NS3 and the control flies following  
209 infection with *S. aureus* in these flies (figure 6).

210

211

## 212 DISCUSSION

213 In the present work, we developed a *Drosophila* model in which the dengue virus NS3 protein is  
214 expressed in a tissue specific and inducible manner. We first characterized the NS3 transgenic flies  
215 showing that ubiquitous or immune-specific NS3 expression did not affect the life span or the  
216 response to a non-infectious stress of the flies. The interaction between NS3 and  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  observed in  
217 mammals' cells was similarly observed in *Drosophila* as the helicase domain of DENV NS3 interacts  
218 with Cactus, the *Drosophila* ortholog of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . On this basis, it would be interesting to test if this  
219 interaction is conserved in mosquito as well. Indeed Cactus plays a very important role in the control  
220 of viral load in *Aedes*. In this organism, *cactus* gene expression is modulated during viral infection,  
221 and its down regulation by RNAi induces a diminution of viral load [11]. In a recent study, DENV  
222 infection of primary dendritic cells induced a blockage of TLR induced NF- $\kappa$ B activation and a  
223 subsequent down regulation of cytokine production [27]. We could then hypothesize that NS3  
224 interaction with  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /Cactus might be part of a viral strategy to evade Toll dependent immune  
225 response, like it has been recently demonstrated for polydnavirus, which are carried by parasitoid  
226 wasps [28]. Even if this phenomenon would occur during DENV infection a robust innate immune  
227 response including activation of the Toll pathway, the JAK-STAT pathway, and the RNAi-mediated  
228 antiviral defenses is induced in *Aedes* [29]. Whether these defense mechanisms might be then less  
229 efficient to constrain a novel infection is not known.

230

231 As observed in mammals, we were not able to reveal by co-immunoprecipitation the interaction  
232 between NS3 FI and Cactus suggesting that the polymerase domain might negatively modulate the  
233 interaction between NS3 and Cactus, putatively by inducing conformational changes [16]. Despite  
234 this differential interaction capacity, both NS3 helicase and NS3 full-length negatively regulate the  
235 basal level of anti-microbial peptide genes expression in flies. Therefore, the effect of NS3 FI and NS3  
236 Hel on steady-state level of antimicrobial peptide gene expression may be independent from their  
237 interaction with Cactus. Our previous results indicated that other immune proteins, such as TRAF4,

238 I $\kappa$ B $\alpha$  and AZI2 interact with the NS3 helicase domain of DENV in human cells [16]. In *Drosophila*,  
239 TRAF4 is the ortholog of TRAFd1 which has been shown to regulate Dif/NF- $\kappa$ B activity when  
240 associated to Pelle [30] although the regulation of the transcription of antimicrobial peptide genes  
241 *Diptericin* and *Drosomycin* was assigned to dTRAF2 rather than dTRAF1 [31]. Thus, a putative  
242 interaction between NS3 and dTRAF2 or dTRAF1 should be further explored to understand NS3  
243 activity on the transcription of Toll-dependent target genes.

244

245 As mentioned above, we showed that expressing the DENV protein NS3 in *Drosophila* using immune  
246 specific drivers resulted in a lower basal level of anti-microbial peptide genes expression. However,  
247 we did not observe an increased susceptibility of transgenic flies to bacterial infection with the c564  
248 driver line, while in the case of Cg-Gal4 driver line, flies susceptibility to infection was only slightly  
249 decreased. Similarly, antimicrobial peptide genes induction was not modified in flies expressing the  
250 NS3 Fl or truncated protein under the control of the c564 driver line while only weakly inhibited in  
251 flies expressing NS3 Hel constructs under the control of the Cg-Gal4 driver at 6 hours post-infection.  
252 This apparent discrepancy between the two driver lines may be due to difference in transgene  
253 expression in either the fat body and/or the hemocytes in adult flies. Altogether, these results  
254 indicate that NS3 expression does not significantly inhibit Toll pathway activation in response to  
255 bacterial infection. Additional experiments in the context of a viral infection would be of great value  
256 to further decipher the importance of NS3-Cactus interaction.

257

258 Overall, we generated a *Drosophila* model in which the dengue virus NS3 protein is  
259 expressed *in vivo*. This model will be a valuable tool to assess mechanisms related to the interactions  
260 between NS3 and evolutionary conserved host proteins of the innate immune system.

261

262

263 ACKNOWLEDGMENTS

264 We thank Marc Le Breton for his help with the generation of the NS3 flies. We thank Frederick  
265 Arnaud and Marie Sémon for helpful discussions about our project. We thank the PLATIM and  
266 Arthro-Tools facilities of the UMS3444 Biosciences, Lyon, France for help with confocal microscopy  
267 and fly food preparation respectively. The Bloomington Drosophila Stock Center contributed to this  
268 work by providing fly strains.

269 .

270 REFERENCES

- 271 1. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and  
272 resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98–109.  
273 doi:10.1038/nm1144.
- 274 2. Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R (2014) Revisiting Dengue Virus–Host Cell  
275 Interaction. *Advances in Virus Research*. Elsevier, Vol. 88. pp. 1–109. Available:  
276 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000984000015>. Accessed 12 May 2014.
- 277 3. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, et al. (2011)  
278 Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*  
279 476: 454–457. doi:10.1038/nature10356.
- 280 4. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z (2010) The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces  
281 Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 6: e1000833.  
282 doi:10.1371/journal.ppat.1000833.
- 283 5. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, et al. (2012) Reciprocal  
284 Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and  
285 Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1561.  
286 doi:10.1371/journal.pntd.0001561.
- 287 6. Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, et al. (2009) Discovery  
288 of insect and human dengue virus host factors. *Nature* 458: 1047–1050. doi:10.1038/nature07967.
- 289 7. Rancès E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O’Neill SL (2012) The Relative Importance of  
290 Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. *PLoS Pathog* 8: e1002548.  
291 doi:10.1371/journal.ppat.1002548.
- 292 8. Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, et al. (2007) Evolutionary  
293 dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 316: 1738–  
294 1743. doi:10.1126/science.1139862.
- 295 9. Ramirez JL, Dimopoulos G (2010) The Toll immune signaling pathway control conserved  
296 anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes.  
297 *Dev Comp Immunol* 34: 625–629. doi:10.1016/j.dci.2010.01.006.
- 298 10. Sim S, Dimopoulos G (2010) Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti*  
299 Cells. *PLoS ONE* 5: e10678. doi:10.1371/journal.pone.0010678.
- 300 11. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G (2008) The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue  
301 virus infection. *PLoS Pathog* 4: e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098.
- 302 12. Rances E, Johnson TK, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Zakir T, et al. (2013) The Toll and Imd  
303 Pathways Are Not Required for *Wolbachia*-Mediated Dengue Virus Interference. *J Virol* 87: 11945–  
304 11949. doi:10.1128/JVI.01522-13.
- 305 13. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral  
306 regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila*  
307 adults. *Cell* 86: 973–983.

- 308 14. Manfrulli P, Reichhart JM, Steward R, Hoffmann JA, Lemaitre B (1999) A mosaic analysis  
309 in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal  
310 and DIF. *EMBO J* 18: 3380–3391. doi:10.1093/emboj/18.12.3380.
- 311 15. Hultmark D (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15: 12–19.
- 312 16. Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, et al. (2011) Flavivirus  
313 NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC*  
314 *Microbiol* 11: 234. doi:10.1186/1471-2180-11-234.
- 315 17. Wang C-C, Huang Z-S, Chiang P-L, Chen C-T, Wu H-N (2009) Analysis of the nucleoside  
316 triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus  
317 NS3 protein. *FEBS Lett* 583: 691–696. doi:10.1016/j.febslet.2009.01.008.
- 318 18. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and  
319 generating dominant phenotypes. *Dev Camb Engl* 118: 401–415.
- 320 19. Struhl G, Basler K (1993) Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72: 527–  
321 540.
- 322 20. Couso JP, Bate M, Martinez Arias A (1993) A wingless-dependent polar coordinate system in  
323 *Drosophila* imaginal discs. *Science* 259: 484–489.
- 324 21. Asha H, Nagy I, Kovacs G, Stetson D, Ando I, et al. (2003) Analysis of Ras-induced  
325 overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163: 203–215.
- 326 22. Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N (1995) Activation of a  
327 *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J*  
328 14: 2857–2865.
- 329 23. Kambris Z, Brun S, Jang I-H, Nam H-J, Romeo Y, et al. (2006) *Drosophila* Immunity: A  
330 Large-Scale In Vivo RNAi Screen Identifies Five Serine Proteases Required for Toll Activation. *Curr*  
331 *Biol* 16: 808–813. doi:10.1016/j.cub.2006.03.020.
- 332 24. Dichtel-Danjoy M-L, Ma D, Dourlen P, Chatelain G, Napoletano F, et al. (2013) *Drosophila*  
333 p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death Differ*  
334 20: 108–116. doi:10.1038/cdd.2012.100.
- 335 25. Colinet H, Lee SF, Hoffmann A (2010) Temporal expression of heat shock genes during cold  
336 stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*: Heat shock response to cold  
337 stress. *FEBS J* 277: 174–185. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07470.x.
- 338 26. Fauvarque M-O, Bergeret E, Chabert J, Dacheux D, Satre M, et al. (2002) Role and activation  
339 of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb*  
340 *Pathog* 32: 287–295.
- 341 27. Chang T-H, Chen S-R, Yu C-Y, Lin Y-S, Chen Y-S, et al. (2012) Dengue virus serotype 2  
342 blocks extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- $\kappa$ B activation to downregulate cytokine  
343 production. *PloS One* 7: e41635. doi:10.1371/journal.pone.0041635.
- 344 28. Bitra K, Suderman RJ, Strand MR (2012) Polydnavirus Ank proteins bind NF- $\kappa$ B homodimers  
345 and inhibit processing of Relish. *PLoS Pathog* 8: e1002722. doi:10.1371/journal.ppat.1002722.

346 29. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G (2009) An evolutionary conserved function of the JAK-  
347 STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17841–17846.  
348 doi:10.1073/pnas.0905006106.

349 30. Zapata JM, Matsuzawa S, Godzik A, Leo E, Wasserman SA, et al. (2000) The *Drosophila*  
350 tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates  
351 NFkappaB activity. *J Biol Chem* 275: 12102–12107.

352 31. Cha G-H, Cho KS, Lee JH, Kim M, Kim E, et al. (2003) Discrete functions of TRAF1 and  
353 TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent  
354 signaling pathways. *Mol Cell Biol* 23: 7982–7991.

355

356

357 FIGURE LEGENDS

358 **Figure 1. Expression of NS3 helicase in developing wing imaginal discs.** Males carrying UAS-NS3  
359 helicase or UAS-NS3 full-length expressing transgenes were mated with engrailed-GAL4 (en-GAL4)  
360 females. Lines 1 and 2 and lines 1' and 2' represent UAS-NS3 Hel and UAS-NS3 Fl expressing  
361 transgenes inserted on chromosome II and III respectively. **A-** en>UAS-GFP line was used as a control  
362 for the engrailed expression pattern. **B-E-** Late third instar wing imaginal disks were dissected and  
363 stained with phalloidin (in green) and with an antibody against the 3x flag tagged viral proteins (red).  
364 Bottom panel (**A'-E'**) represents NS3 protein specific staining. Scale bars are 50  $\mu$ m. **F-** Third instar  
365 larvae protein extracts were analyzed by western-blot. 3x flag tagged viral proteins were detected at  
366 58 kDa and 80 kDa for NS3-Helicase and NS3 full-length respectively. Tubulin detection was used as  
367 loading control.

368

369 **Figure 2. NS3 transgenic flies display normal life span and resistance to cold stress.** **A and B-**UAS-  
370 NS3 and *w<sup>1118</sup>* (control) flies were mated to flies carrying either the immune specific Cg-Gal4 (**A**) or  
371 the ubiquitous Act-Gal4 (**B**) driver. One hundred F1 females per genotype were aged and assayed for  
372 longevity. Statistical analysis did not reveal any significant difference between NS3 expressing and  
373 control flies. **C-** For cold stress experiment, forty four-day-old male flies per genotype were kept at  
374 0°C for 30 minutes, 3h, 6h or 9h. The time before waking was then assessed for each fly group, Cg-  
375 Gal4>UAS-LacZ and the NS3 expressing *Drosophila*, Cg-Gal4>UAS-NS3 Hel and Cg-Gal4>UAS-NS3 Fl.  
376 For cold stress results, one representative experiment out of three biological independent  
377 experiments is presented.

378

379 **Figure 3. DENV NS3 helicase interacts with Cactus.** Protein extracts were prepared from flies over-  
380 expressing NS3 full-length (Act>UAS-NS3 Fl) or NS3 Helicase (Act>UAS-NS3 Hel). NS3 was immuno-  
381 precipitated from fly extracts with antibodies directed against 3xFlag and analyzed with anti-Cactus.  
382 Anti-Cactus antibodies revealed a unique band at the expected size (55 kDa) showing that Cactus and

383 NS3-helicase form a complex in vivo. Fly extracts were revealed with anti-NS3 to show presence of  
384 corresponding proteins (NS3 Fl at 85 kDa and NS3 Hel at 58 kDa) in the fly extracts. No interaction  
385 could be observed between NS3 Fl and Cactus.

386

387 **Figure 4. NS3 expressing flies show decreased expression of antimicrobial peptide genes.**

388 Analysis of *Drosomyacin* (A and B) and *Attacin* (C) mRNAs by quantitative RT-PCR on three- to five-  
389 days-old males flies expressing NS3 Fl or NS3 Hel under the control of Cg-Gal4 (A) or c654-Gal4 (B  
390 and C) and on control flies (Cg>+ and c564>+). Results are expressed as the fold induction level  
391 compared to control flies.

392

393 **Figure 5. Response of flies expressing NS3 constructs under the Cg-Gal4 driver to *Staphylococcus***  
394 ***aureus* infection.**

395 Sixty three- to five-day-old males flies expressing NS3 Fl or NS3 Hel under the control of Cg-Gal4  
396 driver (Cg>NS3 Fl or Cg>NS3 Hel) and control flies (Cg>+) were infected with Gram-positive bacteria,  
397 *Staphylococcus aureus* by septic injury. A- Survival rates of infected *Drosophila* flies were followed at  
398 25°C for indicated times post-infection. One representative experiment out of three biological  
399 independent experiments is presented. B- Analysis of *Drosomyacin* mRNAs by semi-quantitative RT-  
400 PCR. *Drosomyacin* expression was analyzed in flies expressing NS3 and in control flies at 0 and 6 hours  
401 following infection. Results are expressed as the fold induction level compared to control Cg/+ flies.  
402 Log-rank (Mantel-Cox) test, Cg>+ vs Cg>UAS-NS3 Hel <0,0009 and Cg>+ vs Cg>UAS-NS3 Fl <0,0001.

403

404 **Figure 6. Response of flies expressing NS3 constructs under the c564-Gal4 driver to *Staphylococcus***  
405 ***aureus* infection.**

406 Fifty three- to five-day-old males flies expressing NS3 Fl or NS3 Hel under the control of c564-Gal4  
407 driver and control flies (c564>+) were infected with Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* by  
408 septic injury. A- Survival rates of infected *Drosophila* flies were followed at 25°C for indicated times

409 post-infection. B- Analysis of *Drosomycin* mRNAs by quantitative RT-PCR. *Drosomycin* expression was  
410 analyzed in flies expressing NS3 (c564>UAS-NS3 Fl and c564>UAS-NS3 Hel) and in control flies  
411 (c564>+) at 0, 6 and 14 hours following infection. Results are expressed as the fold induction level  
412 compared to c564/+ flies.

413

414

415

416

417

418

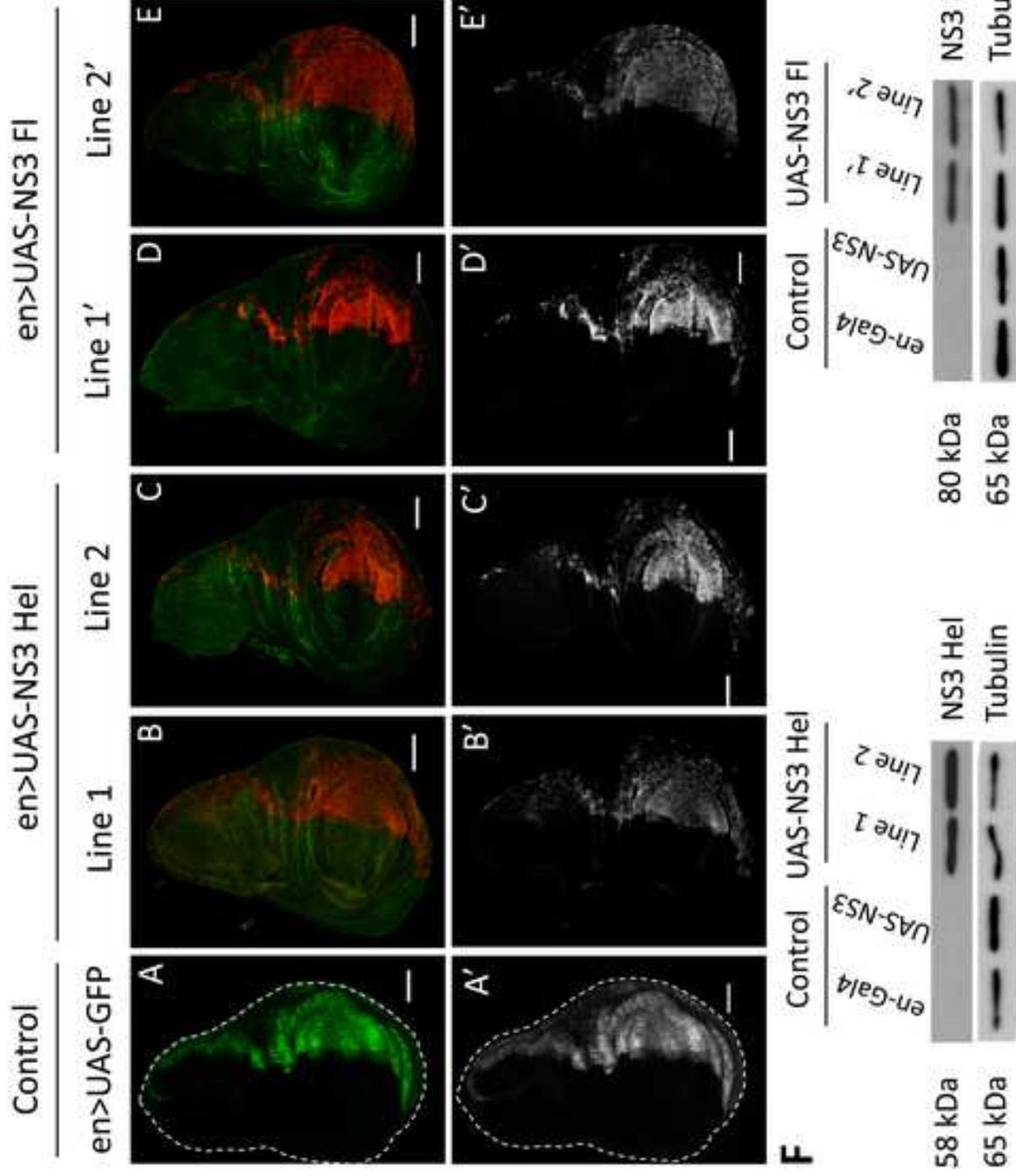


Figure 1, Querenet et al.

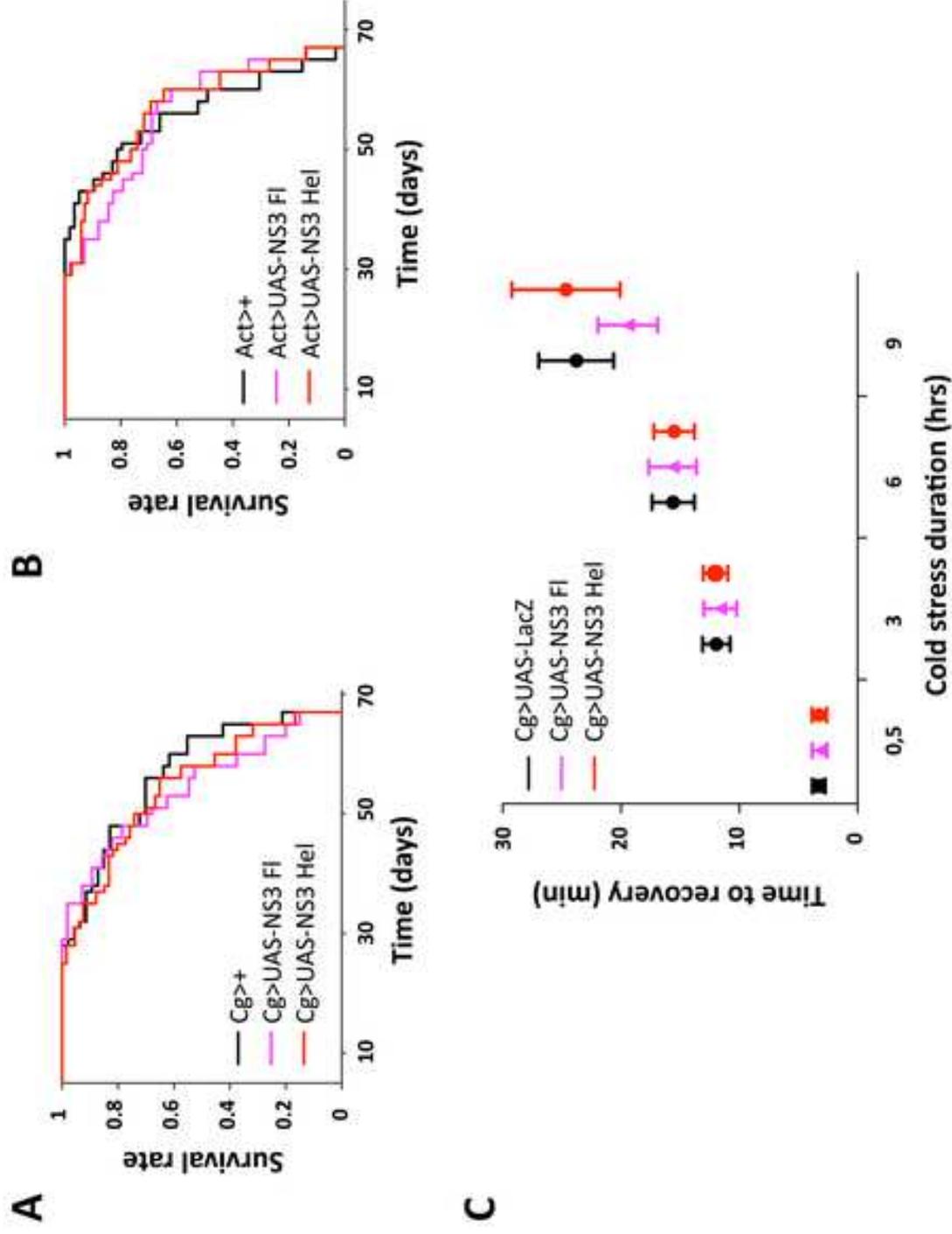


Figure 2, Querenet et al.

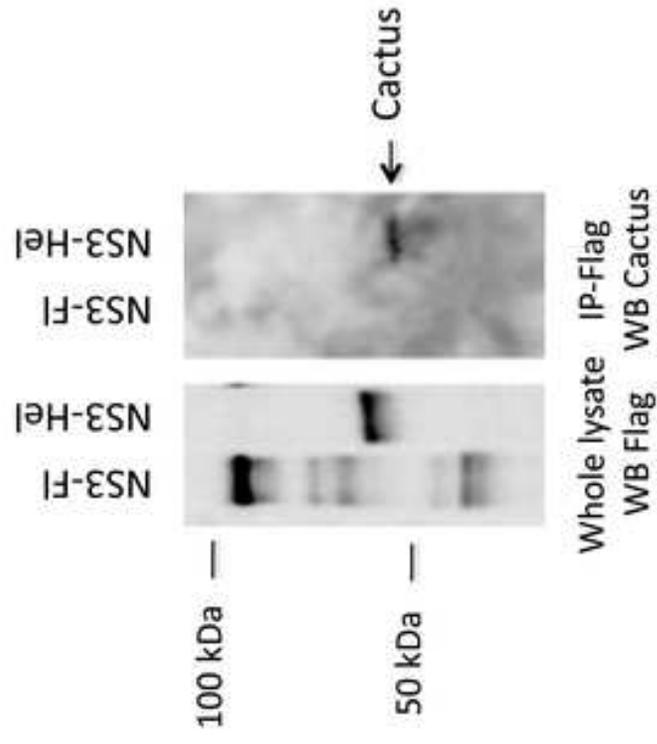


Figure 3, Querenet et al.

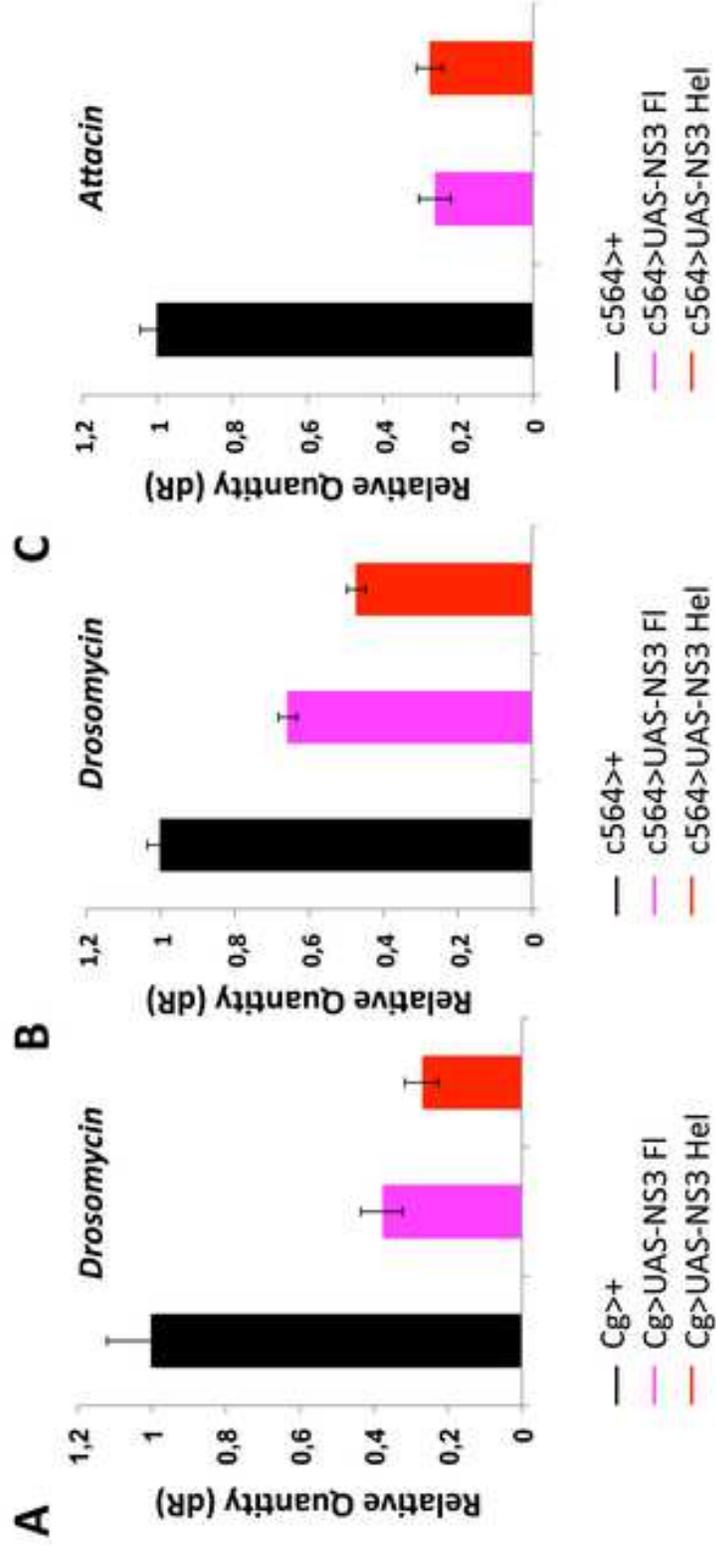
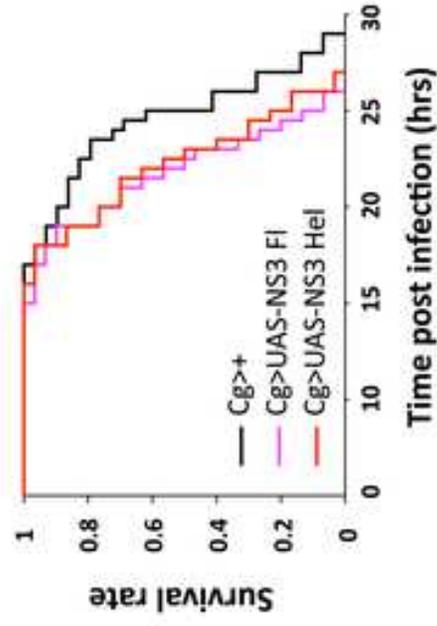


Figure 4, Querenet et al.

**A**



**B**

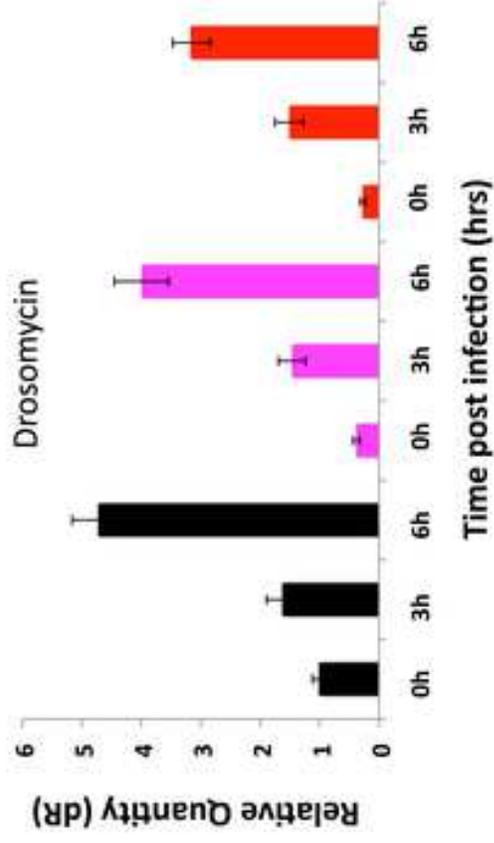
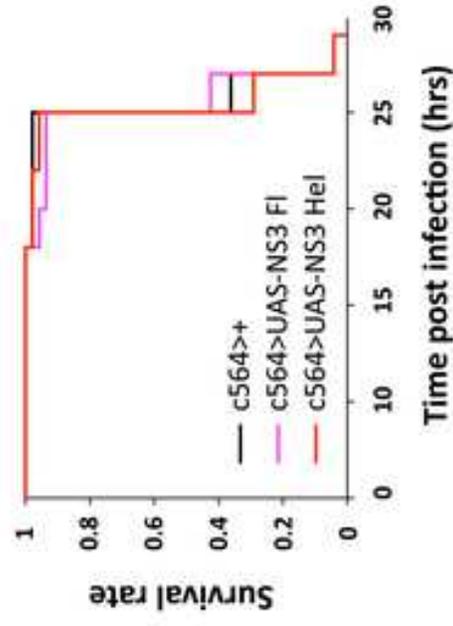


Figure 5, Querenet et al.

**A**



**B**

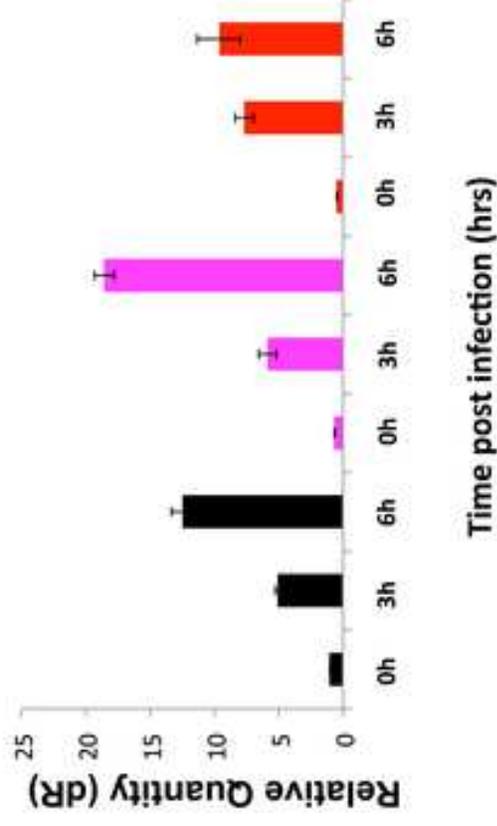


Figure 5, Querenet et al.

## **Spn is required for pigment cell survival during *Drosophila* pupal development**

Matthieu Querenet<sup>1</sup>, Gilles Chatelain<sup>1</sup>, Nathalie Davoust<sup>1,2,\*</sup> and Bertrand Mollereau<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239 CNRS/Ecole Normale Supérieure de Lyon, IFR 128 Biosciences Lyon Gerland, Université de Lyon, Lyon, France

\*These authors contributed equally to this work

<sup>2</sup> Corresponding Authors:

Pr. Bertrand Mollereau, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, FRANCE. Phone: (33) 4 72 72 81 63. Fax: (33) 4 72 72 86 74. [bertrand.mollereau@ens-lyon.fr](mailto:bertrand.mollereau@ens-lyon.fr)

**And**

Dr. Nathalie Davoust, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, FRANCE, phone: (33) 4 72 72 87 90 Fax: (33) 4 72 72 86 74, [nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr](mailto:nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr)

## **Abstract**

Apoptosis is required during development to eliminate superfluous cells and to sculpt emerging tissues; as such, the process is subject to precise spatial and temporal control. The repeating hexagonal units, or ommatidia, that make up the honeycomb-like structure of the adult *Drosophila* eye are formed during the late larval and early pupal stage of development. Precise lattice formation is critically dependent on spatially restricted apoptosis that removes supernumerary pigment or interommatidial cells (IOCs) by a process dependent on cell-cell communication and activation of pro- and anti-apoptotic pathways. However, the mechanisms controlling apoptosis of superfluous IOC at a precise point in pupal development remain unclear. Here, we found that the transcriptional regulator *split ends* (*spen*) plays an essential role in this process and is required to prevent IOC apoptosis during the wave of superfluous IOC elimination occurring at the pupal stage. Loss of *spen* function further increases apoptotic death of IOCs, resulting in disordered ommatidia and a rough eye phenotype. Furthermore, the requirement for *spen* in restricting IOC death is cell nonautonomous and depends on *spen* expression in cone cells, but not in pigment cells or IOCs themselves. We propose that *spen* is an important survival factor that ensures spatially and temporally restricted apoptosis of IOCs during developmental patterning of the *Drosophila* eye.

## **Introduction**

Apoptosis, or programmed cell death, is essential for the development and survival of most multicellular organisms (Bergmann and Steller, 2010; Nagata and Golstein, 1995). During development, one function of apoptosis is to sculpt complex tissues through the removal of superfluous cells (Mollereau, 2009). In the developing *Drosophila* eye, apoptosis is required to remove ~2000 excess retinal pigment cells, thereby ensuring the formation of a perfectly organized honeycomb-like structure (Cagan and Ready, 1989; Wolff and Ready, 1991). The *Drosophila* eye is composed of ~800 units known as ommatidia, each of which contains 8 photoreceptor cells, 4 cone cells, and 2 primary pigment cells and is surrounded by a hexagon of 12 lattice or interommatidial cells (IOCs) composed of 3 bristle cells, 6 secondary pigment cells, and 3 tertiary pigment cells (Cagan and Ready, 1989). Retinal cell differentiation begins at the third instar larval stage with the sequential recruitment and differentiation of the 8 photoreceptor cells followed by differentiation of the cone cells (Mollereau and Domingos, 2005). At the early pupal stages, the primary pigment cells differentiate and form a concentric ring around the cone cells, which are situated on top of the photoreceptor cell cluster (Carthew, 2007). As the primary pigment cell ring closes, the IOCs are rearranged around the ommatidium to form a hexagonal array. At this point, each cluster of IOCs contains two or three excess cells that must be removed to allow precise lattice formation (Cagan and Ready, 1989; Reiter et al., 1996; Wolff and Ready, 1991). Most of these superfluous cells are eliminated during a wave of apoptosis that takes place at ~28 h after puparium formation (APF) (Cordero et al., 2004; Miller and Cagan, 1998), and the remaining IOCs differentiate into secondary and tertiary pigment cells. Apoptotic death of excess IOCs is strictly dependent on the proapoptotic protein Hid, the initiator caspase Dronc, and the Dronc adaptor Dark and involves cyt-c-d (Mendes et al., 2006; Yu et al., 2002). Previous studies have shown that cell-cell communication plays a major role in controlling the spatially restricted elimination of IOCs, ensuring that each mature ommatidium contains the correct number of IOCs. Cone cells and/or primary pigment cells have been shown to act cell nonautonomously to promote the survival of IOCs by modulating Notch and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling (Miller and Cagan, 1998; Monserrate and Brachmann, 2007). Thus, death of IOCs via Notch- and Hid-induced apoptosis is balanced by EGFR/RAS/MAPK signaling which antagonizes Notch signals (Miller and Cagan, 1998; Yu et al., 2002). Nevertheless, there is no evidence that EGFR/RAS/MAPK and Notch pathway signaling is differentially activated at the time of IOC death (Monserrate and Brachmann, 2007), suggesting that alternative and/or additional factors regulate life and death signaling for IOC elimination.

The *split ends (spen)* gene encodes several isoforms of the transcriptional regulator Spen, each of which contains three RNA recognition motifs (RRMs) and a Spen paralog and ortholog C-terminal (SPOC) domain (Chen and Rebay, 2000; Kuang et al., 2000; Rebay et al., 2000; Wiellette et al., 1999). Spen is a nuclear protein with pleiotropic functions and has been implicated in numerous cellular processes, including glial development, neuronal cell fate and axon guidance (Chen and Rebay, 2000; Kuang et al., 2000), cell cycle regulation (Lane et al., 2000), epithelial cell polarity (Mace and Tugores, 2004), and repression of head identity during embryogenesis (Wiellette et al., 1999). These functions are thought to be mediated by the transcriptional regulation of Notch, EGFR/RAS/MAPK, and Wingless signaling pathways, among others. In the developing *Drosophila* eye, Spen is both a negative regulator of Notch signaling and a positive regulator of EGFR/RAS/MAPK signaling, fine-tuning these pathways at the morphogenetic furrow to ensure proper recruitment and differentiation of photoreceptor cells (Doroquez et al., 2007).

In this study, we examined the role of *spen* in IOC elimination at the pupal stage of retinal development. We found that *spen* is essential to IOC survival and that loss of *spen* function at the time of superfluous cell removal further increases IOC elimination. IOC loss is rescued by expression of the effector caspase inhibitor p35, indicating that IOC death occurs via apoptosis. Finally, analysis of mosaic ommatidia in *spen* mutants revealed that the survival of IOCs is critically dependent on *spen* expression in cone cells, but not in IOCs or primary pigment cells. We propose that *spen* induces cone cells to secrete a survival factor that controls the elimination of IOCs, allowing the precise organization of the hexagonal array.

## Materials and Methods

### *Drosophila genetics*

Fly crosses and developmental staging were performed at 25°C unless otherwise noted. The following fly stocks were obtained from the Bloomington Stock Center: GMR-GAL4, FRT40A w<sup>+</sup>; UAS-GFP, UAS-nlsGFP, UAS-*white*<sup>RNAi</sup> and FRT40A *spen*<sup>5</sup>/*Cyo* (BL#8734). The Ubi-GAL80<sup>ts</sup> line and the method for its use have been described (Napoletano et al., 2011). The lz-GAL4 line was a gift from Graeme Mardon (Flores et al., 2000). For RNA interference experiments, the GAL4-carrying lines were crossed with a UAS-*spen*<sup>RNAi</sup> line (VDRC #48846). A second UAS-*spen*<sup>RNAi</sup> line (gift from Kenneth Cadigan (Chang et al., 2008)) was used to confirm our findings and gave the same results. The *spen*<sup>5</sup> mutant has been described (Kuang et al., 2000). Whole-eye mutant clones were generated using the *yw* ; *FRT40A GMR-hid CL; EGUF* line (Stowers and Schwarz, 1999). Mitotic clones were generated with T155-FLP (Bloomington #5074), or ey-FLP (gift from Graeme Mardon).

### *Fluorescence imaging of interommatidial cells*

CO<sub>2</sub>-anesthetized adult flies were placed in a 35 mm cell culture dish half-filled with 1% agarose and covered with water at 4°C, as described (Dourlen et al., 2013; Pichaud and Desplan, 2001). Retinas were observed using an upright confocal fluorescence microscope (LSM700; Zeiss) equipped with a 40× water immersion lens. Water on top of the retina was used to neutralize the cornea. Pigment autofluorescence was observed at an excitation wavelength of 554 nm.

### *Transmission electron microscopy*

Transmission electron microscopy was performed as previously described (Dourlen et al., 2012). Briefly, eyes were dissected and fixed overnight at 4°C in 0.1 M PIPES buffer (pH 7.4) containing 1.5% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde. Eyes were washed with 0.1 M PIPES buffer (pH 7.4) post-fixed in same buffer containing 1% OsO<sub>4</sub> at room temperature, and then dehydrated. Eyes were then infiltrated with increasing concentrations of epoxy resin (EMbed 812, EMS) in propylene oxide, and samples were mounted in pure resin into silicone embedding molds. Polymerization was performed at 60°C for 2 days. Ultrathin sections of 60 nm width were stained with lead citrate and examined with a Philips CM120 transmission electron microscope operating at 80 kV.

### *Generation of anti-Spen polyclonal antibodies*

Rabbit polyclonal antibodies were produced (SpeedRabbit Eurogentec) against two Spen peptides corresponding to amino acids 238–252 (PEKSI<sub>S</sub>NNSPTPRET) and 259–273 (NVESQP<sub>K</sub>LSNESTPQ). Peptide-specific antibody titers were determined by ELISA, and IgG antibodies were purified by affinity chromatography.

### *Immunostaining*

Staged pupal retinas were dissected in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, and then immunostained overnight at 4°C in PBT (PBS + 0.1% Triton-X100) containing the following antibodies and dilutions: rabbit anti-Spen (1:1000), mouse anti-Arm (1:500, DSHB), rabbit anti- $\beta$ -galactosidase (1:500, MP Cappel), and rabbit anti-Dcp-1 (Asp216) (1:500, Cell Signaling Technology). Samples were washed and then stained with the appropriate secondary antibody (all Invitrogen): anti-rabbit Alexa Fluor 405 or 488 at 1:500, anti-rat Alexa Fluor 633 at 1:500, and anti-mouse Alexa Fluor 546 or 405 at 1:500. Samples were mounted in DAPI-containing mounting medium (Vectashield, AbCys), and fluorescence images were acquired using Zeiss 710 and 780 confocal microscopes. Apoptotic activity was quantified by counting the number of Dcp-1-positive foci using ImageJ software.

### *Enumeration of interommatidial cells*

IOCs were enumerated (a) in pupal eye discs at day 42 APF by immunostaining with anti-Arm antibody or (b) in adult eyes by visualization with the cornea-neutralization method. At day 42 APF, control retinas contained 12 IOCs per ommatidium, consisting of 6 secondary pigment cells, 3 tertiary pigment cells, and 3 bristle cells. In the adult retinas, bristle cells were not distinguishable and only 9 IOCs per ommatidium (6 secondary and 3 tertiary pigment cells) were visible by pigment autofluorescence. At least 10 retinas per genotype were counted.

### *Scanning electron microscopy*

Three-day-old flies were collected, the probosces removed, and the heads placed in a solution of dish detergent (IJN, #507482, Groupe Prop) diluted 1:500 in 0.1 M cacodylate buffer for 30 sec to reduce hydrophobicity. Heads were then fixed in 0.1 M cacodylate buffer containing

2% glutaraldehyde for 2 days at 4°C. Heads were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, desiccated using the critical point drying method, and metallized using a Baltec MED-020 sputter coater. Heads were observed with a Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI) and images were processed using Adobe Photoshop software.

### *Statistical analysis*

All data analyses were performed using Prism software (GraphPad).

## Results

To investigate the potential role of *spen* in IOC cell death, we examined the retinas of flies in which *spen*-specific dsRNA was expressed under the control of either GMR-GAL4 or lozenge-GAL4 (lz-GAL4) (**Fig. 1, Fig S1**). The GMR driver is expressed in all differentiating retinal cells during the third instar and pupal stages of development, whereas lz expression is more restricted; we and others have shown that lz is expressed in and controls the differentiation of cone cells and R1, R6, and R7 photoreceptor cells, and is expressed in and controls the elimination of IOCs (**Fig. S2**, Daga et al., 1996; Wildonger et al., 2005). The retinas of GMR>*spen*<sup>RNAi</sup> adult flies contained ommatidia with fewer PRs than control (GMR>GFP) flies (**Fig. S1a, b, d, e**). This phenomenon has previously been observed in *spen* mutant flies and can be attributed to the role of *spen* in photoreceptor cell differentiation. (Doroquez et al., 2007). We also observed that the number of IOCs was lower in the retinas of GMR>*spen*<sup>RNAi</sup> adult flies than in control flies, suggesting that *spen* may play a role in the survival of IOCs during pupal development (**Fig. 1e, f, l, and Fig. S1d, e**). Consistent with this, ectopic overexpression of *spen* with the lz-GAL4 driver increased the frequency of IOCs (**Fig. 1i, k, m**). Ectopic expression of *spen* using the GMR driver resulted in disorganization of the ommatidia and a rough eye phenotype (**Fig. 1c, g**). This is most likely caused by the strong expression of *spen* and disruption of photoreceptor cell differentiation during the third larval instar. Importantly, *spen*<sup>RNAi</sup> reversed the effects of *spen* overexpression on IOC organization and rescued the rough eye phenotype (**Fig. 1c, d, g, h, l**), confirming the specificity of *spen* RNAi in this line. To confirm that *spen* is required for IOC survival, we counted IOCs in whole-eye mutant clones from a *spen* null allele (*spen*<sup>5</sup>) (Kuang et al., 2000). Here too, we observed that the absence of functional *spen* reduced the loss of IOCs (**Fig. 1n-p**).

To determine whether IOC loss in *spen*-deficient retinas occurs via apoptosis, we examined flies expressing p35, an pan-inhibitor of effector caspase. We found that coexpression of p35 rescued the loss of IOCs induced by *spen* silencing (**Fig. 2a, c, d, e**), suggesting that *spen* is required to prevent apoptotic death of IOCs. In agreement with this, immunostaining for the active (cleaved) form of the caspase Dcp-1 revealed an increase in Dcp-1-positive *spen*<sup>5</sup> mutant clones at 28–30 h APF (**Fig. 2f-h**). Interestingly, retinas from GMR>p35;*spen*<sup>RNAi</sup> flies contained more IOCs per ommatidium (~5) than flies expressing p35 alone (**Fig. 2b, d, e**). This rescue was comparable to the full inhibition of IOC death observed in *dark* and

*dronc* mutant clones (Mendes et al., 2006). These results suggest that *spen* not only plays an important pro-survival role in IOCs but may also regulate the rearrangement of IOCs for their proper positioning and elimination.

Because the GMR-GAL4 driver induces *spen*<sup>RNAi</sup> throughout development, we next asked whether the survival of IOCs depended on *spen* function during the period of IOC elimination at the pupal stage, or earlier during the third instar larval stage. For this, we conditionally silenced *spen* during the pupal stage by using the temperature sensitive GAL4/GAL80<sup>ts</sup> system (GMR-GAL4/ubi-GAL80<sup>ts</sup>;UAS-*spen*<sup>RNAi</sup>). We found that induction of *spen*<sup>RNAi</sup> starting at 5 h APF was sufficient to enhance the loss of IOCs compared to control flies (**Fig. 3**). Thus the survival of IOCs requires *spen* function during pupal development rather than during retinal cell differentiation at the larval stage.

Previous work has suggested that elimination of superfluous IOCs during pupation is controlled by cell nonautonomous signals originating from neighboring cone cells and primary pigment cells (Miller and Cagan, 1998 ; Monserrate and Brachmann, 2007). To determine the pattern of *spen* expression during pupal development, we used the enhancer trap PZspen<sup>03350</sup>. We found that PZspen<sup>03350</sup> is expressed in primary pigment cells, cone cells, and IOCs at the time of IOC death during pupation (**Fig. S3a-c**). In addition, we used anti-Spen immunostaining to confirm this expression pattern; these experiments further revealed that Spen is present in both the nucleus and cytoplasm of pupal retinal cells (**Fig. S3d-f**). To determine the contribution of primary pigment cells, cone cells, and IOCs to *spen*-dependent survival of IOC, we analyzed *spen* mosaic ommatidia at the border of *spen*<sup>5</sup> mutant clones, as previously described for *spalt* mutants (Domingos et al., 2004b). In such mosaic ommatidia, the proportion of wild-type and mutant lattice cells is random, allowing the contribution of each cell type to IOC death to be determined by analyzing a large number of mosaic ommatidia and scoring for IOC loss. We observed that the total number of IOCs in mosaic ommatidia was approximately the same on the control and *spen* mutant sides, indicating that *spen* does not act cell autonomously to maintain IOC survival (**Fig. 4c**). We confirmed these observations using the 54C-GAL4 driver, which, during the time of IOC death, is specifically expressed in secondary and tertiary pigment cells. Indeed, 54C-GAL4-driven *white*<sup>RNAi</sup> potently suppressed eye pigmentation (**Fig. S4a-f**). Flies expressing 54C>*spen*<sup>RNAi</sup> did not exhibit additional loss of IOC compared with control flies, in agreement with the analysis of *spen*<sup>5</sup> mosaic ommatidia (**Fig. S4-g-i, k**). These data confirm that *spen* does not function cell

autonomously to promote the survival of IOCs. *Interestingly*, IOC-specific expression of *spen* increased the number of IOCs to the same extent as expression of Notch RNAi, suggesting that *spen* could act as a negative regulator of Notch signaling (**Fig. S4i-k**). In addition, we found no evidence that *spen* expression in primary pigment cells or bristle cells contributed to IOC survival (**Fig. 4d, e**). In contrast, IOC numbers were markedly diminished in ommatidia containing one or more mutant cone cells (**Fig. 4f**), indicating that *spen* expressed by cone cells is essential for IOC survival.

Finally, we observed that the interommatidial bristles of  $GMR>spen^{RNAi}$  flies often exhibited abnormal morphologies compared with the bristles in control retinas (**Fig. 5**). Although the frequency of bristles was largely the same in control,  $spen^{RNAi}$ , and  $spen^5$  retinas (**Fig. 5** and data not shown), the bristles in *spen* mutant retinas had abnormal shapes and were sometimes present in pairs, most likely due to the loss of secondary and tertiary pigment cells separating bristle cells in the *spen* mutant retinas. These findings suggest that *spen* is required for the terminal differentiation of bristle cells, which is essential for bristle secretion and shaping.

## Discussion

The elimination of superfluous IOCs during eye development is necessary for ommatidial units to form perfect hexagonal arrays. The process requires cell-cell communication and the precise coordination of pro- and anti-apoptotic signals to ensure the removal of a pre-defined number of IOCs. We found that the transcriptional regulator *spen* is required for IOCs to survive during pupal development; accordingly, conditional silencing of *spen* during this period resulted in the elimination of abnormally high numbers of IOCs. Before their elimination, IOCs are sorted (Cagan and Ready, 1989) into specific positions that enable or preclude the receipt of death signals from neighboring cells (Monserrate and Brachmann, 2007). A failure to sort appropriately, as observed in cell sorting mutants (Reiter et al., 1996), leads to the accumulation of IOCs that have escaped death. Here, we showed that loss of function *spen* mutants have an extra loss of IOCs, suggesting that *spen* regulates IOC survival during the pupal apoptotic wave and may not be required for the initial cell sorting phase. However, the combination of *spen* silencing and caspase inhibition further enhanced IOC numbers (Fig. 2e), supporting an apoptosis-mediated role for *spen* in IOC elimination that is only unmasked when apoptosis is reduced in the presence of p35. It is possible that *spen* is also required for proper IOC sorting, but this may be masked due to the extensive loss of IOCs. A role for *spen* in IOC sorting and maturation is supported by the swollen, immature appearance of IOCs and the patterning defects observed in retinas with *spen* loss of function.

Loss of IOCs in *spen*-deficient retina occurred via apoptosis, as shown by the restoration of IOC numbers in flies expressing p35 and by the increased expression of cleaved Dcp-1 in *spen* mutant clones. Interestingly, we found that survival of IOCs requires *spen* expressed in cone cells but not in IOCs themselves. This finding supports a previous study demonstrating a role for cone cells in IOC survival (Miller and Cagan, 1998). Primary pigment cells have also been suggested to play a role in IOC survival (Monserrate and Brachmann, 2007), although we found no evidence that this was mediated via *spen* expression. Therefore, cone cells and primary pigment cells may promote IOC survival through distinct mechanisms.

The molecular mechanism by which *spen* promotes the cell nonautonomous survival of IOCs is not yet clear. One possibility is that *spen* regulates the expression of a secreted survival factor. Cone cells have been shown to secrete Spitz, an EGFR ligand that activates RAS/MAPK signaling (Monserrate and Brachmann, 2007; Yu et al., 2002) and antagonizes

Notch-induced apoptosis (Yu et al., 2002) of IOCs. Thus, *Spen* might regulate the secretion of Spitz by cone cells, which in turn promotes EGFR/RAS/MAPK signaling in IOCs. However, studies to date have failed to demonstrate that the EGFR/RAS/MAPK signaling pathway is differentially activated at the time of IOC death during the pupal stage (Monserrate and Brachmann, 2007). *Spen* acts as a transcriptional repressor downstream of the Notch pathway in the third instar eye imaginal disc (Doroquez et al., 2007). Our observation that the ectopic expression of *spen* in IOCs is sufficient to reduce IOC death therefore raises the possibility that *Spen* may interfere with Notch-induced apoptosis in IOCs. Further work will be necessary to determine whether and how *spen* fine-tunes Notch and EGFR/RAS/MAPK signaling to regulate IOC survival. In conclusion, our work has identified *Spen* as an important survival factor for IOCs, ensuring the correct spatially restricted elimination of superfluous IOCs and thus the formation of perfect hexagonal arrays of ommatidia in the *Drosophila* eye.

## **Acknowledgments**

We thank Laurent Seugnet and Veronique Morel for helpful discussions. We thank the PLATIM and ARTHRO-TOOLS facilities of the UMS3444 Biosciences, Lyon, France for help with confocal microscopy and fly food preparation, respectively. We are grateful to Kenneth Cadigan, Ilaria Rebay, Graeme Mardon, and Richard Mann for fly stocks and reagents. MQ was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation France-Parkinson.

## References

- Bergmann, A., Steller, H., 2010. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* 3, re8.
- Cagan, R.L., Ready, D.F., 1989. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol* 136, 346-362.
- Carthew, R.W., 2007. Pattern formation in the *Drosophila* eye. *Curr Opin Genet Dev* 17, 309-313.
- Chang, J.L., Lin, H.V., Blauwkamp, T.A., Cadigan, K.M., 2008. Spenito and Split ends act redundantly to promote Wingless signaling. *Dev Biol* 314, 100-111.
- Chen, F., Rebay, I., 2000. split ends, a new component of the *Drosophila* EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Curr Biol* 10, 943-946.
- Cordero, J., Jassim, O., Bao, S., Cagan, R., 2004. A role for wingless in an early pupal cell death event that contributes to patterning the *Drosophila* eye. *Mech Dev* 121, 1523-1530.
- Daga, A., Karlovich, C.A., Dumstrei, K., Banerjee, U., 1996. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1. *Genes & Development* 10, 1194-1205.
- Domingos, P.M., Mlodzik, M., Mendes, C.S., Brown, S., Steller, H., Mollereau, B., 2004b. Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 131, 5695-5702.
- Doroquez, D.B., Orr-Weaver, T.L., Rebay, I., 2007. Split ends antagonizes the Notch and potentiates the EGFR signaling pathways during *Drosophila* eye development. *Mech Dev* 124, 792-806.
- Dourlen, P., Bertin, B., Chatelain, G., Robin, M., Napoletano, F., Roux, M.J., Mollereau, B., 2012. *Drosophila* fatty acid transport protein regulates rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival. *PLoS Genet* 8, e1002833.
- Dourlen, P., Levet, C., Mejat, A., Gambis, A., Mollereau, B., 2013. The Tomato/GFP-FLP/FRT Method for Live Imaging of Mosaic Adult *Drosophila* Photoreceptor Cells. *J Vis Exp*.
- Flores, G.V., Duan, H., Yan, H., Nagaraj, R., Fu, W., Zou, Y., Noll, M., Banerjee, U., 2000. Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 103, 75-85.
- Kuang, B., Wu, S.C., Shin, Y., Luo, L., Kolodziej, P., 2000. split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 1517-1529.
- Lane, M.E., Elend, M., Heidmann, D., Herr, A., Marzodko, S., Herzig, A., Lehner, C.F., 2000. A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* 155, 233-244.

Mace, K., Tugores, A., 2004. The product of the split ends gene is required for the maintenance of positional information during *Drosophila* development. *BMC Dev Biol* 4, 15.

Mendes, C.S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H., Mollereau, B., 2006. Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila* retina. *EMBO Rep* 7, 933-939.

Miller, D.T., Cagan, R.L., 1998. Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* 125, 2327-2335.

Mollereau, B., 2009. Cell death: what can we learn from flies? Editorial for the special review issue on *Drosophila* apoptosis. *Apoptosis* 14, 929-934.

Mollereau, B., Domingos, P.M., 2005. Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* 232, 585-592.

Monserrate, J.P., Brachmann, C.B., 2007. Identification of the death zone: a spatially restricted region for programmed cell death that sculpts the fly eye. *Cell Death Differ* 14, 209-217.

Nagata, S., Golstein, P., 1995. The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.

Napoletano, F., Occhi, S., Calamita, P., Volpi, V., Blanc, E., Charroux, B., Royet, J., Fanto, M., 2011. Polyglutamine Atrophin provokes neurodegeneration in *Drosophila* by repressing fat. *Embo J* 30, 945-958.

Pichaud, F., Desplan, C., 2001. A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development* 128, 815-826.

Rebay, I., Chen, F., Hsiao, F., Kolodziej, P.A., Kuang, B.H., Laverly, T., Suh, C., Voas, M., Williams, A., Rubin, G.M., 2000. A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* 154, 695-712.

Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z., Fischbach, K.F., 1996. Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* 122, 1931-1940.

Stowers, R.S., Schwarz, T.L., 1999. A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics* 152, 1631-1639.

Wiellette, E.L., Harding, K.W., Mace, K.A., Ronshaugen, M.R., Wang, F.Y., McGinnis, W., 1999. spen encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* 126, 5373-5385.

Wildonger, J., Sosinsky, A., Honig, B., Mann, R.S., 2005. Lozenge directly activates argos and klumpfuss to regulate programmed cell death. *Genes Dev* 19, 1034-1039.

Wolff, T., Ready, D.F., 1991. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113, 825-839.

Yu, S.Y., Yoo, S.J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B.A., Baker, N.E., 2002. A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development* 129, 3269-3278.

## Figure legends

### Fig. 1. *spen* is required for IOC survival

(a-d) Light microscopy of adult *Drosophila* eyes: (a) GMR-GAL4>UAS-GFP (GMR>GFP), (b) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, (c) GMR>*spen*, and (d) GMR>*spen*;*spen*<sup>RNAi</sup>. (e-h) Interommatidial cells (IOCs) from adult flies of the same genotypes, visualized with the cornea-neutralization method. *Spn* overexpression rescues IOC loss due to *spen* silencing (compare f and h). (i-k) IOCs from adult *Drosophila* eyes visualized with the cornea-neutralization method: (i) *lz*>GFP, (j) *lz*>*spen*<sup>RNAi</sup>, (k) *lz*>*spen*. *Spn* overexpression (k) increases IOC number compared with control flies (i). (l, m) Quantification of IOCs per ommatidium in retinas shown in (l) panels e, f, and h; (m) panels i, j, and k; and (p) panels l and m. (n, o) IOCs from adult retinas visualized with the cornea-neutralization method: wild-type *spen* (*yw*; FRT40A/FRT40GMR-*hidCL*; EGUF) (n) and whole-eye mutant *spen* (*yw*; FRT40A *spen*<sup>5</sup>/FRT40GMR-*hidCL*; EGUF) (o). (p) Quantification of IOCs per ommatidium in retinas shown in panels n and o. Mean  $\pm$  SEM of  $n \geq 10$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  by Student's t-test.

### Fig. 2. Inhibition of apoptosis rescues the loss of IOCs in *spen* mutant flies

(a-d) IOCs from adult flies visualized with the cornea-neutralization method: (a) GMR>GFP, (b) GMR>p35, (c) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, and (d) GMR>p35;*spen*<sup>RNAi</sup>. (e) Quantification of IOCs from retinas shown in (a-d). Mean  $\pm$  SEM of  $n \geq 10$ . \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  by Student's t-test. p35-mediated inhibition of apoptosis increases IOCs in control flies and rescues IOC loss induced by *spen* silencing. (f, g) Fluorescence microscopy of *spen*<sup>5</sup> mutant clones generated with *ey-FLP*. (f) Mutant clones are delineated by the absence of GFP fluorescence. (g) Dcp-1 immunostaining at 28 h APF. (h) Quantification of Dcp-1 staining in wild-type and *spen*<sup>5</sup> mutant clones. Dcp-1 expression is increased in *spen*-deficient clones. Mean  $\pm$  SEM of  $n \geq 10$ . \* $p < 0.01$  by the Mann-Whitney test.

### Fig. 3. *spen* is required for IOC survival during pupation

(a-d) Light microscopy of adult *Drosophila* eyes: (a, b) GMR-GAL4/*ubi-GAL80*<sup>ts</sup>;UAS-*luciferase*<sup>RNAi</sup> and (c, d) GMR-GAL4/*ubi-GAL80*<sup>ts</sup>;UAS-*spen*<sup>RNAi</sup> (c, d) adult flies. Flies in (a, c) were raised from embryo to adulthood at the permissive temperature (18°C) and flies in

(b, d) were raised at 18°C until pupariation, after which they were placed at the restrictive temperature (30°C) for 5 h. (e-h) IOCs from the adult flies represented in (a-d), visualized by the cornea-neutralization method. Induction of *spen*<sup>RNAi</sup> for 5 h APF is sufficient to induce a rough eye phenotype and loss of IOCs in adult retinas.

**Fig. 4. Survival of IOCs requires *spen* expression in cone cells**

(a, b) Fluorescence microscopy (a) and anti-Arm immunostaining (b) of whole-mount pupal eye disks at 42 h APF. *Spn*<sup>5</sup> mutant clones lack GFP expression. The yellow line in (b) marks the clone border. (c) Quantification of IOCs (secondary and tertiary pigment cells) per mosaic ommatidium comparing the control and mutant sides of the clone. (d-f) Quantification of IOCs per ommatidium relative to the number of mutant primary pigment cells (d), bristle cells (e), or cone cells (f). Mean ± SEM of n ≥ 10. ns = not significant and \*\*\**p* < 0.0001 by the nonparametric Kruskal-Wallis test. The number of *spen* mutant cone cells influences the total number of IOCs in the mosaic tissue.

**Fig. 5. *spen* is required for proper formation of retinal bristles**

(a-d) Scanning electron microscopy of eyes from adult GMR>GFP (a, c) and GMR>*spen*<sup>RNAi</sup> (b, d) flies. (e, f) Horizontal sections through bristles from GMR>GFP (e) and GMR>*spen*<sup>RNAi</sup> (f) adult flies imaged by transmission electron microscopy.

**Supplementary figure legends**

**Fig. S1. *spen* silencing reduces PRs and IOCs in adult *Drosophila* retinas**

(a-c) Semi-thin sections of eyes from (a) GMR>GFP, (b) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, and (c) GMR>*spen* adult flies. In (a) and (b), the boxes show ommatidia at enhanced magnification. (d-f) Whole-mount pupal retinas from (d) GMR>GFP, (e) GMR>*spen*<sup>RNAi</sup>, and (f) GMR>*spen* flies analyzed at 42 h APF. Flies also expressed Arm::GFP fusion protein to visualize cell membranes.

**Fig. S2. Expression profile of the *lz*-GAL4 driver in adult retina**

All images show pupal retinas of flies carrying *lz*>nlsGFP analyzed at 26 h APF. (a) Anti-Arm staining to visualize ommatidia. (b) Nuclear GFP indicating *Lz*-GAL4 expression in the four cone cells (cc). (c) Nuclear GFP indicating *lz*-GAL4 expression in all IOCs (several are indicated by \*). Elav staining identifies photoreceptors (blue). (d-f) Elav+ photoreceptors (d)

show nuclear expression of *Lz*-GAL4 (e). (f) Merge of (d) and (e). *Lz*-GAL4 is expressed in a subset of photoreceptors (PR). pp = primary pigment cells.

**Fig. S3. *spen* is ubiquitously expressed in the pupal eye disc**

(a-c) Whole-mount pupal retinas of flies carrying an enhancer trap *PZspen*<sup>03350</sup> analyzed at 26 h APF. (a) Anti-Arm staining. (b, c) Anti- $\beta$ -galactosidase staining showing *spen* expression in primary pigment (pp) cells and cone cells (cc). \* in (c) indicates an IOC nucleus. (d-f) Whole-mount pupal retinas of wild-type (Canton-S) flies analyzed at 42 hours APF. (d) Anti-Spen immunofluorescence staining showing positive expression in cone cells. (e) Nuclear staining with DAPI. (f) Merge of (d) and (e), indicating nuclear and cytoplasmic Spen expression.

**Fig. S4. IOC-specific *spen* does not affect IOC numbers**

(a-c) Whole-mount pupal retinas of flies expressing UAS-APC2::GFP under the control of the 54C-GAL4 driver, analyzed at 42 h APF. (a) Anti-Arm staining; (b) GFP expression; and (c) merge of (a) and (b) showing 54C-GAL4 expression pattern. (d-f) Light microscopy of eyes from *Drosophila* expressing dsRNA against *luciferase* (control, d) and *white* (e), both driven by 54C-GAL4, and expressing dsRNA against *white* (f) driven by GMR-GAL4. Both 54C-GAL4 and GMR-GAL4 drive expression of *white* dsRNA in the IOCs, resulting in a reduction in red pigmentation. (g-j) IOCs from 54C>GFP (g), 54C>*spen*<sup>RNAi</sup> (h), 54C>*spen* (i), and 54C>*Notch*<sup>RNAi</sup> (j) adult flies. (k) Quantification of IOCs in retinas shown in (g-j). Mean  $\pm$  SEM of  $n \geq 10$ . \*\*\* $p < 0.0001$  by Student's t-test. IOC-specific inactivation of *spen* has no effect on IOC number, but *spen* overexpression increases IOCs, similar to the effect of *Notch* receptor silencing (j).

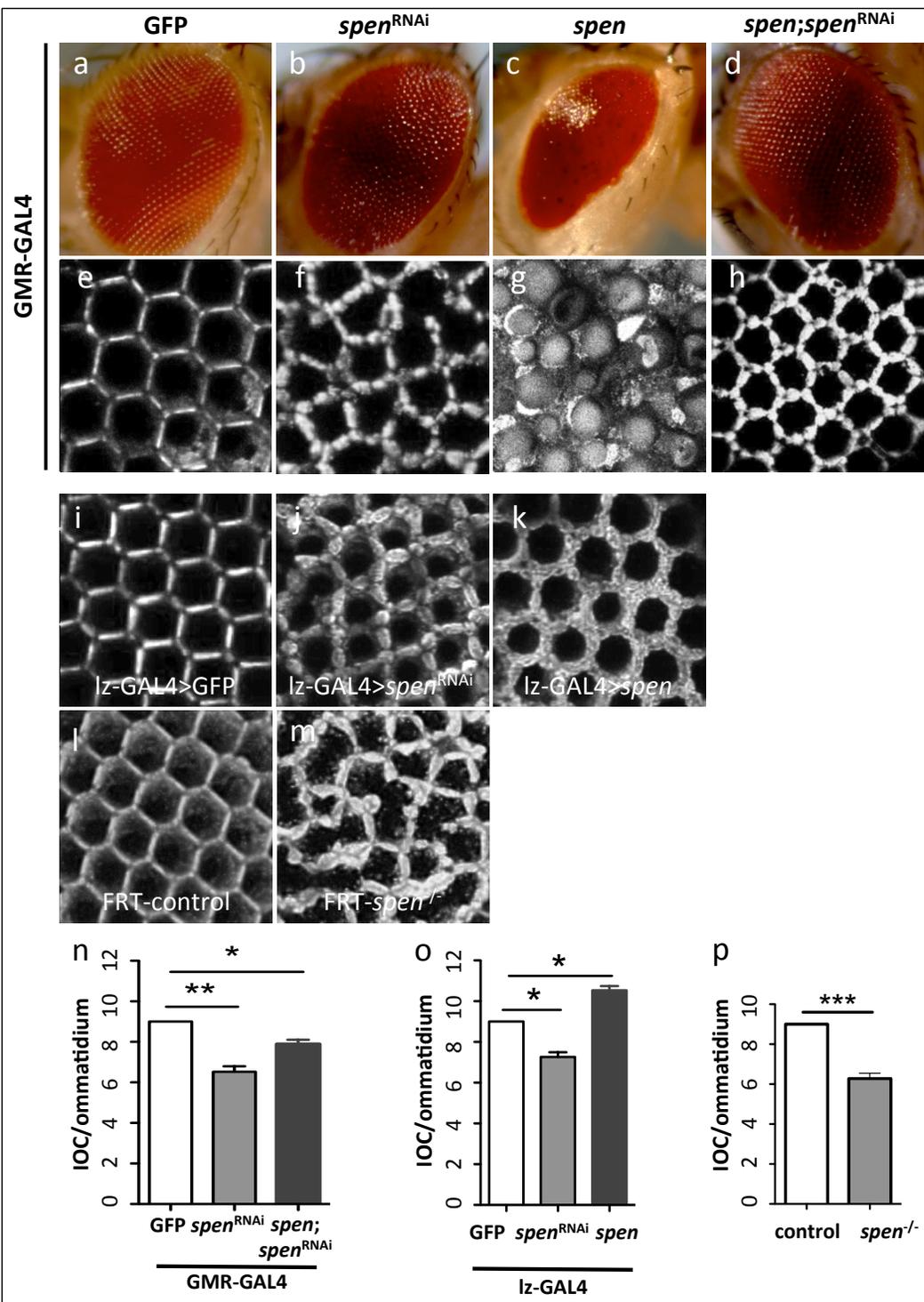


Figure 1.

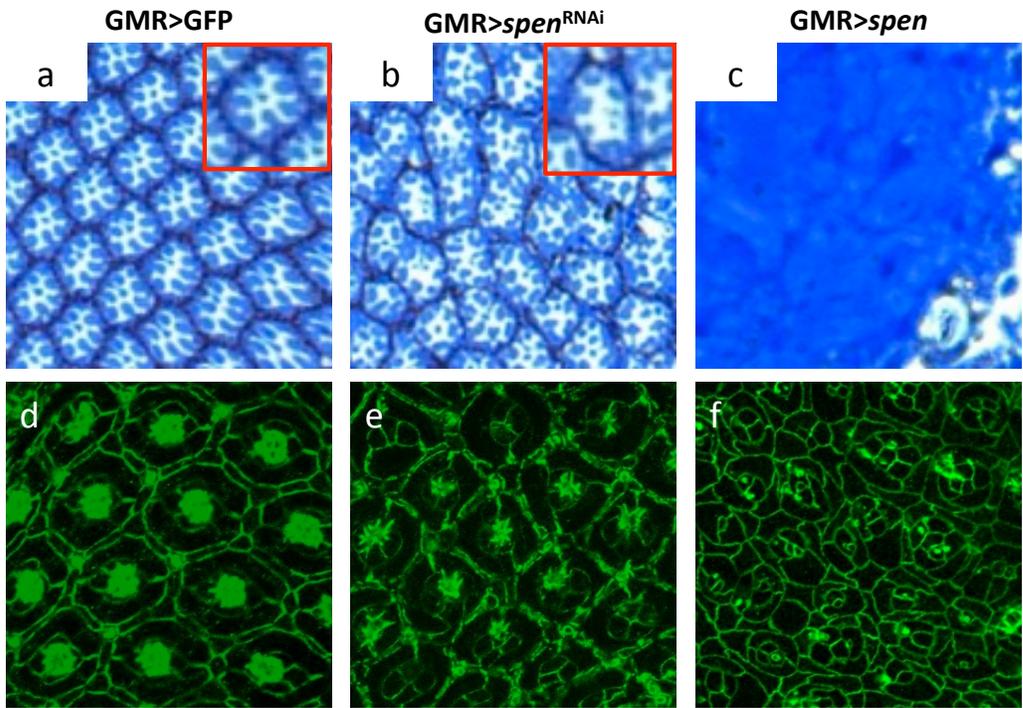


Figure S1.

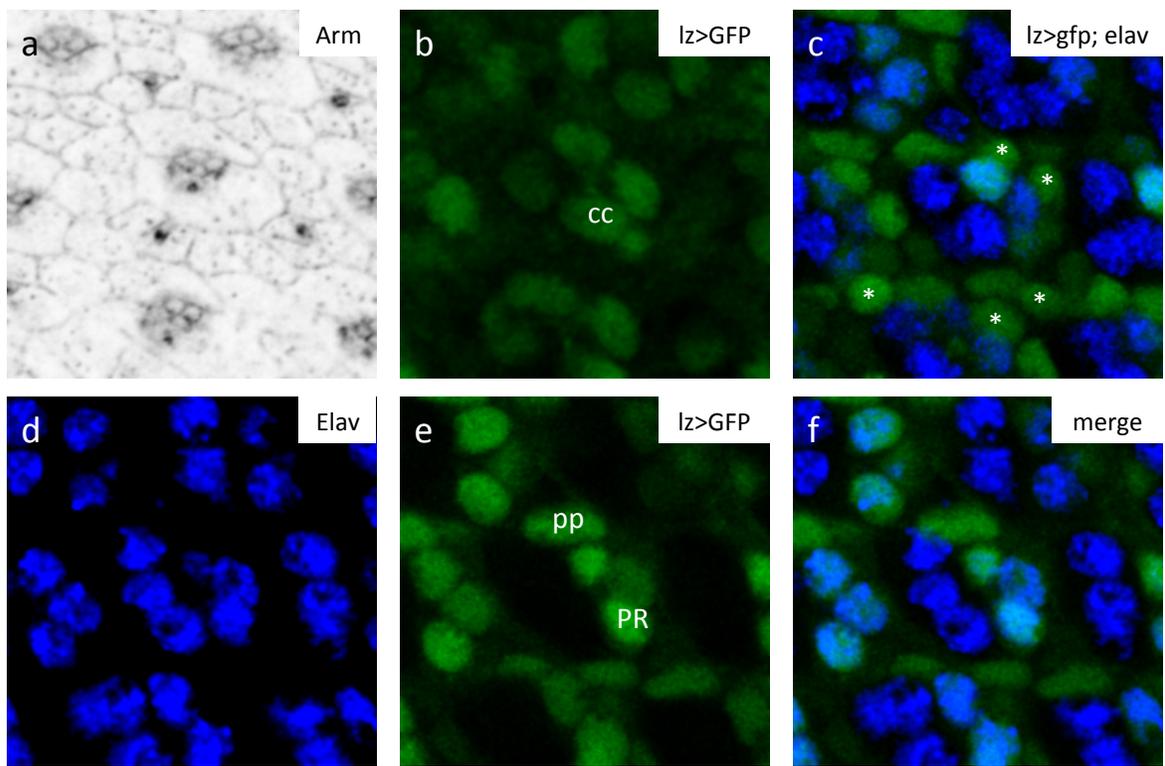


Figure S2.

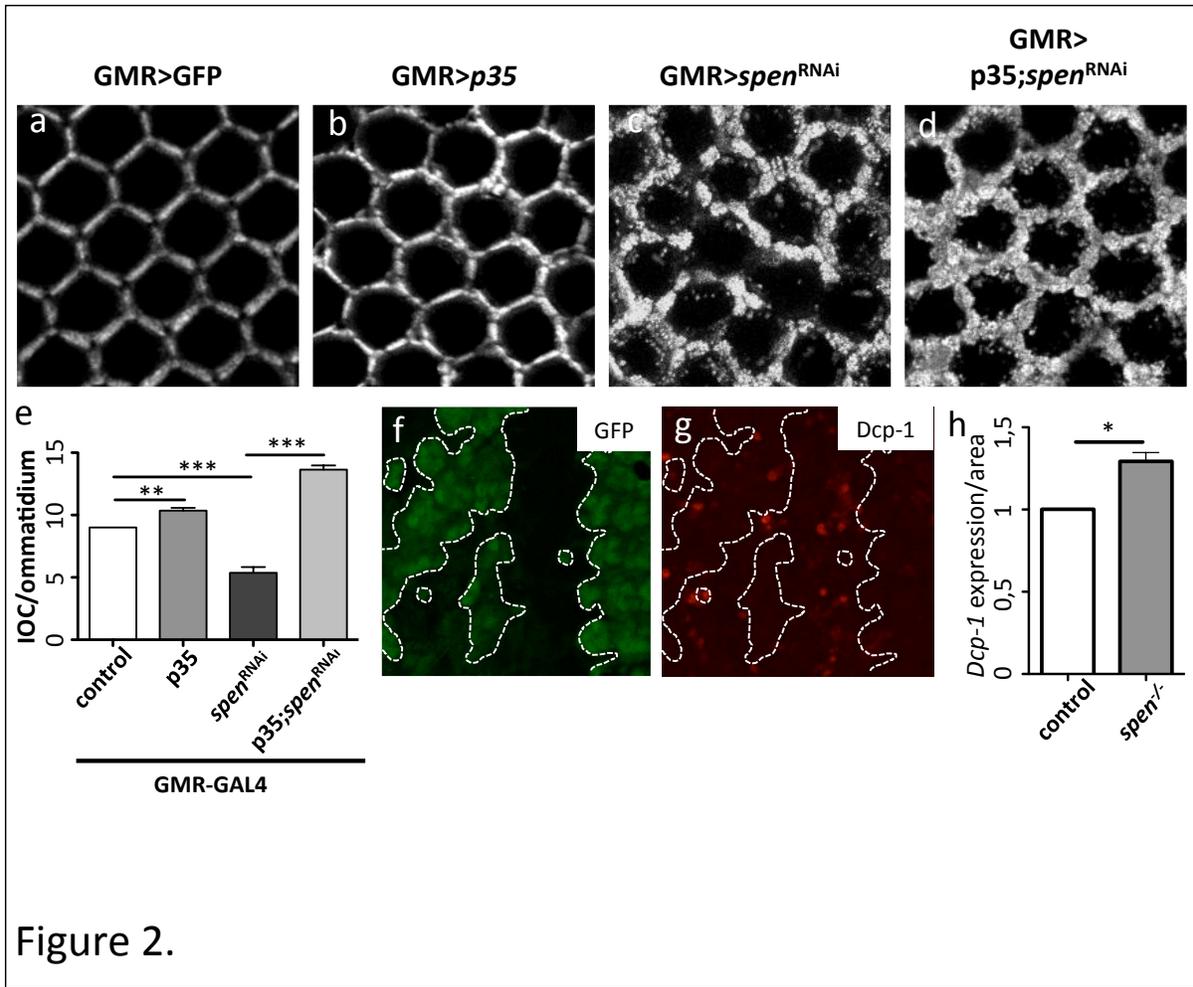


Figure 2.

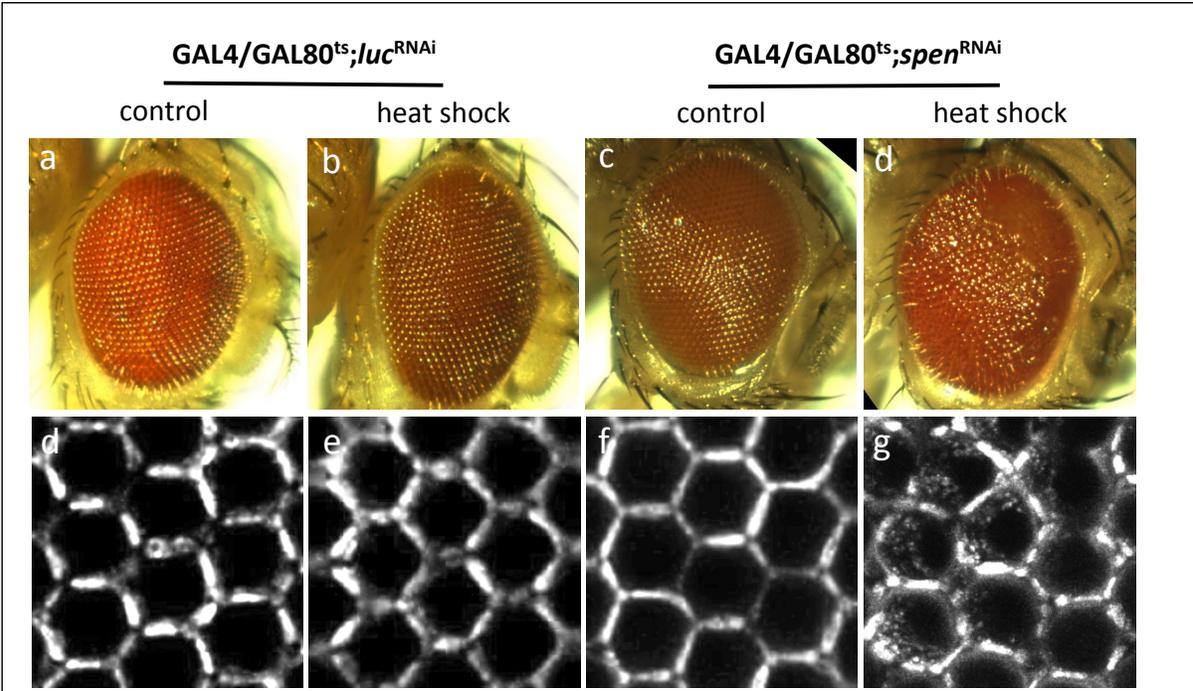


Figure 3.

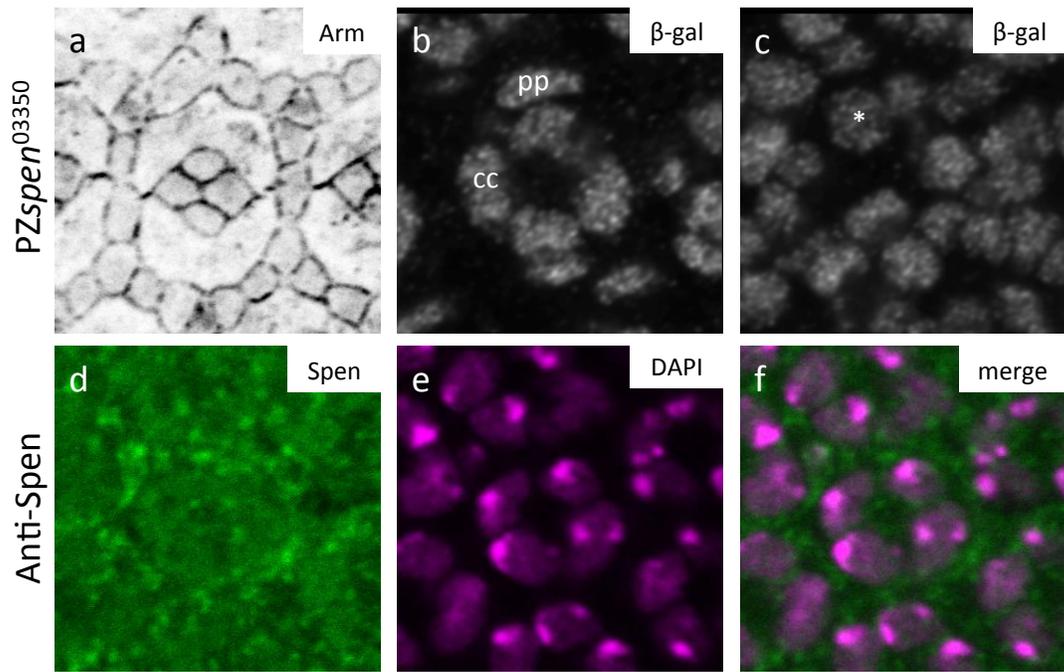
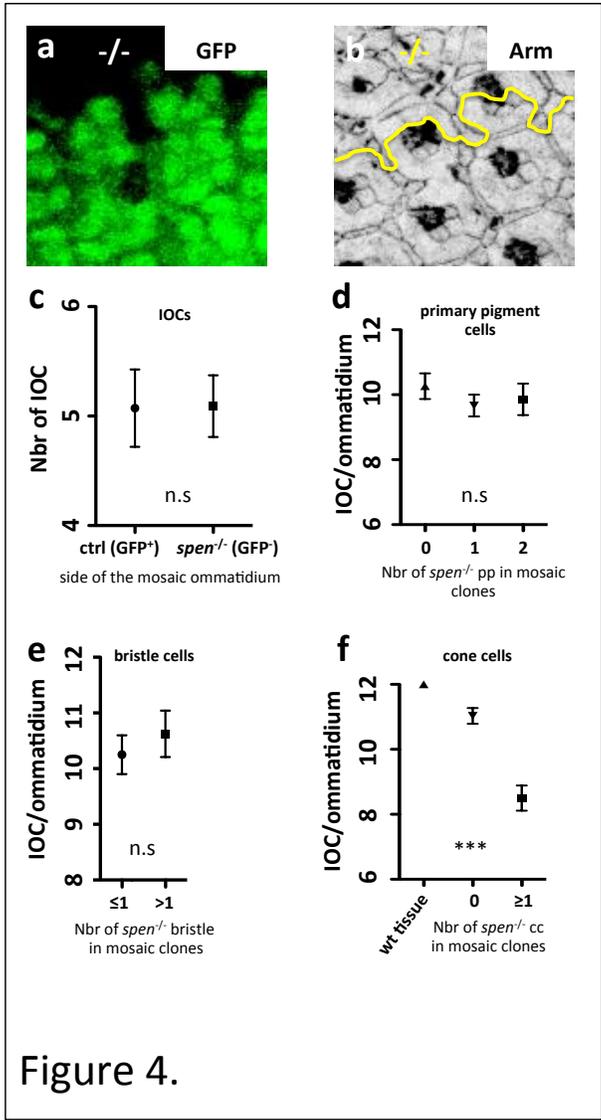


Figure S3.



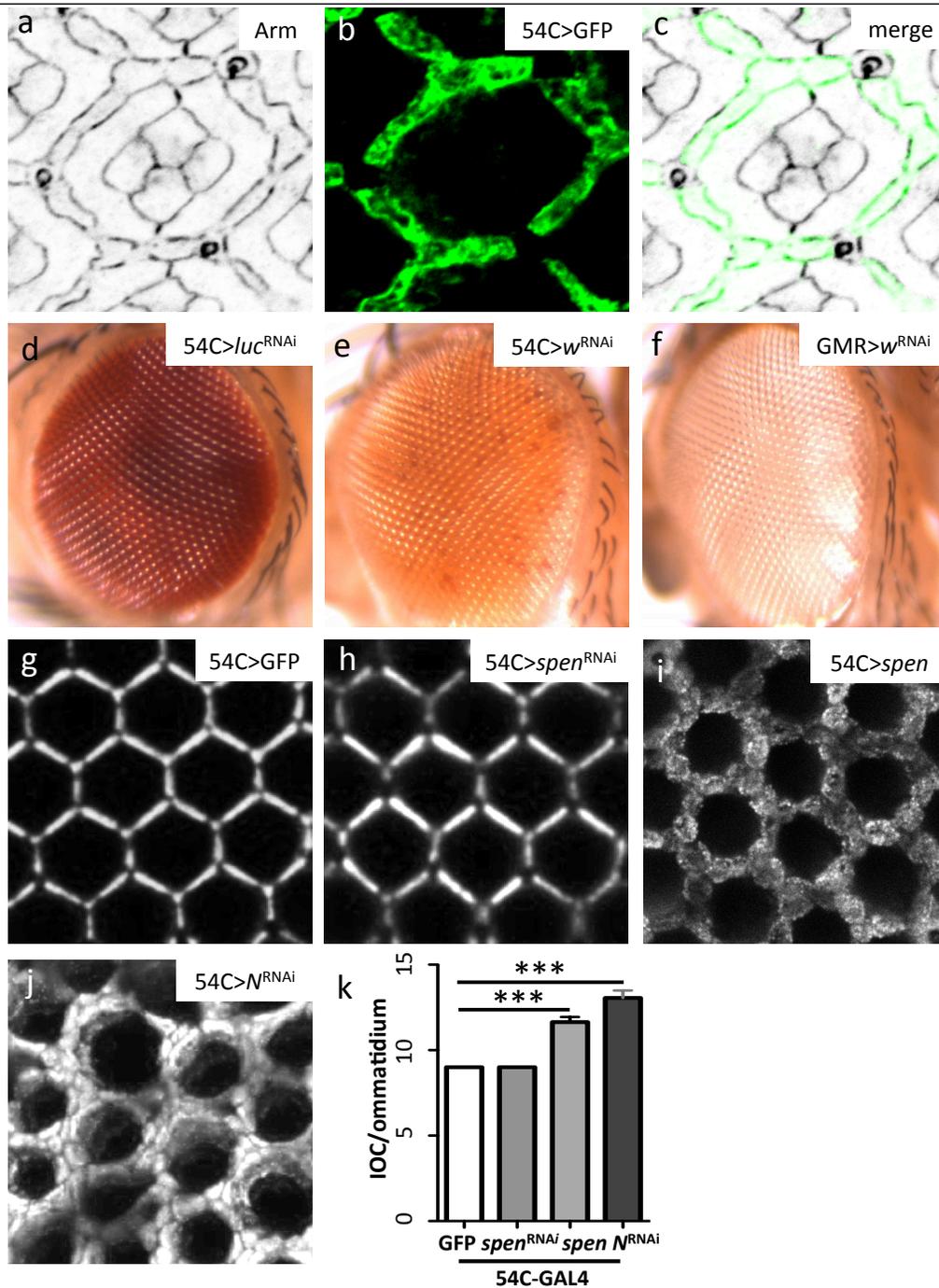


Figure S4.

