

Neurogenèse et diversification des photorécepteurs de la drosophile

Olivier Albagli
Marie-Pierre Laget
Françoise Chanut

La différenciation du photorécepteur R7 de la rétine de drosophile dépend de l'activation du récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK) Sevenless: en l'absence de Sevenless ou de ses effecteurs, le précurseur R7 adopte un destin non neural, l'activation ectopique de la cascade Sevenless transforme des cellules non neurales en R7. La dissection génétique et moléculaire de la transmission du signal neuralisant enclenché par Sevenless a révélé des interactions complexes entre la voie Ras/Raf/MAPKK/MAPK et d'autres effecteurs cytoplasmiques, et montré comment le signal Sevenless modifie l'équilibre entre deux facteurs de transcription antagonistes à domaine ETS, Yan et PointedP2. La spécification des autres photorécepteurs ne dépend pas de Sevenless, mais requiert des facteurs de transcription spécifiques, tels Rough ou Seven-up. Cependant, les effecteurs de Sevenless sont utilisés pour la différenciation de la plupart des autres cellules de la rétine, et contrôlés, dans ce cas, par un autre RTK, Der (*Drosophila EGF-receptor*). La diversification des cellules de la rétine requiert donc l'interprétation distincte d'un même signal RTK. L'intensité variable du signal RTK, mais aussi « l'âge » des cellules indifférenciées au moment de sa réception pourraient conditionner le choix d'une destinée.

ADRESSES

O. Albagli: docteur ès sciences, en stage post-doctoral au laboratoire d'onco-hématologie moléculaire. Inserm U. 124, IRCL, place de Verdun 59045 Lille, France. M.P. Laget: docteur ès sciences au Department of Biochemistry and Biophysic, University of California, San Francisco. UCSF, Department of Biochemistry and Biophysic, San Francisco, California 94143-0554, États-Unis. F. Chanut: docteur ès sciences, en stage post-doctoral au Ernest Gallo Clinic and Research Center de San Francisco. EGCRC, San Francisco General Hospital, Building 1, Room 101, San Francisco, CA 94110, États-Unis.

Cette revue est dédiée à la mémoire de Marie-Pierre Laget, décédée le 3 novembre 1996.

La morphogenèse rétinienne de la drosophile transforme l'épithélium monocouche de cellules indifférenciées du disque imaginal oculaire en une juxtaposition régulière d'environ 800 sous unités identiques, les ommatidies [1, 2]. Cette morphogenèse est progressive. Une « onde », le sillon morphogénétique (SM), dû à la constriction baso-apicale des cellules, balaie le disque de l'arrière vers

l'avant: en avant du SM, les cellules sont indifférenciées et prolifèrent, tandis que la morphogenèse commence dans le SM et se poursuit progressivement derrière lui. L'assemblage des ommatidies procède selon une séquence stéréotypée: le photorécepteur fondateur R8 se différencie en premier. Ensuite, six photorécepteurs externes (R1 à R6) sont recrutés séquentiellement et par paires, selon l'ordre R2/R5, puis

RÉFÉRENCES

1. Albagli O, Laget MP, Chanut F. La morphogénèse myope de la rétine de drosophile. *Med Sci* 1997; 13: 175-83.
2. Rubin GM. Signal transduction and the fate of the R7 receptor in *Drosophila*. *Trends Genet* 1991; 7: 372-7.
3. Dickson B. Nuclear factors in the sevenless signalling. *Trends Genet* 1995; 11: 106-11.
4. Simon MA. Signal transduction during development of the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Dev Biol* 1994; 166: 431-42.
5. Van Vactor DL, Cagan RL, Kramer H, Zipursky SL. Induction in the developing compound eye of *Drosophila*: multiple mechanisms restrict R7 induction to a single retinal precursor. *Cell* 1991; 67: 1145-55.
6. Brunner D, Ducker K, Oellers N, Hafen E, Scholtz H, Klämbt C. The ETS protein pointedP2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* 1994; 370: 386-9.
7. Simon MA, Bowtell DD, Dodson GS, Laverty TR, Rubin GM *ras1* and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 1991; 67: 701-16.
8. Raabe T, Riesgo-Escovar J, Liu X, Bausenwein BS, Deak P, Maröy P, Hafen E. Dos, a novel pleckstrin homology domain containing protein required for signal transduction between sevenless and *ras1* in *Drosophila*. *Cell* 1996; 85: 911-20.
9. Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SL, Hafen E. A gain of function mutation in *Drosophila* MAPkinase activates multiple receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Cell* 1994; 76: 875-88.
10. Karlovich CA, Bonfini McCollamL, Rogge RD, Daga A, Czech MP, Banerjee U. *In vivo* functional dissection of the ras exchange factor son of sevenless. *Science* 1995; 268: 576-9.
11. Fortini ME, Simon MA, Rubin GM. Signaling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by *ras1* activation. *Nature* 1992; 355: 559-61.
12. Treier M, Bohmann D, Mlodzik M. Jun cooperates with the Ets domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 1995; 83: 753-60.

R3/R4, puis R1/R6. Enfin, la différenciation du photorécepteur R7 suit celle de R1/R6 et précède la mise en place des cellules accessoires non neurales: quatre cellules cônes puis les cellules pigmentaires [1-4]. Une fois la cellule R8 sélectionnée par un mécanisme d'inhibition latérale, le recrutement des autres cellules semble correspondre à une succession ordonnée d'inductions locales mises en route par R8. A cause de sa position et de ses caractéristiques fonctionnelles et morphologiques particulières, le photorécepteur R7 est le plus étudié de tous. Plusieurs mutations empêchent la neuralisation du précurseur R7 qui adopte alors un destin par défaut de cellule cône. Inversement, d'autres mutations entraînent l'apparition de cellules R7 surnuméraires. Grâce à la combinaison d'approches génétiques et moléculaires, remarquablement exploitées dans l'œil de drosophile, l'étude de la différenciation de la cellule R7 a permis d'élucider *in vivo* les voies intracellulaire impliquées dans la transmission d'un signal neuralisant [2-4].

Les fiancés

La neuralisation du précurseur R7 dépend de la protéine Bride of Sevenless (Boss), spécifiquement présente dans la membrane apicale de la cellule R8. Boss lie et active Sevenless (Sev), un récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK) présent dans la membrane apicale des précurseurs R7 (*figure 1, Tableau 1*). L'activation de Sev par Boss est nécessaire pour induire la neurogenèse du précurseur R7. Les précurseurs cônes synthétisent également Sev. La synthèse ectopique de Boss ou d'une version constitutive de Sev (ou de ses effecteurs) conduit les précurseurs cônes à se différencier en R7. Les précurseurs R7 et cônes semblent donc équivalents quant à leur compétence pour répondre au signal Sev. Dans les conditions normales, la position particulière du précurseur R7, adjacent à la cellule R8 alors que les précurseurs cônes en sont plus éloignés, et l'ancrage du ligand Boss dans la membrane de R8, permettent la restriction de la destinée R7 à une seule cellule de ce groupe équivalent [2, 3, 5].

Les enfants des fiancés

Puisque l'activation de Sev est nécessaire pour induire la destinée R7, la recherche de mutants dépourvus de R7 devraient permettre d'identifier des médiateurs de Sev. Cependant, si Sev et Boss ne servent qu'à neuraliser R7 [2], leurs médiateurs peuvent, eux, être impliqués dans des fonctions vitales. Plusieurs stratégies ont permis de ne pas limiter le criblage génétique à l'obtention « heureuse » de mutants viables dépourvus de R7 [6]. L'une est l'utilisation d'un contexte sensibilisé, par l'expression d'un allèle thermosensible de *sev* qui produit, à une température adéquate, juste assez de signal pour assurer la différenciation R7. Dans ce contexte, une réduction, même faible, de l'activité d'un médiateur, induit un phénotype *sev*, sans affecter d'autres cascades, éventuellement vitales, dépendant du même médiateur [7]. Cette approche a convergé avec la recherche de mutations supprimant le phénotype produit par une version constitutive de Sev [4, 8]. Inversement, des mutations capables de corriger le phénotype associé à une réduction ou une élimination du signal Sev ont permis d'isoler des allèles activés d'autres gènes impliqués dans la transmission de ce signal [9, 10]. Enfin, le rôle de gènes vitaux a été mis en évidence par leur expression ciblée dans l'œil, sous des formes activées ou dominantes-négatives [11, 12]. Ce criblage génétique est perpétuellement fécond, et l'on recherche à présent des mutants modifiant le phénotype produit par une version activée d'un effecteur identifié dans un premier crible, pour en trouver d'autres, plus en aval [13, 14]. L'ensemble des médiateurs ainsi identifiés définit les étapes du signal neuralisant Sev, depuis la membrane jusqu'au noyau (*figures 1 et 2, Tableau 1*).

La cascade neuralisante

• Médiateurs cytoplasmiques

L'activation de Sev par Boss induit l'autophosphorylation de Sev qui permet de recruter, sous la membrane, le facteur d'échange Sos (*Son of Sevenless*), via l'adaptateur Drk (*Downstream of receptor kinase*). Sos stimule alors D-RasI qui active en cascade les protéines kinases D-Raf/MAPKKK, D-Sor/MAPKK puis

RÉFÉRENCES

13. Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin GM. Ksr, a novel protein kinase required for ras signal transduction. *Cell* 1995; 83: 879-88.
14. Wassarman DA, Solomon NM, Chang HC, Karim FD, Therrien M, Rubin GM. Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1 mediated photoreceptor development in Drosophila. *Genes Dev* 1996; 10: 272-8.
15. Allard JD, Chang HC, McNeill H, Simon M. The SH2 containing protein corkscrew is required during signaling by sevenless ras1 and raf. *Development* 1996; 122: 1137-46.
16. Rebay I, Rubin GM. Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the ras1/MAPK pathway. *Cell* 1995; 81: 857-68.
17. Peveralli FA, Isaksson Papavassiliou AG, Plastina P, Staszewski LM, Mlodzik M, Bohmann. Phosphorylation of jun by the MAP kinase rolled regulates photoreceptor differentiation. *EMBO J* 1996; 15: 3943-50.
18. Kauffman RC, Li S, Gallagher PA, Zhang J, Carthew RW. Ras1 signaling and transcriptional competence in the R7 cell of Drosophila. *Genes Dev* 1996; 10: 2167-78.
19. Moses K. The role of transcription factors in the developing Drosophila eye. *Trends Genet* 1991; 7: 250-5.
20. Heberlein U, Mlodzik M, Rubin GM. Cell fate determination in the developing Drosophila eye: rôle of the rough gene. *Development* 1991; 112: 703-12.
21. Begemann G, Michon AM, van den Voorn L, Wepf R, Mlodzik M. The Drosophila orphan nuclear receptor seven-up requires the ras pathway for its function in photoreceptor determination. *Development* 1995; 121: 225-35.
22. Weber U, Siegel V, Mlodzik M. pipsqueak encodes a novel nuclear protein required downstream of seven-up for the development of photoreceptors R3 and R4. *EMBO J* 1995; 14: 6247-57.
23. Carthew, RW, Neufeld TP, Rubin GM. Identification of genes that interact with the sina gene in Drosophila eye development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11689-93.

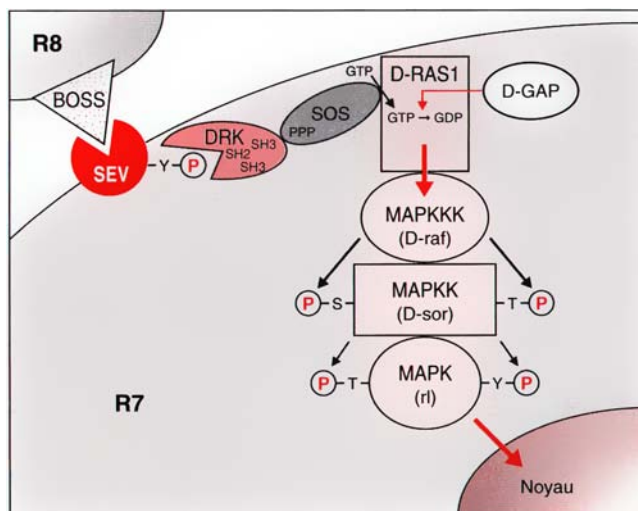


Figure 1. **Transmission du signal Sevenless dans le cytoplasme du précurseur R7.** L'interaction «neuralisante» entre Sev (Sevenless), récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK) à la surface des précurseurs R7 et Boss (Bride of Sevenless), protéine spécifique des cellules R8, induit l'autophosphorylation de Sev et déclenche la cascade neuralisante: Sev recrute Sos, le facteur d'échange de D-Ras1, via l'adaptateur Drk. La stimulation de D-Ras1 permet alors l'activation en cascade des kinases MAPKKK (Map kinase kinase kinase, D-Raf), MAPKK (D-Sor) et enfin MAPK (Ri) dont la phosphorylation/activation permet sans doute la translocation vers le noyau. D-Ras1 est également l'objet d'une régulation négative par D-GAP (GTPase activating protein). D'autres effecteurs essentiels, comme la tyrosine phosphatase Csw (Corkscrew) associée à Sev, son substrat Dos (Daughter of Sevenless) ou la protéine kinase Ksr (Kinase suppressor of Ras) n'ont pas été représentés car leur rôle reste incertain. SH2: src homology domain 2; SH3: src homology domain 3; PPP: domaine riche en résidus proline de Sos permettant son recrutement par Drk.

Rolled (Ri)/MAPK (figure 1) [2, 3]. La protéine D-Gap (GTPase activating protein) qui stimule l'activité GTPasique de D-Ras1, agit dans ce système en inhibiteur du signal, sans rôle transducteur apparent [2]. Cette cascade s'orne d'un nombre croissant de courts-circuits, boucles et ramifications. Ainsi, une version de Sev apparemment incapable de lier Drk conserve une faible activité, peut-être grâce à une interaction directe entre Sev et Sos [8, 10]. Une cascade parallèle semble déclenchée par la tyrosine phosphatase membranaire Corkscrew (Csw): en effet, Csw est nécessaire au signal Sev, et contacte probablement le récepteur Sev, mais son inactivation atténue le phénotype produit par des formes activées de D-Ras1 et D-Raf, ce qui suggère qu'elle agit en parallèle sur des cibles plus en aval [8, 15]. Enfin, l'inactivation de la protéine kinase Ksr (kinase suppressor of Ras) supprime le phénotype induit par D-Ras1 activé, mais pas par D-Raf

activé. Ksr pourrait donc être un intermédiaire entre D-Ras1 et D-Raf, un activateur de D-Raf indépendant de D-Ras1, ou l'effecteur d'une cascade complémentaire indépendante de D-Ras1 et D-Raf [13]. La complexité de la transmission est encore soulignée par la modulation ambivalente exercée par la protéine phosphatase PP2A, qui inhibe le signal D-Ras1 et active le signal D-Raf [14]. Tout en révélant la non-linéarité de la transmission du signal, ces résultats illustrent les limites de l'approche génétique pour appréhender les relations entre les médiateurs. On ne sait pas toujours, par exemple, comment fonctionnent les versions activées: si elles ne sont pas entièrement constitutives, une mutation suppresseur peut identifier aussi bien un activateur en amont qu'un effecteur en aval; en outre, certaines pourraient délivrer un signal si puissant qu'il rendrait tout aussi facultatif un activateur en amont qu'une cascade parallèle complémentaire [13].

Tableau I

QUELQUES RÉGULATEURS DE LA NEUROGENÈSE
ET DE LA DIVERSIFICATION DES CELLULES DE L'OMMATIDIE

Gène	Produit	Fonction
<i>barH1/barH2 (bar)</i>	deux gènes contigus à domaine homéo	différenciation R1/R6
<i>bride of sevenless (boss)</i>	protéine à sept segments transmembranaires	localisé spécifiquement dans la membrane plasmique de R8; ligand et activateur de Sev; induction de R7 par R8
<i>corkscrew (csw)</i>	tyrosine phosphatase à domaines SH2	associé à Sev; différenciation des cellules R; lie et déphosphoryle Dos; activateur de D-Ras1 ou initiateur d'une cascade distincte ?
<i>Drosophila EGF receptor (der)</i>	récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK)	prolifération en avant du SM; différenciation neurale et non neurale
<i>daughter of sevenless (dos)</i>	protéine à domaine pleckstrine	substrat de Csw; différenciation des cellules R
<i>downstream of receptor kinase (drk)</i>	protéine de type SH3/SH2/SH3	relais du signal RTK; « adaptateur » entre les RTK (Sev et Der) et Sos
<i>glass (gl)</i>	facteur de transcription à doigts de Zn	expression de certains gènes spécifiques des cellules R
<i>GTPase activating protein (gap)</i>	stimule la fonction GTPasique de D-Ras1	régulation négative de D-Ras1 et de la différenciation des cellules R
<i>D-jun</i>	facteur de transcription b-zip (boîte basique/ <i>leucine zipper</i>)	déclencheur de la neurogenèse; phosphorylé et activé par rl/MAPK; coopère avec PntP2
<i>kinase suppressor of ras (ksr)</i>	protéine kinase	activé par D-ras1 ?; activateur de D-raf ?; relais d'une cascade indépendante de D-ras1 et D-raf ?
<i>lozenge (lz)</i>	facteur de transcription à domaine RUNT	inhibition de <i>svp</i> dans les précurseurs cônes et R7; nécessaire à l'expression de <i>bar</i> dans R1/R6
<i>Notch (N)</i>	récepteur transmembranaire	sélection de R8; maintient un état indifférencié; inhibition de la compétence des cellules à recevoir le signal inducteur RTK ?
<i>pipsqueak (psq)</i>	protéines nucléaires	différenciation R3/R4; cible et relais de Svp
<i>phyllopode (phyl)</i>	protéine nucléaire	neurogenèse des cellules R1/R6 et R7; cible du signal RTK
<i>pointed (pnt)</i>	deux facteurs de transcription à domaine ETS commun	PntP2 déclencheur de la neurogenèse; phosphorylé et activé par rl/MAPK; différenciation des cellules R; coopère avec D-Jun;
<i>prospero (pros)</i>	protéine nucléaire	guidage de l'axone de R7; cible transcriptionnelle de Sev
<i>D-raf/MAPKK</i>	protéine kinase	relais du signal RTK; activé par D-Ras1; phosphorylé et active D-Sor/MAPKK
<i>D-ras1</i>	petite protéine G	relais du signal RTK; activé par Sos; active D-Raf/MAPKK
<i>rl/MAPK</i>	protéine kinase	relais du signal RTK; phosphorylé et activé par D-Sor/MAPKK; phosphorylé Yan, PntP2, D-Jun
<i>rough (ro)</i>	facteur de transcription à domaine homéo	différenciation/identité de R2/R5
<i>sevenless (sev)</i>	récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK)	neurogenèse du précurseur R7
<i>seven-up (svp)</i>	deux récepteurs nucléaires orphelins proches de Coup/Arp des vertébrés	différenciation/identité de R3/R4 et R1/R6
<i>seven in absentia (sina)</i>	protéine nucléaire à « <i>ring finger</i> »	neurogenèse du précurseur R7; affecte tardivement la différenciation d'autres cellules R
<i>D-sor/MAPKK</i>	protéine kinase « duale » (thr et tyr)	phosphorylation/activation de rl/MAPK
<i>son of sevenless (sos)</i>	protéine à domaine pleckstrine	relais du signal RTK; recruté par drk; stimule D-Ras1: facteur d'échange (GDP par GTP) de D-Ras1
<i>spitz (spi)</i>	apparenté à EGF/TGF α	ligand probable de Der; différenciation neurale et non neurale
<i>tramtrack (ttk)</i>	deux répresseurs transcriptionnels (domaine BTB/POZ/doigts de Zn)	essentiel à la formation des ommatidies; inhibiteur de la différenciation R7
<i>yan/pokkuri (yan/pok)</i>	facteur de transcription à domaine ETS	inhibition du signal RTK; phosphorylé et inactivé (dégradation cytoplasmique ?) par rl/MAPK; antagoniste de PntP2

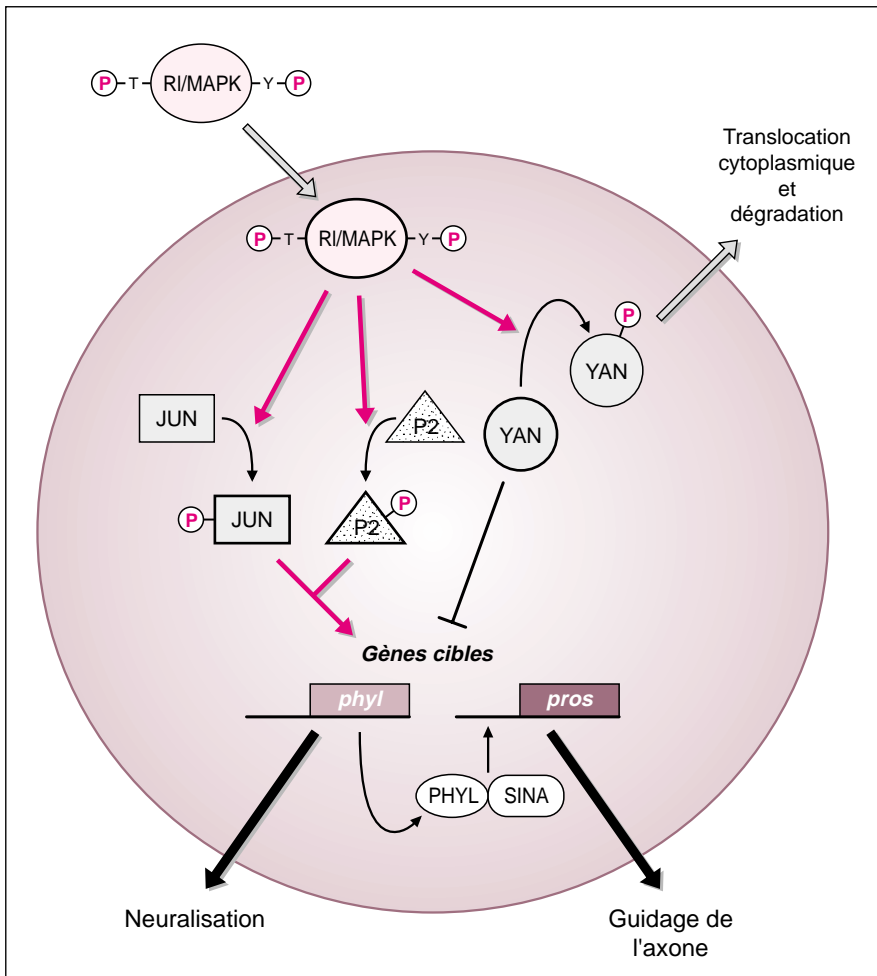


Figure 2. **Intégration nucléaire du signal RTK dans le noyau du précurseur R7.** Les facteurs de transcription PointedP2 (P2) et Yan (YAN) contrôlent de façon antagoniste la neurogenèse du précurseur R7: PntP2 est essentiel à son déclenchement tandis que Yan exerce un effet inhibiteur. Comme PointedP2 et Yan présentent un domaine apparenté de liaison à l'ADN (domaine ETS), leur antagonisme pourrait résulter d'une compétition pour la fixation à des sites communs sur l'ADN, mais d'autres mécanismes sont envisageables. L'activation de RI/MAPK par le signal Sevenless permet à PointedP2 de surmonter l'inhibition exercée par Yan: RI/MAPK phosphoryle ces deux protéines et induit ainsi la fonction transactivatrice de PntP2 et l'inactivation/dégradation de Yan. La neurogenèse dépend aussi de la synthèse transitoire de la protéine D-Jun (JUN), également phosphorylée et activée par RI/MAPK. Le déclenchement de la neurogenèse semble résulter d'une coopération entre PointedP2 et D-Jun, peut-être par la transactivation synergique de gènes cibles communs. Les gènes phyllopod (*phyl*) et prospero (*pros*) semblent être des cibles, directes ou indirectes, de PointedP2 et D-Jun: leur expression est stimulée par D-Ras1 et inhibée par Yan; de plus, l'expression de *pros* requiert *pointed*, tandis que la fonction de D-Jun requiert *phyl*. *Phyl* interagit avec le produit du gène *seven in absentia* (*sina*) et ces deux protéines sont essentielles à la neuralisation du précurseur R7. Le complexe *Phyl/Sina* semble aussi participer à l'induction de *pros* par le signal *Sev*, mais d'une façon probablement redondante avec d'autres protéines régulatrices.

• **L'antagonisme PntP2/Yan(Pok)**
L'activation de RI/MAPK conduit sans doute à sa migration dans le noyau et à

la régulation directe de facteurs de transcription. Deux protéines à domaine Ets contrôlent de façon anta-

goniste la différenciation des cellules R7: PointedP2 (PntP2)* requis pour déclencher la neurogenèse, et Yan qui exerce, au contraire, une influence inhibitrice, peut-être par l'occupation passive ou répressive des sites transactivés par PntP2, ou par la séquestration de cofacteurs essentiels. L'équilibre entre ces deux protéines décide de la neurogenèse puisque l'élimination d'une seule copie de *yan* permet à la surproduction de PntP2, normalement neutre, d'induire des R7 ectopiques. Cet équilibre bascule à l'avantage de PntP2 lorsque RI/MAPK est activé: Yan, exprimé dans les précurseurs indifférenciés, est phosphorylé par RI/MAPK, ce qui conduit à sa translocation cytoplasmique et sa dégradation. En revanche, la phosphorylation de PntP2 par RI/MAPK induit sa fonction transactivatrice [3, 6, 16]. PntP2 déclenche alors la neurogenèse, en coopération avec les composants du facteur AP1, en particulier D-Jun, puisque l'induction de R7 surnuméraires par une version activée de D-Jun requiert la fonction de PntP2. Cette coopération pourrait résulter de la transactivation synergique de promoteurs-cibles communs [12] (figure 2). L'activité de D-Jun, comme celle de PntP2, est dépendante de sites de phosphorylation reconnus par RI/MAPK *in vitro* [16] (figure 2). Les protéines PntP2 et D-Jun disparaissent rapidement après le déclenchement de la neurogenèse [6, 12].

• **Gènes cibles du signal Sev**

L'expression ectopique de D-Ras1 ou D-Raf activés ou l'inactivation de *yan* induit la synthèse de la protéine nucléaire Phyllopede (Phyl) dans les précurseurs cônes. Le gène *phyl* apparaît donc comme une cible du signal *Sev*, peut-être contrôlée par D-Jun et PntP2 [3]. L'activation de *Sev* stimule également la transcription du gène *prospero* (*pros*), qui code pour un probable régulateur transcriptionnel. L'inhibition de l'expression de *pros* par l'inactivation de *pnt* ou par une version activée (non-phosphorylable) de Yan pourrait refléter une régulation directe puisque les régions régulatrices de *pros* fixent ces deux protéines Ets *in vitro* [18].

*PntP2, l'un des produits du gène *pnt*, affecterait seul la neurogenèse des photorécepteurs.

RÉFÉRENCES

24. Yamamoto D, Nihonmatsu I, Matsuo T, Miyamoto H, Kondo S, Hirata K, Ikegami Y. Genetic interactions of pokkuri with seven in absentia, tramtrack and downstream components of the sevenless pathway in the R7 photoreceptor induction in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 1996; 205: 215-24.
25. Lai ZC, Harrisson SD, Karim F, Li Y, Rubin GM. Loss of tramtrack gene activity results in ectopic R7 cell formation even in a *sina* mutant background. *Proc Acad Natl Sci USA* 1996; 93: 5025-30.
26. Daga A, Karlovich CA, Dumstrei K, Banerjee U. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by lozenge which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* 1996; 10: 1194-205.
27. Freeman M. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 1996; 87: 651-6760
28. Fortini ME, Rebay I, Caron LA, Artavanis-Tsakonas S. An activated Notch receptor blocks cell fate commitment in the developing *Drosophila* eye. *Nature* 1993; 365: 555-7.
29. Cagan RS, Ready DF. Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes Dev* 1989; 3: 1099-112.
30. Downward J. KSR a novel player in the RAS pathway. *Cell* 1995; 831-4.
31. Jarman AP, Grell EH, Ackerman L, Jan LY, Jan YN. atonal is a proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 1994; 369: 398-400.
32. Rogge R, Green P, Urano J, Horn-Saban S, Mlodzik M, Shilo BZ, Hartenstein V, Banerjee U. The rôle of yan in mediating the choice between cell division and cell proliferation. *Development* 1995; 121: 3947-58.
33. Zeidler MP, Yokomori K, Tjian R, Mlodzik M. *Drosophila* TFIIA-S is upregulated and required during ras-mediated photoreceptor determination. *Genes Dev* 1995; 10: 50-9.

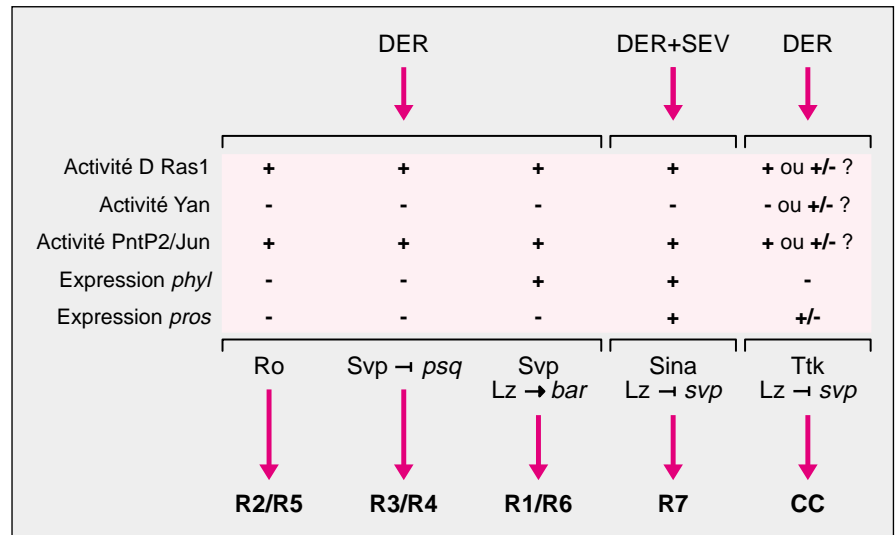


Figure 3. **Diversification des cellules de l'ommatidie.** Le signal RTK (déclenché par Sev ou Sev+Der pour R7) contrôle la différenciation de toutes les cellules de l'ommatidie (à l'exception peut-être de R8). Il règle l'activité et/ou la synthèse (+,-) des effecteurs ou cibles D-Ras1, Yan, PntP2, Jun, Phyl et Pros. Le niveau d'activité de D-Ras1, Yan, PntP2 et D-Jun requis pour la différenciation des cellules cônes reste à préciser. Der est essentiel pour la différenciation des cellules cônes, et celle-ci s'accompagne de l'expression de pointedP2 et de D-Jun, et est inhibée par une version activée de Yan. On peut envisager deux possibilités: la différence entre le destin des précurseurs R7 et cônes résulte d'un signal RTK plus faible dans ces derniers (activité D-Ras1 et PntP2/D-Jun faibles, et activité Yan partiellement maintenue, notées « +/- »). Une autre hypothèse est que cette différence provient de la stimulation plus tardive, mais pas forcément moins intense, des précurseurs cônes par le signal RTK (activité D-Ras1 et PntP2/D-Jun forte notée « + », et inhibition de l'activité Yan, notée « - »). Outre des effecteurs communs du signal RTK, des facteurs de transcription plus spécifiques permettent la diversification des cellules R (Rough (Ro), Seven-up (Svp) et son effecteur Pipsqueak (Psq), Lozenge (Lz) qui active bar et inhibe svp, et Sina) et la mise en place des cellules cônes (Tramtrack (Ttk)). Leur régulation par le signal RTK reste à établir, même si l'expression et l'activité de Svp semblent stimulées par le signal RTK. La mention de ces gènes dans l'établissement de destinées spécifiques ne signifie pas une expression exclusive (par exemple, l'expression de Sina n'est pas restreinte à R7) mais un rôle bien étayé dans la différenciation de cette (ces) cellule(s).

L'expression ectopique de *phyl* induit celle de *pros*. Cette induction requiert la protéine nucléaire Sina (Seven in absentia) qui interagit physiquement avec Phyl. Cependant, l'inactivation des gènes *phyl* ou de *sina* n'altère pas la régulation de *pros*, ce qui suggère que les protéines Phyl et Sina ne sont pas des intermédiaires obligatoires de l'activation transcriptionnelle de *pros* par Sev [18].

Identité des cellules R

Les cellules R présentent toutes des caractéristiques communes aux photorécepteurs contrôlés, en partie,

par le facteur de transcription Glass (Gl) [19]. En l'absence de Glass, les photorécepteurs mutants commencent leur différenciation, mais ne synthétisent pas certains marqueurs spécifiques (comme la Chaoptine) et finissent par mourir. Cependant, elles possèdent également des identités distinctes. Cette diversification dépend d'autres facteurs de transcription comme la protéine à domaine homéo Rough (Ro) et les deux récepteurs nucléaires orphelins codés par *seven-up* (*svp*). En effet, l'inactivation de *svp* transforme R3/R4 et R1/R6 en R7, tandis que dans R2/R5, l'inactivation de *ro*

induit généralement une identité R3/R4 ou R1/R6. Inversement, l'expression ectopique de *ro* ou *svp* convertit les précurseurs R7 en cellules R externes (R1-R6). Le gène *svp* contribuerait donc à imposer une identité de type R3/R4 ou R1/R6 et *ro* une identité de type R2/R5 [19-21]. Le gène *pipsqueak* (*psq*) (codant pour plusieurs protéines nucléaires) est une cible, directe ou indirecte, et un relais essentiel de *svp* dans R3/R4 [22] (figure 3).

Les gènes *ro* et *svp* diffèrent par la capacité spécifique de *svp* d'induire la neurogenèse des précurseurs cônes, indépendamment, par conséquent, du signal RTK enclenché par Sev. Outre son rôle dans la spécification d'une identité, *svp* exercerait donc une fonction neuralisante « autonome ». Notons, toutefois, que l'activité neuralisante de *Svp* dans les précurseurs cônes dépend de la plupart des effecteurs de Sev, contrôlés, dans ce cas, par un autre RTK, Der (*Drosophila EGF receptor*) [21].

Sur quel(s) gène(s) spécifique(s) l'identité de la cellule R7 repose-t-elle ? Le gène *pros* est spécifiquement exprimé par toutes les cellules du groupe cônes/R7 et fortement induit par le signal Sev dans le précurseur R7. Cependant l'inactivation de *pros* perturbe la morphologie de R7 ou le guidage de son axone, mais ne modifie pas véritablement son identité [18]. A l'inverse, l'inactivation de *phyl* transforme R7 en cellules cônes, tandis que son expression ectopique induit la conversion réciproque. Néanmoins, son rôle neuralisant n'est pas restreint à R7, puisque son inactivation transforme aussi R1/R6 en cellules cônes [3]. *Sina* est un candidat plus sérieux : bien qu'il soit exprimé dans de nombreuses cellules, son inactivation ne transforme que le précurseur R7 en cellule cône et supprime, en outre, la formation de R7 surnuméraires produite par l'activation ectopique de *ro* [23]. Cependant, *sina* n'est pas forcément nécessaire puisque des R7, d'origine encore obscure, se forment indépendamment de *sina* lorsqu'un répresseur transcriptionnel (Ttk88) codé par *tramtrack* est inactivé [24, 25]. Par conséquent, l'existence de gènes conférant la compétence spécifique de certaines cellules à former des R7 ou spécifiant l'identité des cellules R7

demeure hypothétique. En revanche, la destinée R7 nécessite l'extinction des gènes d'identité des photorécepteurs externes puisqu'elle requiert le facteur de transcription Lozenge (Lz), un inhibiteur de *svp* dans les précurseurs cônes et R7 [26].

Interprétation du signal RTK

Sev n'est pas le seul RTK nécessaire à R7 : sa formation dépend aussi de Der. Der exerce en fait un rôle très général, puisque son activité est essentielle à la différenciation de toutes les cellules de l'ommatidie, à l'exception, peut-être, de R8 [27]. De plus, la plupart, sinon la totalité, des effecteurs de Sev sont également requis pour le signal Der [4, 8, 15, 21, 27]. Enfin, Der et Sev sont interchangeables, puisqu'une version activée de Der ou la surexpression de son ligand présumé Spitz (Spi) compensent l'inactivation de Sev dans R7 [27]. Sev et Der délivrent donc un signal équivalent, et leur « spécialisation » fonctionnelle serait liée à leur expression distincte (ou celle de leur ligand). Comment, dès lors, un même signal RTK est-il diversement interprété pour déterminer un destin de photorécepteur ou de cellule accessoire et conférer des identités distinctes parmi ces deux groupes ? Cette diversification pourrait refléter une intensité variable du signal RTK dans les différents précurseurs. Par exemple, un faible signal RTK (Der) déterminerait un destin cône, tandis que son exacerbation par Sev dans le précurseur R7 permettrait de franchir le seuil requis pour la neuralisation [18, 21, 26]. D'autres facteurs pourraient cependant intervenir. En effet, selon l'étape du développement de l'ommatidie à laquelle une version activée de Sev est produite, elle peut induire un excès de R7, de cellules cônes ou de cellules pigmentaires [27]. D'autre part, lorsque le recrutement des cellules R1/R6 est artificiellement retardé, elles se comportent comme des cellules plus tardives, en exprimant, comme R7, *pros* mais pas *svp* [18]. Le moment de la réception du signal RTK semble donc conditionner le choix d'un programme de différenciation. Celui-ci serait alors irréversiblement fixé par l'activation de protéines telles que *Svp* ou *Ro* [5].

L'importance du « facteur temps » s'accorde bien avec la construction progressive de l'ommatidie : à chaque étape, des cellules sont ajoutées, identiques entre elles, mais généralement distinctes de celles de la prochaine étape. Il est possible que le « micro-environnement » ommatidial en perpétuelle évolution délivre un signal spécifique variable pour imposer une interprétation distincte du signal inducteur RTK lors de chaque nouveau recrutement. Plus probablement, les cellules non recrutées ont un « âge » par l'acquisition ou la perte (autonome ou non), au cours du temps, de potentialités variables, jusqu'au moment de la réception du signal RTK. Ainsi, l'accumulation de Ttk88 dans les précurseurs cônes avant leur différenciation pourrait contribuer à l'interprétation non neurale du signal RTK le moment venu [25]. Dans cette hypothèse, l'interaction Boss/Sev exercerait un effet « cinétique », sélectionnant précocement une cellule du groupe équivalent cône/R7 en lui permettant d'atteindre plus rapidement l'activité RTK suffisante pour sa différenciation. La synthèse d'une version activée de Sev ou de ses effecteurs dans les précurseurs cônes induirait leur transformation en R7, non pas à cause d'une suractivation du signal RTK, mais de son activation prématurée. Le moment de la réception du signal RTK dépend de la production du ligand Spi par les cellules différenciées [27], mais aussi apparemment de l'activité du récepteur transmembranaire Notch (N) dans les cellules indifférenciées. En effet, l'activation artificielle de N empêche la différenciation des cellules R et son rôle normal semble donc être le maintien de l'état indifférencié [18, 28]. Son inactivation partielle perturbe la plupart des différenciations induites par le signal RTK [29]. N pourrait donc contrôler, indirectement, le choix du programme de différenciation de nombreuses cellules de l'ommatidie, en déterminant le moment de leur réponse au signal RTK [18, 28, 29].

Conclusion

La différenciation du photorécepteur R7 a permis de décrypter la transduction d'un signal de neuralisation. Cette voie de transmission du signal

est non seulement extrêmement conservée dans l'évolution, mais également très diversement utilisée [30]. La différenciation de R7 a enrichi, complété, et parfois devancé les résultats obtenus dans d'autres systèmes [30]. Deux modalités de neuralisation se côtoient dans la rétine. L'une implique le gène *atonal* dont dépendent R8, et, dans une moindre mesure, R2/R5 [1, 31]. L'autre implique les RTK. La relation entre ces deux mécanismes, et leur éventuelle coexistence dans R8 et dans R2/R5, restent à étudier. D'autre part, alors que Der induit la différenciation en arrière du SM, il stimule la prolifération en avant [27] et ces deux effets sont inhibés par Yan [32]. La transition du rôle de Der dans le SM pourrait en partie résulter d'une synthèse accrue de Spi, due à la différenciation de R8 [1]. L'étude génétique de la différenciation R7 pourrait bientôt expliquer comment la « machinerie » de transcription intègre le signal RTK. En

effet, l'inactivation partielle de la petite sous-unité du facteur « basal » de transcription TFIIA (TFIIA-S) supprime la neuralisation des cellules cônes par D-Ras1 activé. En outre, d'autres protéines du complexe de préinitiation de la transcription (TAF pour *TBP associated factors*) sont essentielles à la fonction de D-Ras1 [33]. Il devient donc possible de tester, *in vivo*, leur rôle potentiel d'« adaptateur » entre les facteurs de transcription médiateurs du signal RTK et la machinerie « basale » de transcription ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les Drs D. Coen, F. Schweisguth et P. Dhordain pour leur relecture critique du manuscrit et leurs suggestions, et P. Martin pour son aide constante et précieuse.

Summary

Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: transduction and interpretation of the RTK signaling pathway

Differentiation of the R7 photoreceptor in the *Drosophila* retina depends upon activation of the tyrosine kinase receptor (RTK) Sevenless (Sev). In the absence of Sev or of its mediators, the R7 precursor adopts a non-neural fate, whereas ectopic activation of the Sev cascade transforms non-neural cells into R7. Genetic and molecular studies of these transformations have allowed the dissection of a neuralizing signal initiated by a RTK. These studies reveal complex interactions between the Ras/Raf/MAPKK/MAPK pathway and other cytoplasmic factors, and show how the Sev signal controls the balance between Yan and PointedP2, two antagonistic ETS transcription factors. Specification of the other photoreceptors does not depend upon Sev, but requires specific transcription factors including Rough and Seven-up. Nevertheless, mediators of Sev are involved in the differentiation of most other retinal cells where they respond to another RTK, the *Drosophila* EGF receptor Der. To adopt their diverse fates, retinal cells must therefore interpret in distinctive ways the same RTK signal. The choice of their fate could be conditioned by variations in the intensity of the RTK signal, but also by their own developmental age at the time they receive it.

INTERACTIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES ENTRE LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE : RÔLE DES PROTÉINES D'ADHÉSION

PARIS, 23-24 AVRIL 1997

Mercredi 23 avril 1997

SESSION 1 : BASES MOLÉCULAIRES DES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

- 9 15-10 00. Les membranes basales épithéliales
- 10 00-10 45. Les intégrines : structure, expression et régulation
- 10 45-11 30. Intégrines et signalisation intracellulaire
- 11 30-12 15. Biologie moléculaire des contacts focaux et des hémidesmosomes
- 12 15-13 00. Les protéoglycans : rôle à l'interface entre cellules épithéliales et matrice extracellulaire

SESSION 2 : MATRICE EXTRACELLULAIRE ET PROTÉINES D'ADHÉSION : RÔLE DANS LA MORPHOGENÈSE ET LA DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALES

- 15 00-15 45. Adhésion et morphogenèse : mécanismes généraux
- 15 45-16 30. L'exemple de l'organogenèse intestinale
- 16 30-17 15. L'exemple de l'organogenèse rénale
- 17 15-18 00. Matrice extracellulaire, intégrines et différenciation cellulaire

Jeudi 24 avril 1997

SESSION 3 : IMPLICATIONS EN CANCÉROLOGIE

- 9 00- 9 45. Intégrines et contrôle de la prolifération cellulaire
- 9 45-10 30. Intégrines et régulation de l'apoptose
- 10 30-11 15. Intégrines et cancérogenèse : rôle dans l'invasion et la dissémination métastatique
- 11 15-12 00. Protéines CD44 et cancérogenèse
- 12 00-12 45. Interactions entre cellules tumorales et cellules mésoenchymateuses pour la production du stroma tumoral

SESSION 4 : RÔLE DANS LA FIBROGENÈSE

- 14 30-15 15. Rôle des cellules épithéliales dans la fibrose tissulaire : l'exemple des cellules biliaires
- 15 15-16 00. Interactions entre intégrines et protéases
- 16 00-16 45. Intégrines et fibrogenèse : l'exemple du foie
- 16 45-17 30. Intégrines en physiopathologie rénale
- 17 30-18 15. Stratégies thérapeutiques anti-intégrines

CONCLUSIONS (18.15-18.30)

IFR - Faculté de Médecine Xavier Bichat, B.P. 416, 16, rue Henri-Huchard
75870 Paris Cedex 18, France

Tél. : 33 (0) 1 44 85 63 97 - Fax : 33 (0) 1 44 85 63 98

TIRÉS À PART

O. Albagli.